



Strukturelle und funktionelle Untersuchungen der essenziellen  
Oxidoreduktase Tryparedoxin aus *Trypanosoma brucei* -  
Interaktionen mit Trypanothion und dem kovalenten Inhibitor CFT

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie, Geographie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Annika Wagner

geb. in Bad Kreuznach

Mainz, 2020



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

22.12.2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. [REDACTED]

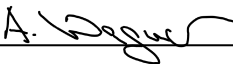
2. Berichterstatter: Prof. Dr. [REDACTED]

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: 09.03.2021



## Urheberschaftserklärung

Ich, Annika Wagner, versichere, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Strukturelle und funktionelle Untersuchungen der essenziellen Oxidoreduktase Tryparedoxin aus *Trypanosoma brucei* - Interaktionen mit Trypanothion und dem kovalenten Inhibitor CFT“ selbst verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

  
\_\_\_\_\_



Für meine Eltern

Die Neugier ist die mächtigste Antriebskraft im Universum, weil sie die beiden größten Bremskräfte im Universum überwinden kann: die Vernunft und die Angst. – Walter Moers



## Danksagung

Eine Doktorarbeit ist nicht die Arbeit eines Einzelnen; daher möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. [REDACTED] für die Möglichkeit, an diesem spannenden Projekt arbeiten zu können, das mich immer wieder überrascht hat. „Umwege erweitern die Ortskenntnis.“ Darüber hinaus hat mich, liebe [REDACTED], deine ansteckende Begeisterung für Naturwissenschaft und deine Hartnäckigkeit, den Dingen auf den Grund zu gehen, maßgeblich geprägt. Vielen Dank für deine stets offene Tür bei Problemen oder Fragen und deine umfangreiche Unterstützung, auch wenn es mal nicht nach Plan verlief.

An dieser Stelle möchte ich meine Dankbarkeit ausdrücken gegenüber Prof. Dr. [REDACTED] für die Begutachtung meiner Dissertation, aber auch für die großartige Zusammenarbeit und die damit verbundene Möglichkeit, an vielen interessanten Projekten mitwirken zu können.

Ich möchte mich besonders bei Prof. Dr. [REDACTED] und seinem Arbeitskreis bedanken für das praktische und theoretische Heranführen an die komplexe NMR-Spektroskopie.

Meine tiefe Dankbarkeit gilt auch Prof. Dr. [REDACTED] und ihrem Arbeitskreis, allen voran [REDACTED] für die Einführung in die faszinierende Welt der Trypanosomen. Vielen Dank für die vielen Plasmid-, Zell-, Antikörper- und Enzymspenden, welche diese Doktorarbeit erst ermöglicht haben.

Die Interdisziplinarität dieser Arbeit wäre nicht realisierbar gewesen ohne die herausragende Expertise meiner Kollaborationspartner. Ich möchte mich bedanken bei [REDACTED] und Prof. Dr. [REDACTED] für die Kristallisation und das Lösen der Röntgenkristallstrukturen des Tpx-CFT-Komplexes; bei Dr. [REDACTED] und Prof. Dr. [REDACTED] für die MD-Simulationen des Tpx-CFT-Komplexes; bei [REDACTED] und Prof. Dr. [REDACTED] für die Synthese der Inhibitoren CFT und MFT; bei Dr. [REDACTED] für die Analyse der SAXS-Daten; bei [REDACTED] und Prof. Dr. [REDACTED] für die QM/MM-Simulationen der <sup>19</sup>F-chemischen Verschiebungen des CFT.

Vielen Dank liebe ehemalige und derzeitige Mitglieder des Arbeitskreises [REDACTED] für die Zusammenarbeit und die bereichernden Gespräche über Wissenschaft, aber auch alles andere. Zu dieser großartigen Atmosphäre haben auch die Mitglieder des Arbeitskreises [REDACTED] Dr. [REDACTED], Dr. [REDACTED], Dr. [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED] beigetragen. Ganz besonders möchte ich mich bei [REDACTED] bedanken. Du warst so ein toller Gefährte während dieses Abenteuers. Auch möchte ich den Bachelor- und Masterstudenten danken, deren Abschlussarbeiten ich betreuen durfte. Ich habe durch euch viel gelernt und ohne eure Unterstützung hätte diese Dissertation vielleicht andere Wege genommen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich immer auf jede ihnen mögliche Weise unterstützt haben. Danke, dass für mich so Vieles selbstverständlich sein durfte.



## Summary

*Trypanosoma brucei* are protozoan parasites and the causing agents of human African trypanosomiasis (African Sleeping Sickness) and the animal disease Nagana. Trypanosomes have an unusual thiol-based redox metabolism based on trypanothione (T(SH)<sub>2</sub>) and trypanothione reductase (TR). Among other redox partners, T(SH)<sub>2</sub> transfers electrons to the essential oxidoreductase Tryparedoxin (Tpx). Tpx then reduces e.g. peroxidases to detoxify peroxides and thus plays a key role in the thiol-based redox metabolism of trypanosomes.

The first part of this PhD thesis investigates the structure and dynamics of Tpx in the oxidized, reduced and trypanothione-bound state. In contrast to the available X-ray structures of Tpx, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy shows that the redox switch of Tpx causes structural changes beyond the active site. Heteronuclear Overhauser Effect (hetNOE) measurements on oxidized and reduced Tpx showed that upon switching between redox states, only the active site is dynamically perturbed. Furthermore, NMR spectroscopic investigations of the Tpx-T(SH)<sub>2</sub> interactions suggest a covalent and non-covalent binding event, the latter being concentration dependent. The amino acids that are presumably involved in the initial binding event and the complex formation of Tpx and T(SH)<sub>2</sub> were identified based on the NMR chemical shift perturbations. Moreover, an unexpectedly long half-life of ~4.8 h for the isolated Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-complex could be determined. Tpx proteins are present in all trypanosomatids. They contain four highly conserved tryptophane residues. The investigation of the tryptophane residues from *T. brucei* Tpx suggest an important role of the tryptophanes for the structure and interaction of Tpx with T(SH)<sub>2</sub>.

The second part of this thesis follows up on the interaction of Tpx with CFT (2-(chloromethyl)-5-(4-fluorophenyl)-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one), a covalent inhibitor that interacts with the active site residue Cys40 in Tpx. In the course of this thesis it was shown that the covalent interaction of CFT with the active site residue Cys40 in Tpx is essential for the inhibition and the inhibitor-protein-interaction. In collaboration with [REDACTED], University of Würzburg, the X-ray structure of Tpx in complex with CFT, which represents the first structure of a tryparedoxin with any inhibitor, was determined at high resolution (1,6 Å und 1,8 Å). Unexpectedly, the Tpx-CFT-complex forms a dimer in the crystal structure. Analytical size exclusion chromatography (SEC), small-angle X-ray scattering (SAXS), size exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering (SEC-MALS) and NMR spectroscopy clearly demonstrate the existence of the Tpx-CFT-dimer formation also in solution. A  $K_D$  of 5.7 μM for the dissociation of the dimer complex was determined by dilution isothermal titration calorimetry (ITC). Inter- and intramolecular interactions of the Tpx<sub>2</sub>-CFT<sub>2</sub>-complex were identified in the crystal structures and by molecular dynamics (MD) simulations (in collaboration with [REDACTED], University of Würzburg). The importance of the intermolecular inhibitor-inhibitor- and inhibitor-protein-interactions identified in the crystal structure for dimer formation and stabilization could be verified by mutagenesis and subjecting mutant proteins to analytical SEC, SAXS, NMR and SEC-MALS experiments. CFT is a fluorinated inhibitor. Because of the high gyromagnetic ratio and the resulting high sensitivity of the -1/2 spin, <sup>19</sup>F is an interesting nucleus for NMR-spectroscopic investigations. In a systematic study of the <sup>19</sup>F resonance of CFT in solution and bound to monomeric or dimeric Tpx, experimental results were combined with quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) calculations (in collaboration with [REDACTED], LMU Munich). This demonstrated the ability of computational approaches to qualitatively predict the binding modes of fluorinated molecules to proteins based on the observed <sup>19</sup>F resonances.

This thesis presents the first crystal structure of Tpx in complex with a covalent inhibitor and reveals an unexpected inhibitor-induced dimerization of Tpx. In addition, the present work expands the understanding of the molecular interaction of Tpx with T(SH)<sub>2</sub>, which is both concentration- and time-dependent.



## Zusammenfassung

*Trypanosoma brucei* sind parasitäre Protozoen und die Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit im Menschen und der Tierseuche Nagana. Trypanosomen haben einen ungewöhnlichen Thiol-basierte Redox-Stoffwechsel, der auf Trypanothion (T(SH)<sub>2</sub>) und der Trypanothion-Reduktase (TR) basiert. Neben anderen Redox-Partnern überträgt T(SH)<sub>2</sub> Elektronen auf die essenzielle Oxidoreduktase Tryparedoxin (Tpx). Tpx reduziert dann z. B. Peroxidasen zur Entgiftung von Peroxiden und spielt damit eine Schlüsselrolle im Thiol-basierte Redox-Stoffwechsel der Trypanosomen.

Der erste Teil dieser Dissertation untersucht die Struktur und Dynamik von Tpx im oxidierten, reduzierten und Trypanothion-gebundenen Zustand. Im Gegensatz zu den verfügbaren Kristallstrukturen von Tpx zeigte die Kernspinresonanz- (NMR-) Spektroskopie, dass die Änderung des Redox-Zustands von Tpx eine strukturelle Veränderung über das aktive Zentrum hinaus bewirkt. Heteronukleare Overhauser-Effekt- (hetNOE-) Messungen an oxidiertem und reduziertem Tpx zeigten, dass sich die Dynamik von Tpx vom oxidierten in den reduzierten Zustand ausschließlich im aktiven Zentrum verändert. Des Weiteren deuten NMR-spektroskopische Untersuchungen der Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Interaktion auf ein kovalentes und nicht-kovalentes Bindeereignis hin, wobei letzteres konzentrationsabhängig ist. Basierend auf den Veränderungen der chemischen Verschiebung wurden die Aminosäuren identifiziert, die vermutlich an einer initialen Bindung und der Komplexbildung von Tpx und T(SH)<sub>2</sub> beteiligt sind. Darüber hinaus konnte eine unerwartet lange Halbwertszeit von ~4,8 h für den isolierten Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex bestimmt werden. Tpx Proteine kommen in allen Trypanosomatiden vor. Sie enthalten vier hochkonservierte Tryptophanreste. Die Untersuchungen der Tryptophanreste in *T. brucei* Tpx deuten auf eine wichtige Rolle der Tryptophanreste für die Struktur und Interaktion von Tpx mit T(SH)<sub>2</sub> hin.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Interaktion von Tpx mit CFT (2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on), einem kovalenten Inhibitor, der mit Cys40 im aktiven Zentrum von Tpx interagiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die kovalente Bindung von CFT an Cys40 im aktiven Zentrum von Tpx für die Inhibition und die Protein-Inhibitor-Wechselwirkung essenziell ist. In Zusammenarbeit mit [REDACTED], Universität Würzburg, wurde die erste Kristallstruktur von Tpx im Komplex mit einem Inhibitor, CFT, in hoher Auflösung (1,6 Å und 1,8 Å) bestimmt. Der Tpx-CFT-Komplex liegt unerwarteterweise als Dimer vor. Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC), Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS), Größenausschlusschromatographie gekoppelt mit Weitwinkel-Lichtstreuung (SEC-MALS) und NMR-Messungen demonstrieren die Tpx-CFT-Dimerbildung auch in Lösung. Mittels isothermer Verdünnungs-Titrationskalorimetrie (ITC) wurde ein  $K_D$  von 5,7  $\mu$ M für die Dissoziation des Dimerkomplexes bestimmt. Inter- und intramolekulare Interaktionen des Tpx<sub>2</sub>-CFT<sub>2</sub>-Komplexes wurden in den Kristallstrukturen und durch Molekulardynamik- (MD-) Simulationen identifiziert (in Zusammenarbeit mit [REDACTED], Universität Würzburg). Analytische SEC-, SAXS-, NMR- und SEC-MALS-Experimente zeigten, dass die in der Kristallstruktur und in MD-Simulationen identifizierten intermolekularen Inhibitor-Inhibitor- und Inhibitor-Protein-Interaktionen essenziell für die Dimerformation sind und die intermolekularen Protein-Protein-Interaktionen den Dimerkomplex stabilisieren. CFT ist ein fluorinierter Inhibitor. Aufgrund des hohen gyromagnetischen Verhältnisses und der daraus resultierenden hohen Empfindlichkeit des -1/2 Spins ist <sup>19</sup>F ein interessanter Nukleus für NMR-spektroskopische Untersuchungen. In einer systematischen Untersuchung der <sup>19</sup>F-Resonanz von CFT in Lösung und gebunden an monomeres oder dimeres Tpx wurden experimentelle Ergebnisse mit quantenmechanischen/molekularmechanischen- (QM/MM-) Berechnungen verbunden (in Zusammenarbeit mit [REDACTED], LMU München). Dies demonstriert die Fähigkeit von computergestützten Ansätzen zur qualitativen Vorhersage der Bindungsmodi von fluorinierten Molekülen an Proteine auf Grundlage der beobachteten <sup>19</sup>F-Resonanzen.

Diese Dissertation stellt die erste Kristallstruktur von Tpx im Komplex mit einem kovalenten Inhibitor vor und enthüllt eine unerwartete Inhibitor-induzierte Dimerisierung von Tpx. Außerdem erweitert die vorliegende Arbeit das Verständnis der molekularen Wechselwirkung von Tpx mit T(SH)<sub>2</sub>, welche sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig ist.



# Inhaltsverzeichnis

Urheberschaftserklärung.....	V
Danksagung .....	IX
Summary .....	XI
Zusammenfassung .....	XIII
Abkürzungsverzeichnis.....	XVIII
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	XXI
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Afrikanische Schlafkrankheit.....	1
1.2 Zelluläre Besonderheiten von <i>Trypanosoma brucei</i> .....	3
1.3 Der Lebenszyklus von <i>Trypanosoma brucei</i> .....	5
1.4 Der Trypanothion-basierte Redox-Metabolismus in <i>T. brucei</i> .....	6
1.5 Tryparedoxin.....	10
1.6 Tryparedoxin als Zielprotein für die Wirkstoffentwicklung.....	16
1.7 Ziel der Dissertation.....	18
2 Material und Methoden .....	19
2.1 Materialien.....	19
2.1.1 Chemikalien .....	19
2.1.2 Isotope für die NMR-Spektroskopie .....	22
2.1.3 Tryparedoxin-Inhibitoren.....	22
2.1.4 Kits.....	23
2.1.5 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.6 Geräte .....	24
2.1.7 Programme .....	27
2.1.8 Oligonukleotide .....	28
2.1.9 Plasmide und Eigenschaften der Proteinkonstrukte .....	30
2.1.10 Zelllinien.....	34
2.1.11 Enzyme.....	35
2.1.12 Antikörper .....	35
2.2 Methoden.....	36
2.2.1 Klonierung.....	36
2.2.2 Proteinexpression und Aufreinigung .....	39
2.2.3 Biochemische und Biophysikalische Analysemethoden.....	43
2.2.4 Zellkultur .....	54
3 Ergebnisse.....	65

3.1	Strukturelle Untersuchung von Tpx im oxidierten, reduzierten und T(SH) <sub>2</sub> -gebundenen Zustand.....	65
3.1.1	Strukturelle Unterschiede von Tpx im oxidierten und reduzierten Zustand.....	65
3.1.2	Betrachtung der Dynamikänderungen des Proteinrückgrats von Tpx zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand.....	69
3.1.3	Betrachtung der Interaktion zwischen Tpx <sup>WT</sup> und Trypanothion mittels NMR-Spektroskopie.....	71
3.1.4	Untersuchung der nicht-kovalenten Interaktion von Tpx <sup>C40S</sup> mit T(SH) <sub>2</sub> .....	76
3.1.5	Der isolierte Tpx-Trypanothion-Komplex hat eine Halbwertszeit von ~4,8 Stunden....	79
3.1.6	Untersuchung des Einflusses der konservierten Tpx-Tryptophanreste auf die Struktur der Oxidoreduktase und seiner Interaktion mit T(SH) <sub>2</sub> .....	82
3.2	Untersuchung der Interaktion von Tpx mit einem kovalenten Inhibitor.....	88
3.2.1	Die kovalente Bindung von CFT an Tpx ist essenziell für die inhibitorische Wirkung..	88
3.2.2	Die Kristallstruktur des Tpx-CFT-Komplexes zeigt die Bildung eines Inhibitor-induzierten Homodimers.....	93
3.2.3	Der Tpx-CFT-Komplex dimerisiert in Lösung.....	98
3.2.4	Die CFT-induzierte Dimerisierung von Tpx ist von intermolekularen Protein-Inhibitor- und Protein-Protein-Interaktionen abhängig.....	100
3.2.5	<sup>19</sup> F NMR-spektroskopische Untersuchungen von freiem CFT und Tpx-gebundenem CFT	108
4	Diskussion.....	112
4.1	Strukturelle Untersuchung von Tpx im oxidierten, reduzierten und Trypanothion-gebundenen Zustand.....	112
4.1.1	Änderungen des Redoxzustands von Tpx werden über das aktive Zentrum hinaus wahrgenommen.....	112
4.1.2	Die Dynamik des aktiven Zentrums von Tpx verändert sich durch den Wechsel des Redox-Zustands.....	114
4.1.3	Identifikation von Resten, die an der kovalenten und nicht-kovalenten Bindung von T(SH) <sub>2</sub> an Tpx beteiligt sind.....	115
4.1.4	Die Komplexbildung aus Tpx und T(SH) <sub>2</sub> ist konzentrationsabhängig.....	123
4.1.5	Die Lebensdauer des isolierten Tpx-T(SH) <sub>2</sub> -Intermediats ist länger als erwartet.....	124
4.1.6	Die Tryptophanreste des Tpx sind essenziell für seine korrekte Faltung und die Interaktion mit T(SH) <sub>2</sub> .....	128
4.2	Die kovalente Bindung von CFT an Tpx induziert eine Dimerisierung des Protein-Inhibitor-Komplex.....	135
5	Ausblick.....	139
6	Anhang.....	143
6.1	Abbildungen.....	143
6.2	Tabellen.....	154
6.3	Klonierung, Expression und Aufreinigung von <i>hs</i> TRPML2 ELD-Konstrukten.....	198

6.4	Plasmidsequenzen.....	201
6.4.1	Plasmidsequenz p043 pET11a_His <sub>6</sub> -SUMO-ELD <sup>K94-V290</sup> .....	201
6.4.2	Plasmidsequenz p108 pETtrx_1b_TbTpx .....	202
6.4.3	Plamidsequenz p220 pETtrx_1b_TbPxIII.....	203
6.4.4	Plasmidsequenz p166 pHD1700_dTRPML.....	205
6.5	Aminosäure- und Proteinsequenzen der Proteinkonstrukte.....	208
7	Literaturverzeichnis .....	217
8	Curriculum vitae.....	229

## Abkürzungsverzeichnis

Anglizismen sind kursiv dargestellt.

AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	engl. <i>absorbance units</i>
BBB	engl. <i>blood brain barrier</i> , Blut-Hirn-Schranke
BMRB	engl. <i>Biological Magnetic Resonance Bank</i>
BS(F)	Blutstrom(form)
CARA	engl. <i>Computer Aided Resonance Assignment</i>
<i>Cf</i>	<i>Crithidia fasciculata</i>
CFT	2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)-thieno[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-4(3 <i>H</i> )-on
CID	chemisch-induzierte Dimerisierung
CV	engl. <i>column volume</i> , Säulenvolumen
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELD	engl. <i>extracytosolic/luminal domain</i> , extrazytosolische/luminale Domäne
FCS	Fetales Kälberserum
FeCl <sub>3</sub>	Eisen(III)-chlorid
FKBP	engl. <i>FK506 binding protein</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Gpx	Selenocysteinhaltige Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
Grx, Glrx	Glutaredoxin
GSH	Glutathion
Gsp	Glutathionylspermidin
GSSG	Glutathiondisulfid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HAT	engl. <i>Human African Trypanosomiasis</i>
HeLa-Zellen	Henrietta Lacks-Zellen, Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
hetNOE	engl. <i>hetero nuclear Overhauser effect</i>
<i>hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
HSQC	engl. <i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITC	engl. <i>Isothermal titration calorimetry</i>
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LB	Luria-Bertani
mal-PEG	Maleimid-Polyethylenglykol
MD	Moleküldynamik
MetSO	Methionin-Sulfoxid

MFT	2-methyl-5-(4-fluorphenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ML	Mucolipin
MM-MD	engl. <i>Molecular mechanic-molecular dynamic</i>
MP-H <sub>2</sub> O	Millipore Reinstwasser
MSR	Methionin-Sulfoxid-Reduktase
mTXNPx	mitochondriale Tryparedoxin-Peroxidase
MW	Molekulargewicht
N <sup>1</sup> -Gsp	N <sup>1</sup> -Glutathionylspermidin
n.a.	engl. <i>Not available</i> , nicht verfügbar
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NiNTA	Ni <sup>2+</sup> Nitrilotriessigsäure
NECT	Nifurtimox-Eflornithin kombinierte Therapie
NMR	engl. <i>Nuclear magnetic resonance</i> ; Kernspinresonanz
ns	engl. <i>number of scans</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OE	engl. <i>Overexpression</i> ; Überexpression
ox	oxidiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	prozyklisch
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDB	engl. <i>Protein data bank</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prx	2-Cys Peroxiredoxin
Px	Nicht Selen abhängige Glutathion Peroxidaseartige Enzyme
QM/MM	engl. <i>Quantum-mechanical/molecular-mechanical</i>
red	reduziert
RLU	engl. <i>Relative light unit</i>
RMSD	engl. <i>Root mean square deviation</i>
ROS	engl. <i>Reactive oxygen species</i> , reactive Sauerstoffspezies
rpm	engl. <i>Rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAXS	engl. <i>Small angle X-ray scattering</i> ; Röntgenkleinwinkelstreuung
SDS	engl. <i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEC	engl. <i>Size exclusion chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
SEC-MALS	engl. <i>Size exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering</i>
ssp	Subspezies
SUMO	engl. <i>Small ubiquitin-like modifier</i>
T(SH) <sub>2</sub>	Trypanothion
<i>T. b. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>

TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>TbMlp</i>	engl. <i>T. brucei</i> <i>Mucolipin-like protein</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)posphine hydrochloride
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyclin
TEV	engl. <i>Tobacco etch virus</i>
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tpx	Tryparedoxin
TR	Trypanothion-Reduktase
TRPML	engl. <i>Transient receptor potential Mucolipin</i>
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin-Reduktase
TryS	Trypanothion-Synthetase
TS <sub>2</sub>	Trypanothiondisulfid
TXNPx	Tryparedoxin-abhängige Peroxidase
Ulp-1	engl. <i>Ubiquitin-like-specific protease 1</i>
UMSBP	engl. <i>universal minicircle sequence-binding protein</i>
VSG	engl. <i>variable surface glycoprotein</i>
WT	Wildtyp

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1-1 Verfügbare Chemotherapeutika gegen die afrikanische Schlafkrankheit. ....	2
Abbildung 1-2 Schematische Darstellung einer <i>T. brucei</i> Blutstrom-Zelle. ....	4
Abbildung 1-3 Der Lebenszyklus von <i>T. brucei</i> . ....	5
Abbildung 1-4 Vergleich der Thiol-basierten Redox-Kaskaden in Säugetieren und Trypanosomatiden. ....	6
Abbildung 1-5 Schematische Darstellung der T(SH) <sub>2</sub> /TR Kaskade in <i>T. brucei</i> . ....	8
Abbildung 1-6 Sequenzalignment von Tryparedoxin aus <i>T. brucei</i> , humanem Thioredoxin und humanem Glutaredoxin. ....	11
Abbildung 1-7 Kreislauf der Tpx-Formen in der T(SH) <sub>2</sub> /TR Kaskade. ....	11
Abbildung 1-8 Übersicht der Kristallstrukturen und katalytischen Eigenschaften von (a) <i>T. brucei</i> Tryparedoxin (Tpx, PDB 1o73), (b) <i>E. coli</i> Thioredoxin (Trx, PDB 1xob) und (c) <i>E. coli</i> Glutaredoxin (Grx, PDB 1grx). ....	12
Abbildung 1-9 Überlagerung der verfügbaren Tpx-Strukturen. ....	13
Abbildung 1-10 Strukturelle Besonderheiten einzelner Tpx-Kristallstrukturen. ....	14
Abbildung 1-11 Molekülstrukturen von (a) CFT und (b) Compound 3. <sup>[21]</sup> ....	16
Abbildung 2-1 Verdünnungsschema für die Transfektion von Parasitenzellen. ....	55
Abbildung 2-2 Pipettierschema der Substanzplatte für den ATPlite Assay. ....	57
Abbildung 3-1 (a) <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC-Spektren von oxidiertem Tpx <sup>WT</sup> (schwarz) und durch 2 mM TCEP reduziertes Tpx <sup>WT</sup> (rot). (b) Unterschiede der chemischen Verschiebungen Δδ (ppm) der <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC Tpx <sup>WT</sup> -Spektren zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand. ....	66
Abbildung 3-2 Kartierung der Δδ Unterschiede der NH-Resonanzen des Proteinrückgrats zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand von Tpx <sup>WT</sup> . ....	67
Abbildung 3-3 Vorhersagen der Sekundärstruktur von Tpx <sup>WT</sup> im (a) oxidierten und (b) reduzierten Zustand mittels TALOS+. ....	68
Abbildung 3-4 Dynamik des Proteinrückgrats von Tpx <sup>WT</sup> im oxidierten und reduzierten Zustand. ...	70
Abbildung 3-5 (a) Molekülstrukturen von Trypanothion (T(SH) <sub>2</sub> ) und Trypanothion-Derivaten N <sup>1</sup> -Glutathionylspermidin (N <sup>1</sup> -Gsp) sowie N <sup>1</sup> ,N <sup>8</sup> -bis(γ-Glu-Ala-Gly)spermidin. (b) <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC-Spektren von <sup>15</sup> N-Tpx <sup>WT</sup> im oxidierten Zustand (schwarz) und in Anwesenheit verschiedener T(SH) <sub>2</sub> -Konzentrationen. ....	72
Abbildung 3-6 T(SH) <sub>2</sub> -abhängige Veränderungen der Position oder Intensität der NH-Resonanzen ausgewählter Aminosäuren in Tpx <sup>WT</sup> . ....	73
Abbildung 3-7 Unterschiede der chemischen Verschiebungen Δδ (ppm) der <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC Tpx <sup>WT</sup> Spektren zwischen dem (a) oxidierten oder (b) reduzierten Zustand und Tpx <sup>WT</sup> in Anwesenheit von T(SH) <sub>2</sub> . ....	74
Abbildung 3-8 „Hitzekarte“ der Unterschiede in Tpx <sup>WT</sup> und Tpx <sup>C40S</sup> in An- und Abwesenheit von T(SH) <sub>2</sub> in der <i>T. brucei</i> Tpx Struktur (PDB 1o73). ....	75
Abbildung 3-9 Konzentrationsabhängige Interaktion von Tpx <sup>C40S</sup> und T(SH) <sub>2</sub> . ....	76
Abbildung 3-10 Unterschied in den chemischen Verschiebungen Δδ (ppm) der <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC Tpx <sup>C40S</sup> Spektren im apo Zustand und in Anwesenheit von T(SH) <sub>2</sub> . ....	77
Abbildung 3-11 Aktivitäten ausgewählter Tpx-Mutanten im gekoppelten Px-Assay relativ zu Tpx <sup>WT</sup> . ....	78
Abbildung 3-12 Bestimmung der Halbwertszeit t <sub>1/2</sub> des Tpx-T(SH) <sub>2</sub> -Komplexes mittels NMR-Spektroskopie. ....	80
Abbildung 3-13 Visualisierung der Migration der NH-Resonanzen von Ile109 und Ala127 0,75 h und 5,25 h nach der Zugabe von T(SH) <sub>2</sub> . ....	81
Abbildung 3-14 Sequenzalignment von Tryparedoxinen (Tpx) aus verschiedenen Trypanosomatidenspezies, humanem Thioredoxin (Trx) und humanem Glutaredoxin (Grx). ....	82

Abbildung 3-15 Strukturelle Integrität der Tpx <sup>W/A</sup> -Mutanten im Vergleich zu Tpx <sup>WT</sup> .....	84
Abbildung 3-16 Ausschnitte der <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC-Spektren von Tpx <sup>WT</sup> , Tpx <sup>W39A</sup> , Tpx <sup>W70A</sup> und Tpx <sup>W142A</sup> im oxidierten und reduzierten Zustand sowie in Anwesenheit von T(SH) <sub>2</sub> .....	85
Abbildung 3-17 Unterschiede $\Delta\delta$ der <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N chemischen Verschiebung im 2D HSQC NMR-Spektrum zwischen Tpx <sup>WT</sup> und Tpx <sup>W39A</sup> .....	87
Abbildung 3-18 Antitrypanosomale Aktivität von (a) CFT und (b) MFT.....	88
Abbildung 3-19 Molekülstruktur von (a) CFT und (b) MFT. <sup>[21,111]</sup> .....	88
Abbildung 3-20 Zeitabhängige Inhibition der Px-Kaskade .....	89
Abbildung 3-21 Ausschnitte der <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D NMR-Spektren von Tpx <sup>WT</sup> in Anwesenheit von CFT oder MFT unter verschiedenen Bedingungen. ....	90
Abbildung 3-22 Analyse der Inhibitionskinetik von Tpx durch CFT.....	92
Abbildung 3-23 1,6 Å und 1,8 Å Kristallstrukturen von Tpx im Komplex mit CFT. ....	93
Abbildung 3-24 Visualisierung der intra- und intermolekularen Interaktionspunkte des Tpx-CFT-Dimerkomplexes.....	94
Abbildung 3-25 MD-Simulationen der intramolekularen Protein-Inhibitor-Wechselwirkungen des Tpx-CFT-Monomers. ....	95
Abbildung 3-26 MD-Simulationen der intermolekularen Interaktionen des Tpx <sub>2</sub> -CFT <sub>2</sub> -Komplexes..	97
Abbildung 3-27 Analytische SEC-Läufe von Tpx <sup>WT</sup> in Anwesenheit von CFT.....	98
Abbildung 3-28 SAXS-Studien an Tpx <sup>WT</sup> im oxidierten, reduzierten und CFT-gebundenen Zustand.	99
Abbildung 3-29 Darstellung der Orientierung der CFT-Moleküle zueinander, im Komplex mit Tpx und ohne Tpx. ....	100
Abbildung 3-30 Analytik der strukturellen Integrität der Tpx-Punktmutanten Tpx <sup>K102A</sup> , Tpx <sup>K102E</sup> , Tpx <sup>E107A</sup> und Tpx <sup>E107K</sup> . ....	101
Abbildung 3-31 Bindung und Inhibition von/durch CFT an Tpx <sup>WT</sup> und Tpx-Mutanten. ....	102
Abbildung 3-32 Analytische SEC-Läufe von Tpx <sup>WT</sup> und Tpx-Mutanten mit CFT.....	103
Abbildung 3-33 SAXS-Studien an Tpx-Varianten im oxidierten, reduzierten und CFT-gebundenen Zustand .....	104
Abbildung 3-34 SEC-MALS von Tpx <sup>WT</sup> , Tpx <sup>W39A</sup> , Tpx <sup>K102E</sup> im Komplex mit CFT. ....	105
Abbildung 3-35 Ausschnitte der <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC-Spektren von (a) <sup>15</sup> N-Tpx <sup>WT</sup> und (b) <sup>15</sup> N-Tpx <sup>W39A</sup> im reduzierten (schwarz) und CFT-gebundenen (rot) Zustand .....	106
Abbildung 3-36 Verdünnungs-ITC-Messungen von (a) Tpx <sup>WT</sup> , (b) Tpx <sup>W39A</sup> und (c) Tpx <sup>K102E</sup> im Komplex mit CFT.....	106
Abbildung 3-37 <sup>19</sup> F-NMR-Spektren von CFT und MFT sowie CFT an Tpx-Varianten gebunden. ....	108
Abbildung 3-38 Darstellung der für die QM/MM-Simulationen verwendeten QM-Regionen und der MM-Einbettung.....	109
Abbildung 3-39 Vergleich der gemessenen und berechneten <sup>19</sup> F-Verschiebungen des Fluoratoms in CFT und MFT sowie CFT in Komplex mit Tpx-Varianten .....	110
Abbildung 4-1 Zoom in das aktive Zentrum von oxidiertem <i>T. brucei</i> Tpx (PDB 1o73) zur Visualisierung des Netzwerkes der Wasserstoffbrückenbindungen. ....	112
Abbildung 4-2 Basierend auf der Orientierung von N <sup>1</sup> -Glutathionylspermidin (N <sup>1</sup> -Gsp) im Komplex mit CfTpxII-Cys44Ser-Mutante in der Kristallstruktur in (a) und (b).....	116
Abbildung 4-3 Sequenzalignment von Tryparedoxin aus verschiedenen Trypanosomatidenspezies .....	120
Abbildung 4-4 Strukturen von Tpx, Grx und Trx. ....	122
Abbildung 4-5 Graphische Darstellung eines möglichen Mechanismus der konzentrationsabhängigen Komplexbildung von Tpx und T(SH) <sub>2</sub> .....	123
Abbildung 4-6 (a) Visualisierung der unterschiedlichen Halbwertszeiten des Tpx-T(SH) <sub>2</sub> -Komplexes .....	126
Abbildung 4-7 Intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Tpx und PxIII. ....	127

Abbildung 4-8 Wechselwirkungen von Trp39 und Trp70 in <i>C. fasciculata</i> TpxI.....	129
Abbildung 4-9 Ausschnitte der <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC-Spektren von Tpx <sup>W39A</sup> und Tpx <sup>W70A</sup> mit Tpx <sup>WT</sup> ....	131
Abbildung 4-10 Intramolekulare Kontakte der Indol-Seitenkette von Trp86 in der Kristallstruktur von <i>T. brucei</i> Tpx .....	133
Abbildung 4-11 Darstellung der möglichen partiellen Entfaltung der Tertiärstruktur von Tpx <sup>W142A</sup> .....	133
Abbildung 4-12 Wechselwirkungen von Trp142 in der <i>T. brucei</i> Tpx Kristallstruktur .....	134
Abbildung 4-13 Alignment der Kristallstrukturen von oxidiertem Tpx (hellblau; PDB 1o73) und im Komplex mit CFT (grau; PDB 6gxy).....	136
Abbildung 4-14 Analytische SEC-Läufe der Tpx-Mutanten Tpx <sup>W39F</sup> und Tpx <sup>W39Y</sup> .....	137
Abbildung 5-1 Cartoon von <i>T. brucei</i> mit einem Ausschnitt des Zytoplasmas und des Lysosoms..	139
Abbildung 5-2 Kristallstruktur der TRPML2 ELD.....	141
Abbildung 5-3 Western Blot-Analyse und Immunofluoreszenz-Mikroskopie von <i>T. brucei</i> BS449-Zellen, welche den <i>Drosophila melanogaster</i> TRPML-Kanal überexprimieren.....	142
Abbildung 6-1 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HSQC-Spektren von Tpx <sup>WT</sup> im oxidierten (schwarz) und T(SH) <sub>2</sub> -gebundenen Zustand.....	143
Abbildung 6-2 Analyse der strukturellen Integrität von PxIII.....	143
Abbildung 6-3 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC-Spektren von Tpx <sup>C40S</sup> in Ab- (schwarz) und Anwesenheit von T(SH) <sub>2</sub> .....	144
Abbildung 6-4 Analytik der strukturellen Integrität verschiedener Tpx-Mutanten.....	145
Abbildung 6-5 2,2 Å Kristallstruktur von Tpx <sup>R44A</sup> im Komplex mit CFT.....	145
Abbildung 6-6 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HSQC-Spektren von Tpx <sup>WT</sup> zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von T(SH) <sub>2</sub> .....	146
Abbildung 6-7 SDS-PAGE der Proteinaufreinigung von Tpx <sup>W86A</sup> .....	147
Abbildung 6-8 Analytik der strukturellen Integrität der Phenylalanin- und Tyrosin-Punktmutanten von Trp39 und Trp70 im Vergleich zum Tpx <sup>WT</sup> .....	147
Abbildung 6-9 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC-Spektren des Tpx <sup>WT</sup> im oxidierten, reduzierten und T(SH) <sub>2</sub> -gebundenen Zustand.....	148
Abbildung 6-10 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC-Spektren von Tpx <sup>W39A</sup> im oxidierten, reduzierten und T(SH) <sub>2</sub> -gebundenen Zustand.....	148
Abbildung 6-11 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC-Spektren des Tpx <sup>W70A</sup> im oxidierten, reduzierten und T(SH) <sub>2</sub> -gebundenen Zustand.....	149
Abbildung 6-12 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC-Spektren des Tpx <sup>W142A</sup> im oxidierten, reduzierten und T(SH) <sub>2</sub> -gebundenen Zustand.....	149
Abbildung 6-13 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N HSQC-Spektren von Tpx <sup>W39A</sup> im oxidierten (schwarz) und reduzierten Zustand (2 mM TCEP, rot).....	150
Abbildung 6-14 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC-Spektren von Tpx <sup>WT</sup> im reduzierten Zustand (schwarz) und in Anwesenheit von CFT (rot).....	150
Abbildung 6-15 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N Best-Trosy-HSQC-Spektren von Tpx <sup>WT</sup> im reduzierten Zustand (schwarz) und in Anwesenheit von MFT (orange).....	151
Abbildung 6-16 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC-Spektren Tpx <sup>WT</sup> im reduzierten Zustand und in Anwesenheit von DMSO.....	151
Abbildung 6-17 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N Best-Trosy-HSQC-Spektren von Tpx <sup>WT</sup> im oxidierten, T(SH) <sub>2</sub> -gebundenen und CFT-gebundenen Zustand.....	152
Abbildung 6-18 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N Best-Trosy-HSQC-Spektren von Tpx <sup>WT</sup> im oxidierten, T(SH) <sub>2</sub> -gebundenen und CFT-gebundenen Zustand.....	152
Abbildung 6-19 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N 2D HSQC-Spektren von Tpx <sup>W39A</sup> im reduzierten Zustand in An- und Abwesenheit von CFT.....	153
Abbildung 6-20 Thermogramme der Kontroll-Experimente der ITC-Messungen zur Bestimmung des K <sub>D</sub> -Wertes des Tpx-CFT-Dimerkomplexes.....	153

Tabelle 1-1 Eigenschaften von T(SH) <sub>2</sub> und GSH und ihre Konzentrationen in T. brucei Zellen.....	7
Tabelle 1-2 Zusammenstellung der Eigenschaften der Tryparedoxin-abhängigen Peroxidasen in T. brucei.....	9
Tabelle 1-3 Aufstellung in der PDB verfügbarer Tryparedoxin-Strukturen .....	15
Tabelle 2-1 Aufstellung der untersuchten Tpx-Inhibitoren .....	22
Tabelle 2-2 Ausgewählte Eigenschaften der verwendeten Proteinkonstrukte.....	32
Tabelle 2-3 Durchgeführte NMR Messungen.....	50
Tabelle 2-4 Im Rahmen dieser Arbeit auf ihre antitrypanosomale Aktivität mittels ATPlite Assay getestete Substanzen.....	58
Tabelle 3-1 NMR-spektroskopisch bestimmte Halbwertszeiten t <sub>1/2</sub> des Tpx-T(SH) <sub>2</sub> -Komplex anhand der wiederkehrenden oder sich verschiebender Resonanzen einzelner Aminosäuren in Tpx.....	81
Tabelle 3-2 Thermodynamische Parameter der ITC-Verdünnungstitrationen von Tpx <sup>WT</sup> -CFT, Tpx <sup>W39A</sup> -CFT und Tpx <sup>K102E</sup> -CFT. (n.a. = nicht verfügbar).....	107
Tabelle 6-1 <sup>1</sup> H-, <sup>15</sup> N-, <sup>13</sup> Cα-, <sup>13</sup> Cβ- und <sup>13</sup> C'-Resonanzen der NMR-Spektroskopie von Tpx <sup>WT</sup> im oxidierten Zustand.....	154
Tabelle 6-2 <sup>1</sup> H-, <sup>15</sup> N-, <sup>13</sup> Cα-, <sup>13</sup> Cβ- und <sup>13</sup> C'-Resonanzen der NMR-Spektroskopie von Tpx <sup>WT</sup> im reduzierten Zustand.....	157
Tabelle 6-3 NH-Verschiebungen der Aminosäuren (#) von Tpx <sup>WT</sup> im oxidierten und reduzierten Zustand.....	161
Tabelle 6-4 TALOS+-Vorhersage des α-Helix-, β-Faltblatt-Anteil und der Anteil zufälliger Schleifen (engl. random coil) aller Aminosäuren (#) von Tpx <sup>WT</sup> im oxidierten Zustand.....	164
Tabelle 6-5 TALOS+-Vorhersage des α-Helix-, β-Faltblatt-Anteil und der Anteil zufälliger Schleifen (engl. random coil) aller Aminosäuren (#) von Tpx <sup>WT</sup> im reduzierten Zustand.....	167
Tabelle 6-6 Integrale der NH-Resonanzen der <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-hetNOE- und <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-NONOE-Spektren von Tpx <sup>WT</sup> im oxidierten Zustand.....	171
Tabelle 6-7 Integrale der NH-Resonanzen der <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-hetNOE- und <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-NONOE-Spektren von Tpx <sup>WT</sup> im reduzierten Zustand .....	174
Tabelle 6-8 NH-Verschiebungen der Aminosäuren (#) von Tpx <sup>WT</sup> im oxidierten Zustand und in Anwesenheit von T(SH) <sub>2</sub> .....	178
Tabelle 6-9 NH-Verschiebungen der Aminosäuren (#) von Tpx <sup>WT</sup> im reduzierten Zustand und in Anwesenheit von T(SH) <sub>2</sub> .....	181
Tabelle 6-10 NH-Verschiebungen der Aminosäuren (#) von Tpx <sup>C40S</sup> im apo Zustand und in Anwesenheit von T(SH) <sub>2</sub> .....	185
Tabelle 6-11 Aktivitäten von Tpx <sup>WT</sup> und verschiedenen Mutanten relativ zur Aktivität von Tpx <sup>WT</sup> bestimmt im gekoppelten Px-Assay.....	188
Tabelle 6-12 NH-Verschiebungen der Aminosäuren (#) von Tpx <sup>WT</sup> und Tpx <sup>W39A</sup> im oxidierten Zustand .....	189
Tabelle 6-13 NH-Verschiebungen der Aminosäuren (#) von Tpx <sup>WT</sup> und Tpx <sup>W39A</sup> im reduzierten Zustand .....	192
Tabelle 6-14 Zeitabhängige Inhibition der Px-Kaskade durch CFT oder MFT .....	196
Tabelle 6-15 Zeit- und Konzentrationsabhängige relative Inhibition (%) der Px-Kaskade im gekoppelten Px-Assay.....	196
Tabelle 6-16 Die ausgehend von Tabelle 6-15 mittels GraFit bestimmten k <sub>obs</sub> -Werte in min <sup>-1</sup> . <sup>[111]</sup> .....	197
Tabelle 6-17 Inhibitionen von Tpx <sup>WT</sup> , Tpx <sup>W70A</sup> , Tpx <sup>K102E</sup> und Tpx <sup>I109A</sup> durch CFT im gekoppelten Px-Assay .....	197
Tabelle 6-18 Ausgehend von den SAXS-Daten berechnete Gyrationradien von Tpx <sup>WT</sup> , Tpx <sup>W39A</sup> , Tpx <sup>W70A</sup> , Tpx <sup>K102E</sup> und Tpx <sup>I109A</sup> .....	197

Tabelle 6-19 Im Rahmen dieser Arbeit gestaltete und verwendete Oligonukleotide .....	199
Tabelle 6-20 Verwendete Plasmide für die Klonierung und Expression von ELD-Konstrukten.....	200
Tabelle 6-21 Ausgewählte Eigenschaften der verwendeten ELD-Proteinkonstrukte.....	200



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Afrikanische Schlafkrankheit

Trypanosomatide lösen weltweit verheerende Seuchen aus, die eine Gefahr für die Gesundheit und das soziale Leben der Menschen darstellen und die Wirtschaft schädigen. Zu den Trypanosomatiden zählen die amerikanischen Trypanosomen (*Trypanosoma cruzi*), welche die Chagas-Krankheit auslösen und Leishmanien, welche die weltweit auftretende Leishmaniasis verursachen (*Leishmania ssp.*). Afrikanische Trypanosomen sind die Auslöser der humanen afrikanischen Schlafkrankheit (engl. *Human African Trypanosomiasis*, HAT, *Trypanosoma brucei gambiense* und *T. b. rhodesiense*) sowie der Rinderseuche Nagana (*T. brucei brucei*, *T. vivax* und *T. congolense*). Afrikanische Trypanosomen werden durch einen Stich der Tsetse-Fliege der Gattung *Glossina* auf den Wirt übertragen. Die Verbreitung der HAT beschränkt sich daher auf den Lebensraum der Tsetse-Fliege, den „Tsetse-Gürtel“, welcher eine Fläche von 8 Mio. km<sup>2</sup> zwischen dem 14. südlichen und 22. nördlichen Breitengrad auf dem afrikanischen Kontinent umfasst.<sup>[1]</sup> HAT ist in 36 Ländern der Subsahara endemisch und 60 Mio. Menschen leben mit dem Risiko sich zu infizieren.<sup>[2]</sup> 98% aller der Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organisation*, WHO) gemeldeten HAT-Fälle wurden durch *T. brucei gambiense* ausgelöst.<sup>[2]</sup> Die Zahl der Infektionen durch *T. b. gambiense* sanken in den letzten 19 Jahren um 96%, von 26.550 Fällen (2000) auf 864 Fälle (2019).<sup>[3]</sup> Des Weiteren hat Togo als erstes afrikanisches Land die HAT als Problem der öffentlichen Gesundheit für beendet erklärt, da in den letzten 10 Jahren keine Infektionen gemeldet wurden.<sup>[4]</sup>

Nach dem Stich einer infizierten Tsetse-Fliege kann es beim Wirt zu einer primären Hautläsion kommen, dem Schanker. Die afrikanische Schlafkrankheit verläuft anschließend in zwei Stadien.<sup>[5]</sup> In der ersten, hämolymphatischen Phase der HAT vermehren sich die Parasiten im Blut und dem lymphatischen System, aber auch in den systemischen Organen, wie Herz, Leber, Milz und endokrinen Organen.<sup>[6]</sup> Die Symptome dieser Phase, die Kopfschmerzen, Müdigkeit, periodisch wiederkehrendes Fieber und Gewichtsverlust umfassen, sind eher unspezifisch. Die HAT wird daher meist nicht diagnostiziert und behandelt.<sup>[5,6]</sup> In der zweiten, meningoenzephalitischen Phase hat der Parasit die Blut-Hirn-Schranke (engl. *blood brain barrier*, BBB) passiert und ist nun auch im zentralen Nervensystem lokalisiert. Die charakteristische Schlafstörung dieser Phase, bestehend aus Müdigkeit tagsüber und Schlaflosigkeit in der Nacht, gab der Krankheit ihren Namen.<sup>[5]</sup> Weitere Symptome dieser Phase sind motorische und mentale Koordinationsschwierigkeiten sowie Demenz und Krampfanfälle in der terminalen Phase der Krankheit.<sup>[6,7]</sup> Unbehandelt führt die Erkrankung zum Tod. *T. b. rhodesiense* löst eine akute und aggressivere Infektion als *T. b. gambiense* aus.<sup>[2]</sup> Die zweite Phase der *T. b. rhodesiense*-Erkrankung wird schon nach wenigen Wochen erreicht und der Tod erfolgt in weniger als sechs Monaten.<sup>[5]</sup> Das Erreichen des meningoenzephalitischen Stadiums kann im Falle einer *T. b. gambiense* Infektion über mehrere Monate hinziehen, weshalb diese Infektionsform auch als chronisch bezeichnet wird.<sup>[2,6]</sup>

Vorteilhaft für eine erfolgreiche Therapie ist eine frühe Diagnose und Behandlung des Patienten vor dem Erreichen der zweiten Krankheitsphase. Die Therapieform ist abhängig von der Infektionsform und dem Stadium der Erkrankung. Die meisten der verfügbaren Medikamente gegen die afrikanische Schlafkrankheit wurden allerdings bereits vor mehr als 50 Jahren entwickelt und haben zum Teil schwere Nebenwirkungen. Suramin, ein symmetrischer Polysulfonatnaphthylharnstoff,<sup>[8]</sup> wurde 1916 zur Behandlung der Infektion mit *T. b. rhodesiense* eingeführt. Da Suramin hydrophil ist, wird es intravenös verabreicht und kann die BBB nicht passieren (Abbildung 1-1a).<sup>[9]</sup> Daher kommt es nur

während der ersten Phase der Erkrankung zum Einsatz. Suramin inhibiert verschiedene Enzyme im Parasiten, z. B. die in Glykosomen lokalisierten Glykolyseenzyme.<sup>[10]</sup> Allerdings ist der genaue Mechanismus von Suramin bis heute nicht aufgeklärt.<sup>[9]</sup> Ein weiterer Arzneistoff gegen das Anfangsstadium der afrikanischen Schlafkrankheit ist Pentamidin, ein aromatisches Diamin (1937, Abbildung 1-1b).<sup>[8]</sup> Es wird gegen die Infektion mit *T. b. gambiense* eingesetzt und kann intramuskulär oder intravenös verabreicht werden.<sup>[5]</sup> Der Wirkmechanismus von Pentamidin ist ebenfalls nicht vollständig aufgeklärt. Pentamidin lagert sich an negativ-geladenen Zellkompartimente, wie Phospholipide und Nukleinsäuren an und zerstört die Struktur der mitochondrialen DNA vermutlich durch die Inhibition der Topoisomerase II.<sup>[9,11]</sup> Das Medikament wird vermutlich durch den P1/P2 Aminopurin-Transporter<sup>[8]</sup> und Aquaporin 2<sup>[12]</sup> aufgenommen und ein Funktionsverlust der Transporter führt zu einer Resistenz des Parasiten gegen Pentamidin.<sup>[13]</sup> 1949 wurde Melarsoprol, eine trivalente Arsenverbindung (Abbildung 1-1d),<sup>[8]</sup> gegen das meningoenzephalitische Stadium von *T. b. gambiense* und *rhodesiense* Infektionen eingeführt.<sup>[9]</sup> Es wird intravenös verabreicht und ist eine schmerzhaft sowie in 5 - 9% der Fällen tödliche Therapie.<sup>[6]</sup> Melarsoprol wird im Menschen zu Melarsenoxid metabolisiert und über den P2 Purintransporter und Aquaporin 2 des Parasiten aufgenommen. Melarsenoxid bindet an Trypanothion, dem essenziellen leichten Thiol des Redox-Metabolismus des Parasiten und inhibiert so die Trypanothion-Reduktase.<sup>[9]</sup> Trypanothion und Trypanothion-Reduktase werden in Kapitel 1.4 genauer eingeführt. Des Weiteren inhibiert Melarsoprol verschiedene wichtige Stoffwechsel- und Transportfunktionen, was zu einer raschen Zelllyse und dem damit verbundenen Zelltod führt.<sup>[9]</sup> Der genaue Mechanismus ist jedoch nicht bekannt. Auftretende Resistenzen gegen Melarsoprol sind analog zu Pentamidin mit einem Funktionsverlust des P2 Purintransporters und von Aquaporin 2 verbunden.<sup>[14]</sup> Gegen das zweite Stadium der *T. b. gambiense*-Infektion wird in erster Linie eine Kombinationstherapie aus Eflornithin (intravenös) und Nifurtimox (oral) verwendet (engl. *nifurtimox eflornithine combination therapy*, NECT).

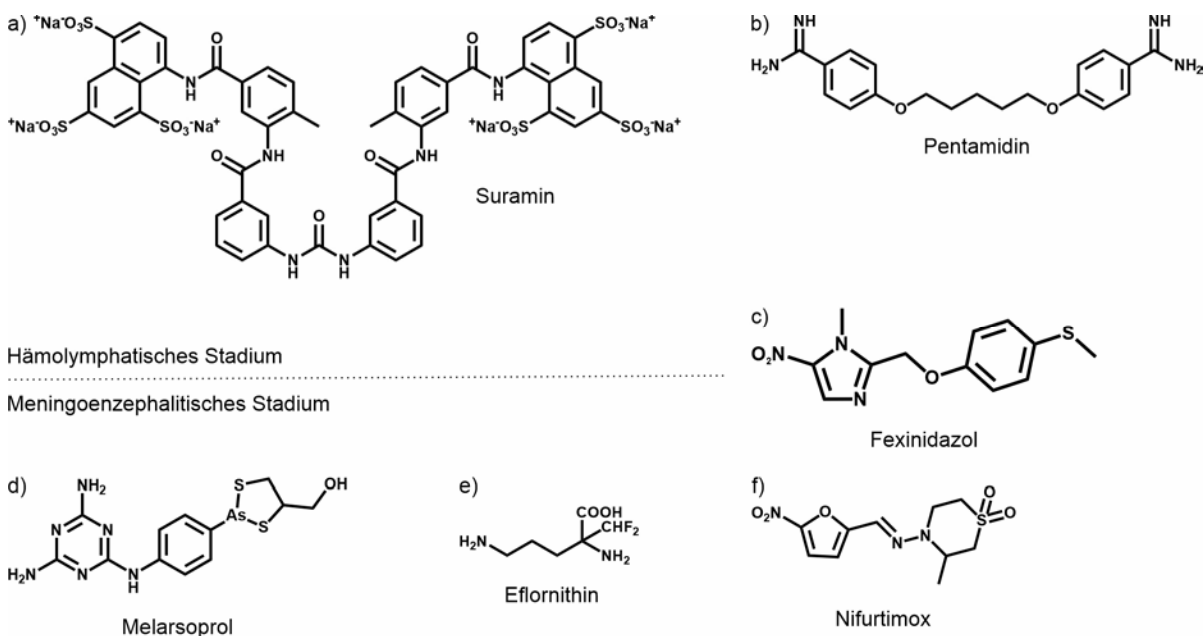


Abbildung 1-1 Verfügbare Chemotherapeutika gegen die afrikanische Schlafkrankheit. Es sind die Molekülstrukturen von (a) Suramin und (b) Pentamidin gezeigt, welche gegen das hämolymphtische Stadium der afrikanischen Schlafkrankheit eingesetzt werden. Nach dem Erreichen des meningoenzephalitischen Stadiums werden Patienten mit (d) Melarsoprol, (e) Eflornithin und (f) Nifurtimox behandelt. (c) Fexinidazol nimmt eine besondere Stellung ein, da es sowohl in der ersten als auch in der zweiten Phase der Erkrankung verabreicht werden kann.

Eflornithin (Abbildung 1-1e) ist ein irreversibler Inhibitor der Ornithin-Decarboxylase, welche den initialen Schritt der Trypanothion-Synthese katalysiert.<sup>[15]</sup> Eflornithin kann auch als Einzeltherapie verwendet werden. Die Einzeltherapie ist jedoch giftiger und weniger verträglich als NECT, da eine höhere Dosis Eflornithin verwendet wird.<sup>[15,6]</sup> Nifurtimox, ein Nitrofurant (Abbildung 1-1f), wird durch die Nitroreduktase 1 im Parasiten zu reaktiven und giftigen Aminen reduziert.<sup>[16,17]</sup> Fexinidazol Winthrop, kurz Fexinidazol, ein 5-Nitroimidazol-Derivat (Abbildung 1-1c), steht seit 2018 kurz vor der Zulassung für die Therapie gegen *T. b. gambiense* und kann im Gegensatz zu den bisherigen Therapieformen oral verabreicht werden.<sup>[18,19]</sup> Fexinidazol aktiviert analog zu Nifurtimox voraussichtlich Nitroreduktase-Enzyme im Parasiten, welche reaktive Amine herstellen und somit indirekt giftige und mutagene Auswirkungen haben.<sup>[20]</sup> Das Medikament ist eine „Pro-Drug“, welche durch verschiedene Cytochrom P450-Enzyme zu Sulfoxid oder Sulfon metabolisiert wird. Diese Metaboliten sowie Fexinidazol selbst können die Blut-Hirn-Schranke passieren und sind daher wirksam gegen beide Stadien der Erkrankung.<sup>[18]</sup> Die Rate erfolgreich therapierter Patienten, 18 Monate nach dem Ende der Therapie mit Fexinidazol, liegt bei 91,2%. NECT hat eine 6,42% höhere Erfolgsquote als Fexinidazol,<sup>[20]</sup> allerdings ist die orale Gabe mit Fexinidazol, ohne den bei NECT erforderlichen Krankenhausaufenthalt vor allem in ländlichen Regionen, ein großer Vorteil.

Obwohl die Maßnahmen der WHO zur Eindämmung der afrikanischen Schlafkrankheit erfolgreich sind und die gemeldeten Infektionszahlen sinken, besteht ein großer Bedarf an neuen Arzneistoffen gegen die afrikanische Schlafkrankheit, da die verfügbaren Chemotherapeutika teilweise massive bis tödliche Nebenwirkungen aufweisen und die Resistenzen in den Trypanosomen gegen die Arzneistoffe zunehmen. Die Entwicklung neuer Arzneistoffe gründet sich auf Naturstoffe und gezielte Entwicklung von Inhibitoren gegen essenzielle Proteine im Parasiten, die im Menschen nicht vorkommen oder deren Homologe sich ausreichend unterscheiden, wie z. B. die Oxidoreduktase Tryparedoxin<sup>[21]</sup> oder die Cystein-Protease Rhodesain.<sup>[22,23]</sup>

## 1.2 Zelluläre Besonderheiten von *Trypanosoma brucei*

Trypanosomen sind flagellierte Protozoen. Die einzelligen Parasiten gehören der Klasse der Kinetoplastea an, die einige morphologische, biochemische und metabolische Besonderheiten im Vergleich zu anderen eukaryotischen Zellen aufweisen. Der Name der Klassifizierung ist auf ein außergewöhnliches Zellkompartiment, den Kinetoplasten, zurückzuführen. Der Kinetoplast ist Teil des Mitochondriums und befindet sich am Basalkörper des Flagellum (Abbildung 1-2).<sup>[24]</sup> Der Kinetoplast wird aus der mitochondrialen Membran gebildet, die ein Netzwerk aus DNA-Ringen, den Mini- und Maxi-Kreisen, umschließt.<sup>[25]</sup> Die Maxi-Kreise codieren für einige mitochondriale Enzyme. Durch die Transkription der Mini-Kreise entstehen „Leit-RNAs“ (engl. *guide-RNAs*), die mit Hilfe von Editosomen zu einer Editierung der transkribierten mRNA von Maxi-Kreisen führen. Die editierte mRNA wird anschließend translatiert.<sup>[26]</sup> *T. brucei* haben im Zellkern ein diploides Genom, welches aus elf Chromosomen und zusätzlich ~100 Mini-Chromosomen besteht.<sup>[27]</sup> Die Genexpression verläuft polycystronisch durch die RNA-Polymerase II und führt zu Transkriptions-Einheiten die über 100 kb lang sein können. Die mRNA wird durch *trans*-Splicing und Polyadenylierung prozessiert.<sup>[28]</sup>

Der Geißelursprung des Flagellums bildet eine Einstülpung der Zellmembran, die Flagellartasche (Abbildung 1-2). Diese liegt am posterioren Ende des Parasiten, während das Flagellum anterior freibeweglich über den Zellkörper hinausragt und die Bewegungsrichtung angibt. In der

Flagellartasche sind alle endozytotischen Prozesse lokalisiert. Der spindelförmige Zellkörper wird durch ein Zytoskelett aus Mikrotubuli gestützt.<sup>[29]</sup>

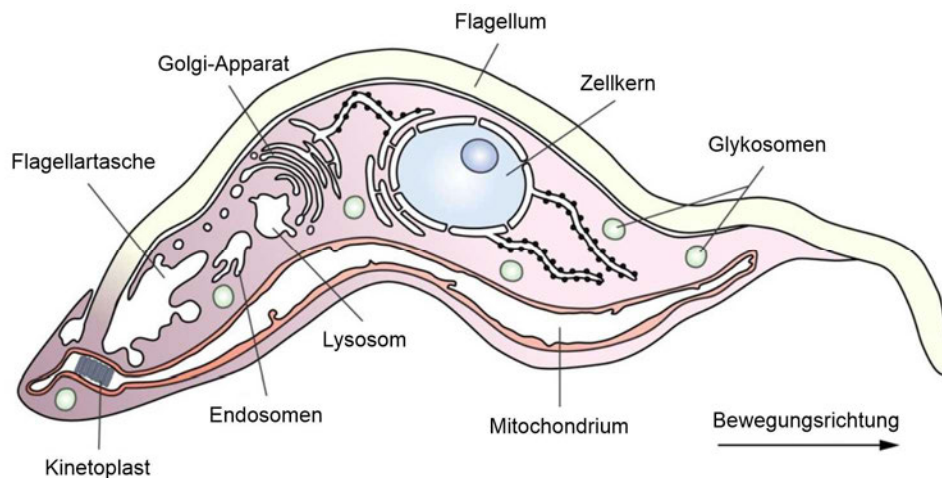


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung einer *T. brucei* Blutstrom-Zelle. Besonderheiten der Zellmorphologie sind zum Beispiel Zellkompartimente, die nur einmal pro Zelle vorkommen wie Lysosom und Mitochondrium.<sup>[24]</sup>

Trypanosomen vom Typ *T. brucei* sind im Säugetier-Wirt vollständig von einer dichten Proteinhülle aus Glykoproteinen (engl. *variant surface glycoprotein*, VSG) auf ihrer Zelloberfläche umgeben. Diese sind mit einem Glycosylphosphatidylinositol- (GPI-) Anker in der Zellmembran verankert. Sie schirmen die Oberfläche des Parasiten vor dem Immunsystem des Wirts ab und verhindern so die Produktion von Antikörpern gegen andere Oberflächenproteine von *T. brucei*.<sup>[30]</sup> VSGs haben eine immunogene Wirkung auf den Wirt. Der Parasit besitzt bis zu 2000 VSG-Gene und Genfragmente, welche ihm eine hohe Antigenvariation ermöglichen.<sup>[31]</sup> Allerdings exprimiert eine trypanosomale Zelle zu einem Zeitpunkt nur einen VSG-Typ. Innerhalb von 12 min kann eine VSG-Population gegen eine andere ausgetauscht und die Glykoproteine mit möglicherweise gebundenen Antikörpern endozytiert werden.<sup>[32]</sup> Durch den periodischen Wechsel des VSG-Typs kann der Parasit dem adaptiven Immunsystem des Wirts entgehen. Aufgrund dessen schlägt die Entwicklung von Impfstoffen gegen *T. brucei* fehl. In der Tsetse-Fliege wechseln die Trypanosomen ihre VSG-Hülle gegen Procycline, eine andere Art GPI-verankerter Proteine. In der Tsetse-Fliege werden die Procycline nicht zum Schutz des Parasiten vor dem Immunsystem benötigt, sondern um die Oberfläche des Parasiten vor Abbauenzymen im Darm der Fliege zu schützen.<sup>[33]</sup> Die Zellhülle wird aus zwei Arten an Procyclinen aufgebaut: i) EP-Procycline, welche eine Wiederholung des initialen Glu-Pro-Dipeptids aufweisen und ii) GPEET-Procycline, welche aus dem sich wiederholenden Pentapeptid Gly-Pro-Glu-Glu-Thr bestehen.<sup>[33,34]</sup>

Im Gegensatz zu anderen eukaryotischen Zellen ist ein Großteil der Glykolyse-Enzyme in Organellen, den Glykosomen lokalisiert.<sup>[26,35]</sup> Eine weitere Besonderheit in Trypanosomen sind die nur einmal pro Zelle vorkommenden Zellkompartimente, wie das Lysosom und das Mitochondrium (Abbildung 1-2). Der Parasit passt seinen Stoffwechsel dem Nährstoffangebot im Wirt an (siehe Kapitel 1.3). Je nach Stoffwechsel verändert sich die Morphologie des Mitochondriums: i) im Wirbeltier-Wirt findet keine oxidative Phosphorylierung statt, daher ist das Mitochondrium schmal und Cristae-arm; ii) in der Tsetse-Fliege ist die Atmungskette vollständig ausgebildet und das Mitochondrium ist raumerfüllend und Cristae-reich.<sup>[36,37]</sup>

### 1.3 Der Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei*

*Trypanosoma brucei* ssp. sind obligate Parasiten, die sowohl in ihrem Vektororganismus, der Tsetse-Fliege, als auch im Säugetier-Wirt extrazellulär leben. Der Lebenszyklus von *T. brucei* ist sehr komplex und verlangt eine große Anpassungsfähigkeit, um auf die verschiedenen Bedingungen in der Tsetse-Fliege und dem Wirbeltier-Wirt zu reagieren. Der Parasit durchläuft verschiedene Stadien, deren Einteilung auf der Morphologie des Parasiten, insbesondere auf der Lage des Geißelursprung des Flagellum zum Nukleus, beruht (Abbildung 1-3).<sup>[29]</sup>

Durch den Stich einer infizierten Tsetse-Fliege gelangen die Trypanosomen in der metazyklischen Form in einen Säugetier-Wirt (Abbildung 1-3F). Die Parasiten entwickeln sich im Wirt in die schlanke (engl. *long slender*) Form und replizieren in Blut, Lymphe und Interstitialraum (Abbildung 1-3A).<sup>[38]</sup> Die Trypanosomen vermehren sich durch die ungeschlechtliche Zweiteilung (binäre Fission).<sup>[26]</sup> Die Hauptnährstoffquelle stellt in diesem Stadium Glukose dar, welche durch Glykolyse zu Pyruvat metabolisiert wird.<sup>[39]</sup> Die *long slender* Form kann in der Zellkultur als monomorphe Form kultiviert werden (Blutstrom-Zellen, BS-Zellen). Nimmt die Dichte der Parasiten im Wirtsorganismus zu, wird durch *Quorum Sensing* die Transformation in das stagnierende Stadium eingeleitet, das sich durch eine kurze gedrungene (engl. *short stumpy*) Morphologie auszeichnet (Abbildung 1-3C).<sup>[40-42]</sup> Nach der Aufnahme des Blutes eines infizierten Säugetiers erreichen die Trypanosomen in der *short stumpy*-Form den Mitteldarm der Tsetse-Fliege und entwickeln sich weiter zur prozyklischen Form (Abbildung 1-3D). Parasiten, die im *long slender*-Entwicklungsstadium den Darm der Fliege passieren, sterben.<sup>[43]</sup> In der prozyklischen Form ersetzt der Parasit seine Hülle aus VSG gegen Procycline.<sup>[44]</sup> In diesem Stadium teilt sich der Parasit. Die prozyklische *T. brucei*-Form kann in der Zellkultur in Passage gehalten werden (prozyklische Zellen, PC-Zellen). Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von Glukose in der Fliege bezieht der Parasit vorrangig Energie aus dem Metabolisieren von Prolin zu Alanin und der oxidativen Phosphorylierung.<sup>[26,39]</sup> Die prozyklischen Zellen wandern in der Fliege in den Proventriculus, den Vormagen des Insekts, und differenzieren sich dort durch asymmetrische Zellteilung zu kurzen und langen epimastigoten Zellen (Abbildung 1-3E).<sup>[43]</sup> Diese Zellform unterscheidet sich drastisch von den anderen Stadien. Das lange Flagellum ist nicht an die Zelle angelegt und der Geißelursprung liegt anterior zum Zellkern. Kurze epimastigote Trypanosomen lagern sich nach dem Erreichen der

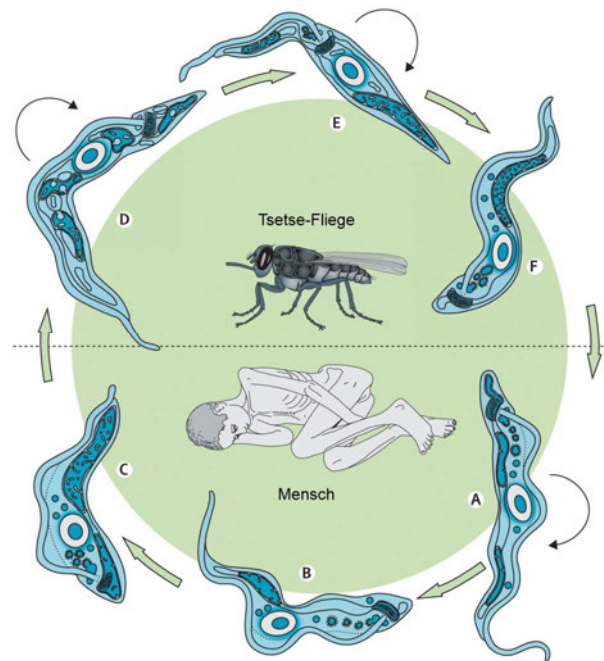


Abbildung 1-3 Der Lebenszyklus von *T. brucei*. Der Trypanosomatid wird durch den Stich einer infizierten Tsetse-Fliege auf den Menschen übertragen. Im Wirt durchläuft der Parasit mehrere Lebenszyklusstadien, die nach der Morphologie eingeteilt werden können: (A) die sich teilende *long slender*-Form; (B) eine Zwischenstufe (*intermediate*-Form) und (C) die *short stumpy*-Form. Innerhalb des Vektors durchläuft der Parasit ebenfalls unterschiedliche Stadien: (D) die sich teilende prozyklische Form; (E) die epimastigote und (F) die metazyklische Form. Schwarze Pfeile kennzeichnen Stadien, in denen sich der Parasit teilt. Modifiziert nach Brun et al., 2010.<sup>[45]</sup>

Die prozyklische *T. brucei*-Form kann in der Zellkultur in Passage gehalten werden (prozyklische Zellen, PC-Zellen). Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von Glukose in der Fliege bezieht der Parasit vorrangig Energie aus dem Metabolisieren von Prolin zu Alanin und der oxidativen Phosphorylierung.<sup>[26,39]</sup> Die prozyklischen Zellen wandern in der Fliege in den Proventriculus, den Vormagen des Insekts, und differenzieren sich dort durch asymmetrische Zellteilung zu kurzen und langen epimastigoten Zellen (Abbildung 1-3E).<sup>[43]</sup> Diese Zellform unterscheidet sich drastisch von den anderen Stadien. Das lange Flagellum ist nicht an die Zelle angelegt und der Geißelursprung liegt anterior zum Zellkern. Kurze epimastigote Trypanosomen lagern sich nach dem Erreichen der

Speicheldrüse der Fliege am Epithelium an.<sup>[38]</sup> Aus diesem Stadium entwickelt sich die metazyklische *T. brucei*-Form, welche infektiös für einen Säugetier-Wirt ist.<sup>[45]</sup> Reife metazyklische Zellen haben eine ausgebildete VSG-Hülle und liegen frei in der Speicheldrüse des Vektors vor (Abbildung 1-3F).<sup>[46]</sup> In diesem Stadium teilt sich *T. brucei* nicht und gelangt beim nächsten Stich der Fliege in einen Wirbeltier-Wirt.

## 1.4 Der Trypanothion-basierte Redox-Metabolismus in *T. brucei*

Trypanosomatide leben wie Säugetier- und Hefe-Zellen in einer aeroben Umgebung. Durch zelluläre Prozesse wie z. B. enzymatische Oxidationen oder aerobe Zellatmung kann es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) kommen. Findet keine Entgiftung statt, schädigen ROS unterschiedliche Zellkompartimente und können zum Zelltod führen. In den meisten eukaryotischen Zellen erfolgt die Entgiftung von ROS weitgehend durch die Thiol-basierten Redox-Systeme Glutathion (GSH)/Glutathion-Reduktase (GR) (Abbildung 1-4a) und Thioredoxin (Trx)/Thioredoxin-Reduktase (TrxR) (Abbildung 1-4b).<sup>[47,48]</sup>

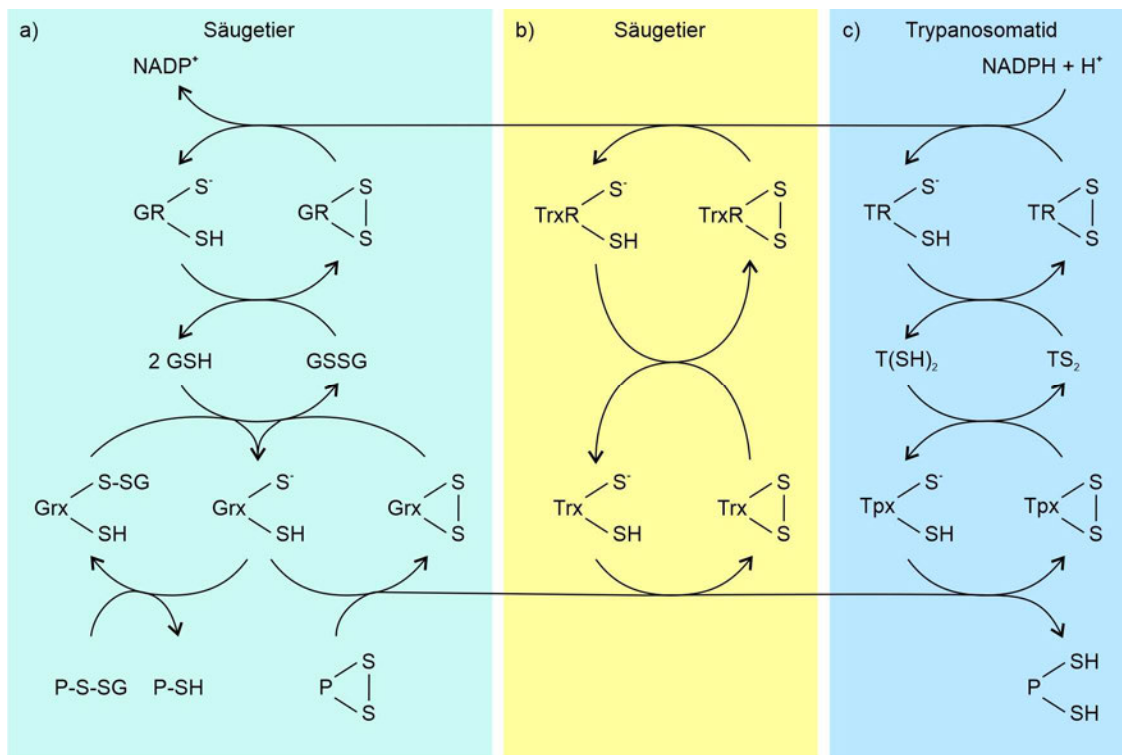


Abbildung 1-4 Vergleich der Thiol-basierten Redox-Kaskaden in Säugetieren und Trypanosomatiden. Säugetiere nutzen (a) Glutathion (GSH)/Glutathion-Reduktase (GR) und (b) Thioredoxin (Trx)/Thioredoxin-Reduktase (TrxR) während in Trypanosomatiden (c) Trypanothion (T(SH)<sub>2</sub>)/Trypanothion-Reduktase (TR) Systeme vorkommen. In allen gezeigten System ist NADPH der Elektronendonator. (a) Die NADPH-abhängige GR reduziert Glutathiondisulfid (GSSG) zu GSH, welches die Disulfidbindung von Glutaredoxin (Grx) reduziert. Grx deglutathionyliert Proteine oder reduziert Zielproteine (P). (b) Die durch NADPH reduzierte Thioredoxin-Reduktase (TrxR) überträgt Reduktionsäquivalente auf Thioredoxin (Trx). Dithiol-Trx reduziert im finalen Schritt Disulfid-Proteine (P). (c) Der Elektronenfluss in der parasitären Kaskade erfolgt von NADPH auf die Trypanothion-Reduktase (TR), weiter zum Trypanothion (T(SH)<sub>2</sub>), welches Tryparedoxin (Tpx) reduziert. Reduziertes Tpx überträgt Elektronen auf die Disulfidbindung von verschiedenen Zielproteinen (P). Inspiriert von Hanschmann et al., 2013.<sup>[70]</sup>

Das GSH/GR-System basiert auf zwei Enzymen sowie einem niedermolekularen Thiol (Abbildung 1-4a): Das NADPH-abhängige Flavoprotein GR überträgt Elektronen auf das Tripeptid GSH, L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycin. GSH reduziert die Oxidoreduktase Glutaredoxin (Grx). Reduziertes Grx ist verantwortlich für die Deglutathionylierung von Proteinen und die Reduktion von Disulfidbindungen.<sup>[49]</sup> Das Thioredoxin (Trx)/Thioredoxin-Reduktase (TrxR) System besteht aus dem Flavoenzym TrxR, welches die Elektronen von NADPH auf die Oxidoreduktase Trx überträgt (Abbildung 1-4b). Trx reduziert Disulfidbrücken von zahlreichen Zielproteinen.<sup>[50]</sup> Trypanosomatiden fehlen die Gene sowohl für GR als auch für TrxR.<sup>[51]</sup> Sie haben einen einzigartigen Redox-Metabolismus, der auf Trypanothion (N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(glutathionyl)spermidin; T(SH)<sub>2</sub>, siehe Abbildung 1-5 oben) und der Trypanothion-Reduktase (TR) (Abbildung 1-4c) basiert:<sup>[52-54]</sup>

Die Synthese von T(SH)<sub>2</sub> wird durch die Trypanothion-Synthetase aus zwei Molekülen GSH und Spermidin katalysiert.<sup>[55]</sup> *T. brucei* Zellen synthetisieren GSH *de novo* aus L-Glutamat, L-Cystein und L-Glycin, sowie Spermidin aus Ornithin.<sup>[56]</sup> T(SH)<sub>2</sub> und GSH haben ähnliche Standardredoxpotentiale (Tabelle 1-1), allerdings ist die T(SH)<sub>2</sub>-Oxidation kinetisch günstiger als die GSH-Oxidation, da ein intra- und kein intermolekulares Disulfid gebildet werden muss.<sup>[47]</sup> Der makroskopische pK-Wert von T(SH)<sub>2</sub> beträgt 7,4.<sup>[57]</sup> Er ist ähnlich dem cytosolischen pH-Wert des Parasiten (PC-Zellen pH = 7,22 und BS-Zellen pH = 7,40)<sup>[58,59]</sup> und fördert den Thiol-Disulfid-Austausch. T(SH)<sub>2</sub> ist das vorherrschende niedermolekulare Thiol in *T. brucei*, welches sich in einer drei- bis vierfach höheren Konzentration gegenüber GSH sowohl in prozyklischen als auch in Blutstrom-Zellen zeigt (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1 Eigenschaften von T(SH)<sub>2</sub> und GSH und ihre Konzentrationen in *T. brucei* Zellen.

	<b>T(SH)<sub>2</sub></b>	<b>GSH</b>
<b>Standardredoxpotential E<sup>0</sup></b>	-242 mV <sup>[47]</sup>	-230 mV <sup>[47]</sup>
<b>pK-Wert</b>	7,4 <sup>[57]</sup>	8,7 <sup>[57]</sup>
<b>Konzentration an freiem Thiol in PC-Zellen</b>	521 $\mu$ M <sup>[60]</sup>	134 $\mu$ M <sup>[60]</sup>
<b>Konzentration an freiem Thiol in BS-Zellen</b>	350 $\mu$ M <sup>[61]</sup>	100 $\mu$ M <sup>[61]</sup>

T(SH)<sub>2</sub> wird durch das Flavoprotein TR, einem Homolog der GR und TrxR, in der reduzierten Form gehalten (Abbildung 1-5).<sup>[47,62]</sup> Die Reduktionsäquivalente hierfür stellt NADPH bereit. T(SH)<sub>2</sub> kann in einer spontanen Reaktion GSH, Trx<sup>[63]</sup>, Grx<sup>[64]</sup>, Tryparedoxin (Tpx)<sup>[65]</sup> sowie Dehydroascorbat<sup>[66]</sup> reduzieren.

*T. brucei* exprimieren zwei Grx-Proteine mit zwei Cysteinen im aktiven Zentrum (sogenannte 2-Cys-Grx) und drei Grx-Proteine mit einem Cystein im aktiven Zentrum (1-Cys-Grx). Die beiden 2-Cys-Grx Proteine, Glutaredoxin1 (Grx1) und Glutaredoxin 2 (Grx2), katalysieren die Deglutathionylierung von Proteinen. Grx2 ist essenziell für das Zellwachstum in PC-Zellen.<sup>[64]</sup> Monothiole 1-Cys-Grx Enzyme sind an der Koordinierung von Schwefel-Eisen-Clustern sowie der Aufrechterhaltung des Thiol-basierten Redox-Haushalts beteiligt.<sup>[67,68]</sup> Proteine außer Grx, welche durch T(SH)<sub>2</sub> im reduzierten Zustand gehalten werden, sind Thioredoxine (Trx). Afrikanische Trypanosomen haben zwei Trx-Proteine. Trx1 ist nicht essenziell, weder in BS- noch in PC-Zellen.<sup>[63]</sup> Die Depletion von Trx2 hingegen führt sowohl in BS- als auch in PC-Zellen zu einem Defekt des Zellwachstums. Trx2 hat vermutlich eine Chaperon-Funktion.<sup>[69]</sup> Die Funktionen der Trx- und Grx-Proteine sind größtenteils noch nicht charakterisiert. In Säugetierzellen überträgt sowohl Trx1 als auch Trx2 Elektronen auf eine Vielzahl

von Proteinen, wie z. B. auf die Ribonukleotid-Reduktase für die DNA-Synthese<sup>[70]</sup> oder die Methionin-Sulfoxid-Reduktase<sup>[71]</sup>. Diese Funktion wird in *T. brucei* von der essenziellen Oxidoreduktase Tpx übernommen. Auf die Unterschiede zwischen den Oxidoreduktasen Grx, Trx und Tpx und Tpx im Allgemeinen wird in Kapitel 1.5 näher eingegangen. Tpx und T(SH)<sub>2</sub> bilden ein hoch effizientes Redox-Paar (Abbildung 1-5). Tpx und T(SH)<sub>2</sub> haben ähnliche pK- und E<sup>0</sup>-Werte (Tpx pK = 7,2; E<sup>0</sup> = -249 mV), der Elektronenfluss wird durch das Konzentrationsgefälle von T(SH)<sub>2</sub> zu Tpx getrieben. Die Reduktion von Tpx durch T(SH)<sub>2</sub> ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Kaskade.<sup>[72,73]</sup> Auf der anderen Seite hat Trypanothion-Disulfid (TS<sub>2</sub>) eine inhibitorische Wirkung auf Tpx.<sup>[74]</sup>

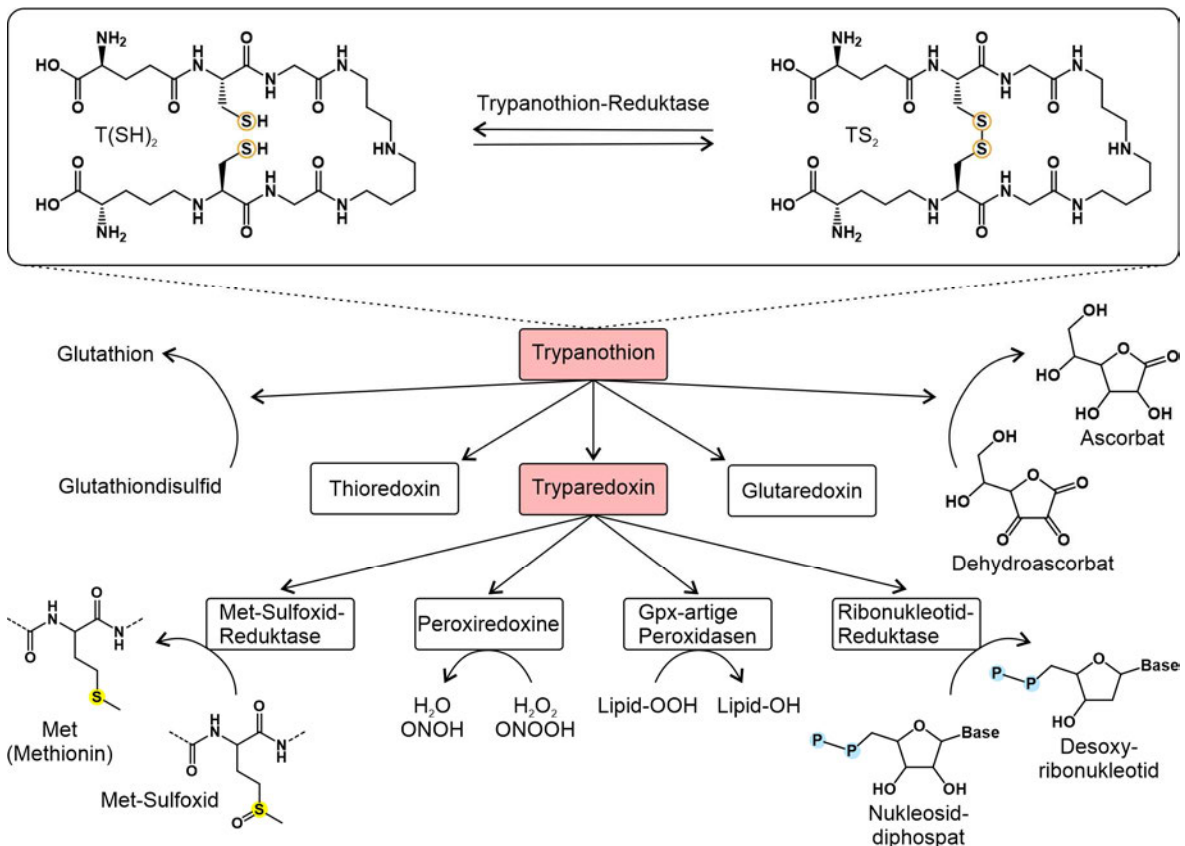


Abbildung 1-5 Schematische Darstellung der T(SH)<sub>2</sub>/TR Kaskade in *T. brucei*. Trypanothion und Tryparedoxin sind das zentrale Redoxpaar der Kaskade (hellrot hinterlegt). Der Elektronenfluss ist durch die Richtung der Pfeile gekennzeichnet. Modifiziert nach Diederich und Krauth-Siegel, 2016.<sup>[24]</sup>

Tpx ist eine „Mehrzweck“-Oxidoreduktase, die Reduktionsäquivalente auf eine Vielzahl von Proteinen überträgt (Abbildung 1-5): i) Peroxiredoxine (Prx) und Gpx-artige Peroxidasen (Px), welche Hydroperoxide, Lipidperoxide und Peroxynitrite entgiften;<sup>[65,75-78]</sup> ii) Ribonukleotid-Reduktase (RR), welche Desoxyribonukleotide für die DNA-Synthese liefert;<sup>[74]</sup> iii) Methionin-Sulfoxid-Reduktase (MSR), die Methioninsulfoxid zu Methionin reduziert.<sup>[79,80]</sup> Die Reduktion der Ribonukleotid-Reduktase kann auch in geringerem Maß durch Trx1 übernommen werden.<sup>[81]</sup>

Die Entgiftung von Wasserstoffperoxiden und anderen Peroxiden in Trypanosomen unterscheidet sich ebenfalls von anderen eukaryotischen Zellen. Diese erfolgt in Säugetierzellen durch Katalase und klassische selenocysteinhaltige Glutathion-Peroxidasen (Gpx). Die Gene für diese Proteine fehlen in Trypanosomatiden.<sup>[53,82]</sup> Die Entgiftung von Peroxiden wird in *T. brucei* von zwei 2-Cys-Peroxiredoxinen (Prx) und drei Gpx-artigen Enzymen (Pxl-III) übernommen (Abbildung 1-5).<sup>[24]</sup> Diese werden durch Tpx reduziert und werden daher unter dem Sammelbegriff Tryparedoxin-abhängige

Peroxidasen (TXNPx) zusammengefasst (Tabelle 1-2). Die Gensequenzen von Pxl-III sind nahezu identisch, mit der Ausnahme, dass PxlIII eine N-terminale mitochondriale Zielsequenz und eine mögliche glykosomale Lokalisationssequenz am C-Terminus trägt.<sup>[78]</sup> Pxl-II sind essenziell in BS-Zellen.<sup>[83,84]</sup> In PC-Zellen ist eine der Gpx-artigen Peroxidasen ausreichend für das Überleben des Parasiten. Fehlen jedoch die Gensequenzen für alle drei Peroxidasen, so sterben die PC-Zellen.<sup>[85]</sup> In Anwesenheit eines Eisen-Komplexbildners wie Deferoxamin oder Trolox, einem Vitamin E-Derivat, ist es möglich Pxl-II defiziente BS-Zellen und Pxl-III defiziente PC-Zellen zu erhalten.<sup>[83-85]</sup>

Die Substratspezifität von PxlIII wurde durch eine kinetische Analyse der Reduktion unterschiedlicher Hydroperoxide bestimmt. Die Analyse erfolgte mittels eines gekoppelten Aktivitätsassays, welcher alle Komponenten der parasitären Entgiftungskaskade sowie rekombinante PxlIII enthielt. Diese reduziert bevorzugt Lipidhydroperoxide, wie Arachidonsäurehydroperoxide oder Linolsäurehydroperoxide. Sie katalysiert allerdings auch effizient die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser.<sup>[84]</sup> Neben den Gpx-artigen Peroxidasen gehören auch Peroxiredoxine (Prx) zu den Tryparedoxin-abhängigen Peroxidasen. Das Genom des Parasiten codiert für drei Prx-Gene, zwei identische zytosolische Prx (cPrx) und eine mitochondriale Variante (mPrx).<sup>[86]</sup> Zytosolisches Prx ist in BS-Zellen essenziell im Gegensatz zu mitochondrialem Prx.<sup>[87]</sup> In PC-Zellen hingegen sind beide Prx-Varianten essenziell.<sup>[88]</sup> Kinetische Analysen der zytosolischen Prx im gekoppelten Aktivitätsassay ergaben, dass cPrx Wasserstoffperoxid sowie strukturell vielfältige Hydroperoxide reduziert, jedoch rasch von Lipidhydroperoxiden inaktiviert wird.<sup>[84,86,89]</sup>

Tabelle 1-2 Zusammenstellung der Eigenschaften der Tryparedoxin-abhängigen Peroxidasen in *T. brucei*.

Tryparedoxin-abhängige Peroxidasen		Lokalisation	Relevanz in BS-Zellen	Relevanz in PC-Zellen	Substrat
Gpx-artige Peroxidasen	PxI	zytosolisch <sup>[78]</sup>	essenziell <sup>[83,84]</sup>	Eines der drei Px-Enzyme ist ausreichend für das Überleben des Parasiten <sup>[85]</sup>	unbekannt
	PxII	zytosolisch <sup>[78]</sup>			unbekannt
	PxlIII	mitochondrial <sup>[78]</sup>	nicht-essenziell <sup>[83]</sup>		Bevorzugt Lipidhydroperoxide <sup>[84]</sup>
Peroxiredoxine	cPrx	zytosolisch <sup>[86]</sup>	essenziell <sup>[87]</sup>	essenziell <sup>[88]</sup>	unbekannt
	mPrx	mitochondrial <sup>[86]</sup>	nicht-essenziell <sup>[87]</sup>	essenziell <sup>[88]</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Hydroperoxide des Cumols, Thymin und tertiärem Butyl <sup>[84,86,89]</sup>

Die parasitäre Thiol-basierte Redox-Kaskade ist aufgrund ihres komplexen Aufbaus die Achilles-Ferse des Parasiten und macht ihn sensitiver gegenüber Peroxiden als Säugetierzellen. Dies zeigt sich auch in der Wirksamkeit der Arzneistoffe Nifurtimox und Fexinidazol gegen *T. brucei* (siehe Kapitel 1.1), welche vermutlich für die Bildung von ROS verantwortlich sind. Die parasitäre Thiol-basierte Redox-Kaskade bietet daher einen ausgezeichneten Ansatzpunkt für neue Arzneistoffe. Verschiedene Studien zur Entwicklung von Inhibitoren gegen TR<sup>[90,91]</sup>, Tpx<sup>[21]</sup> und Enzyme der T(SH)<sub>2</sub>-Biosynthese<sup>[92,93]</sup> wurden bereits durchgeführt.

## 1.5 Tryparedoxin

Tryparedoxin (Tpx) wurde 1997 zum ersten Mal von Nogoceke et al. aus *Crithidia fasciculata*, einem nicht-humanpathogenen Trypanosomatid der Insekten infiziert, isoliert und als Teil der Hydroperoxid-Entgiftungs-Kaskade identifiziert.<sup>[77]</sup> 1998 bestätigten Lüdemann et al. die Existenz von Tpx in *T. brucei* und Tpx wurde der Thioredoxin-Familie zugeordnet.<sup>[65]</sup> Tpx kommt in allen bisher untersuchten Trypanosomatiden vor, wie eine Suche in den Genomen verschiedener Spezies zeigt, siehe z. B. *Bodo saltans* (TriTrypDB BSAL\_26065), *Leishmania infantum* (TriTrypDB LINF\_290017500)<sup>[94]</sup>, *Leishmania major* (TriTrypDB LMJLV39\_290018000)<sup>[95]</sup>, *Leishmania mexicana* (TriTrypDB LmxM.08\_29.1160), *Leptomonas seymouri* (TriTrypDB Lsey\_0083\_0180) oder *Trypanosoma cruzi* (TriTrypDB TcBrA4\_0128650)<sup>[96]</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Tpx aus *T. brucei* untersucht. Die kodierenden Gensequenzen für Tpx sind in *T. brucei brucei* und *T. brucei gambiense* identisch. Es wird vermutet, dass die Tpx-Gensequenzen von *T. brucei rhodesiense* ebenfalls identisch sind, allerdings liegen hierzu keine Informationen vor. Das Genom von *T. brucei* beinhaltet zwei identische Genkopien für zytosolisches Tpx (*T. b. brucei*: TriTrypDB Tb927.3.3780, Tb927.3.3760; *T. b. gambiense*: Tbg972.3.4110, Tbg972.3.4070)<sup>[86]</sup> und eine Genkopie für ein mitochondriales Tpx (*T. b. brucei*: TriTrypDB Tb927.3.5090; *T. b. gambiense*: Tbg972.3.5720).<sup>[51]</sup> Die Gensequenz des mitochondrialen Tpx beinhaltet keine Zielsequenz für das Mitochondrium, allerdings eine mutmaßliche Transmembrandomäne am C-Terminus. Expressionsstudien lassen vermuten, dass das Protein über diese Domäne in der Mitochondrienmembran verankert ist.<sup>[97]</sup> Nachfolgend wird in dieser Arbeit ausschließlich das zytosolische Tpx betrachtet.

Die Konzentrationen von Tpx betragen 7 – 34  $\mu\text{M}$  in PC-Zellen und 50  $\mu\text{M}$  in der frühen bis 100  $\mu\text{M}$  in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase in BS-Zellen.<sup>[98]</sup> In *C. fasciculata* erreicht die zelluläre Tpx-Konzentration 3 - 5% des löslichen Gesamtproteins.<sup>[77]</sup> Tpx ist in *T. brucei* essenziell und eine Depletion durch RNA-Interferenz in BS-Zellen führt zu einem Wachstumsdefekt der Zellen sowie einer erhöhten Sensitivität gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>[98]</sup> Die Effekte des Tpx-Defizits sind auf die fehlende Reduktion der RR, Teil der DNA-Biosynthese, und der Px/Prx, welche verantwortlich für die Peroxid-Entgiftung sind, zurückzuführen (Abbildung 1-5). Des Weiteren sind in Tpx-defizienten Zellen die GSH,  $\text{T}(\text{SH})_2$  und Glutathionylspermidin- (Gsp-) Konzentrationen signifikant erhöht. Die Zelle versucht durch die erhöhten Level an leichten Mono- und Dithiolen das Tpx-Defizit auszugleichen.<sup>[98]</sup> Wie oben aufgeführt haben Tpx und  $\text{T}(\text{SH})_2$  ähnliche Standardredoxpotentiale sowie pK-Werte. So kann beispielsweise RR auch direkt durch  $\text{T}(\text{SH})_2$  reduziert werden ( $K_m$   $2,1 \pm 0,4$  mM;  $V_{\max}$   $9,6$  nmol  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$ ), allerdings ist die durch Tpx katalysierte Reduktion effizienter ( $K_m$   $3,7 \pm 0,5$   $\mu\text{M}$ ;  $V_{\max}$   $24$  nmol  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$  für Tpx).<sup>[74]</sup>

<i>Tb_Tpx</i>	MSGLAKYLPGATNLLSKSGEVSLSGLVGVKTVFLYFSASWCPPCRGFTPVLAEFYEKHHVA	60
<i>Hs_Grx</i>	-----MAQEFVNCKIQPGKVVVFIKPTCPYCRRAQEILSQLPIKQGLL	43
<i>Hs_Trx</i>	---MVKQIESKTA-----FQEALDAAGDKLVVDFSATWCGPCCKMIKPFHSLSEKYSNV	52
	:    :..            .: *    *    *:    .: .:    *	
<i>Tb_Tpx</i>	KNFEVVLISWDENESDFHDYYGKMPWL---ALPFDQRSTVSELGKTFGVESIPTLITINA	117
<i>Hs_Grx</i>	EFVDITATN---HTNEIQDYLQQLTGARTVPRVFIGKDCIGGCSDLVSLQQSGELLTRLK	100
<i>Hs_Trx</i>	IFLEVDVDDCQDVASECE--VKCMPTF---QF-FKKGQK---VGEFSGANKEKLEATIN-	102
	.: :    .            .: .            :            *            .            ..    .:    *	
<i>Tb_Tpx</i>	DTGAIIGTQARTRVIEDPDGANFPWPN	144
<i>Hs_Grx</i>	QIGALQ-----	106
<i>Hs_Trx</i>	---ELV-----	105
	:	

Abbildung 1-6 Sequenzalignment von Tryparedoxin aus *T. brucei*, humanem Thioredoxin und humanem Glutaredoxin durchgeführt mit Clustal Omega. *Tb\_Tpx*: *T. brucei* Tryparedoxin (UniProt: O77404); *Hs\_Trx*: *Homo sapiens* Thioredoxin1 (TXN1) (UniProt: P10599); *Hs\_Grx*: *Homo sapiens* Glutaredoxin1 (GLRX1) (UniProt: P35754); Stern: über alle Alignments konservierte Aminosäure; Doppelpunkt: Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften; Punkt: Aminosäuren mit schwach ähnlichen Eigenschaften. (rot: Cysteinreste des aktiven Zentrums)

Tpx ist ein Dithiol-Protein mit einem Molekulargewicht von 16 kDa, dessen Primärstruktur in *T. brucei* 144 Aminosäuren umfasst. Es ist somit deutlich größer als das klassische 12 kDa-Trx. Das CXXC-Motiv des aktiven Zentrums von Tpx (WC<sup>40</sup>PPC<sup>43</sup>)<sup>[65,72]</sup> ist in vielen Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen, wie in Trx (CGPC)<sup>[99,100]</sup> und in Grx (CPYC)<sup>[101,102]</sup> zu finden.<sup>[103]</sup> Tpx weist eine Ähnlichkeit der Proteinsequenz von 29,1% zu humanem Trx1 und 27,2% zu humanem Grx1 auf (siehe Abbildung 1-6). Die Reaktivitäten von Oxidoreduktasen der Trx-Familie werden durch den pK-Wert des ersten Cysteinrests des CXXC-Motivs und das Redoxpotential bestimmt (Abbildung 1-8). Dieser erste katalytische Cysteinrest hat einen niedrigen pK-Wert, da es am Ende einer  $\alpha$ -Helix positioniert ist und die positive Teilladung des Helix-Dipols das Thiolat-Anion stabilisiert.<sup>[104]</sup> Dies trifft auch auf Cys40 in Tpx zu, wo das rechtshändige redox-aktive Disulfid am N-Terminus der  $\alpha$ 1-Helix lokalisiert ist (pK-Wert 7,2).<sup>[105]</sup> Cys40 ist dem Lösungsmittel ausgesetzt, während das zweite Cystein des aktiven Zentrums, Cys43, im Protein verborgen ist.<sup>[106]</sup> Es erscheint, dass Sy von Cys43 in einem Netzwerk von Wasserstoffbrücken gebildet aus Tyr34, Ser36, Thr47 und Tyr80 eingebettet ist.<sup>[106,107]</sup> Cys40 ist daher der katalytische Rest, welcher mit T(SH)<sub>2</sub><sup>[107]</sup> sowie z. B. Px<sup>[108]</sup> interagiert. Tpx nimmt in der T(SH)<sub>2</sub>/TR-Kaskade vier Zustände an (Abbildung 1-7): 1) Tpx ist oxidiert und die intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cys40 und Cys43 ist ausgebildet; 2) T(SH)<sub>2</sub> interagiert mit Tpx und Tpx liegt im T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand vor; 3) die Cysteinreste liegen als freie Thiolgruppen vor; 4) Cys40 in Tpx bildet eine intermolekulare Disulfidbindung mit einem Zielprotein.

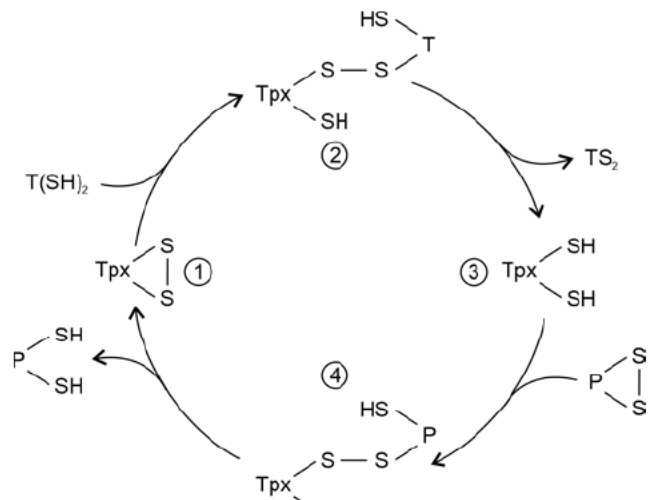


Abbildung 1-7 Kreislauf der Tpx-Formen in der T(SH)<sub>2</sub>/TR Kaskade. Zur Beschreibung siehe Haupttext. P = Zielprotein; Tpx = Tryparedoxin; T(SH)<sub>2</sub> = Trypanothion; TS<sub>2</sub> = Trypanothiondisulfid.

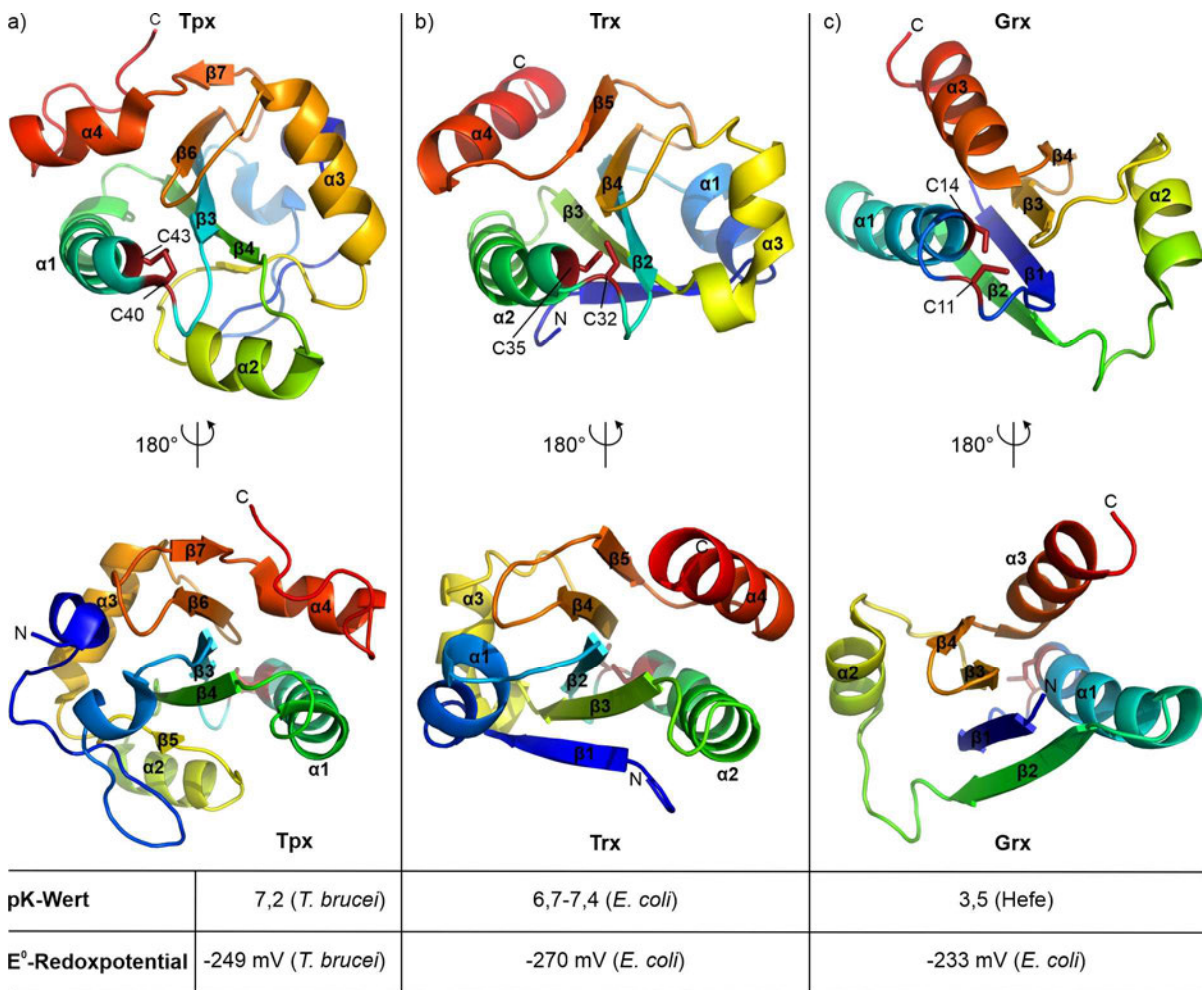


Abbildung 1-8 Übersicht der Kristallstrukturen und katalytischen Eigenschaften von (a) *T. brucei* Tryparedoxin (Tpx, PDB 1o73), (b) *E. coli* Thioredoxin (Trx, PDB 1xob) und (c) *E. coli* Glutaredoxin (Grx, PDB 1grx). Die katalytischen Eigenschaften von Tpx, wie pK-Wert und E°-Redoxpotential, liegen zwischen den ermittelten Werten für Trx und Grx.<sup>[104]</sup> Die Strukturen sind vom N-Terminus zum C-Terminus von blau zu rot in Regenbogen-Farben gezeigt und die Cysteine des aktiven Zentrums als dunkelrote Stäbchen hervorgehoben. Es sind die Sekundärstruktur-Elemente angeben.

Es sind fünfzehn Kristall- und eine Kernspinresonanz- (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR-) Struktur von Tpx aus *C. fasciculata*, *L. major* und *T. brucei* in der oxidierten, reduzierten, strahlungsinduziert-reduzierten Form oder im Komplex mit einem T(SH)<sub>2</sub>-Derivat verfügbar (Tabelle 1-3). Es wurde eine Überlagerung jeder verfügbaren Tpx-Struktur mit der Tpx-Struktur aus *T. brucei* (PDB 1o73) durchgeführt und RMSD-Werte von 0,412 Å bis 1,324 Å erhalten (Tabelle 1-3). Die geringen Unterschiede zwischen der *Tb*Tpx-Struktur und den Strukturen aus *C. fasciculata* und *L. major*, verdeutlicht durch die Überlagerungen der Tpx-Strukturen in Abbildung 1-9, zeigen eine speziesübergreifende große strukturelle Ähnlichkeit. Die Struktur von Tpx ist der Trx-Faltung zuzuordnen (Abbildung 1-8). Die Grundstruktur besteht aus einem gedrehten fünf-strängigem  $\beta$ -Faltblatt, das von vier  $\alpha$ -Helices umgeben ist.<sup>[105,107]</sup> Der Kern von Tpx wird vor allem durch aromatische Tyrosin-, Tryptophan- und Phenylalaninreste gebildet. Es wurde eine enge strukturelle Verwandtschaft zwischen dem Kern von *C. fasciculata* TpxI und *E. coli* Trx beobachtet. Die Orientierung der  $\beta$ -Stränge  $\beta_5$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_6$  und  $\beta_7$  von TpxI entsprechen der Ausrichtung von  $\beta_1$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_4$  und  $\beta_5$  in Trx.<sup>[105]</sup> Ebenfalls ist eine Überlagerung der  $\alpha_1$ -Helix in TpxI mit der  $\alpha_2$ -Helix in humanem Trx über die gesamte Länge von fünf Windungen möglich. Dies trifft auch auf die C-

terminale Windung der  $\alpha$ 3-Helix beider Proteine zu.<sup>[105]</sup> Allerdings kommt die  $\alpha$ 2-Helix in Tpx nicht in Trx vor. Die  $\alpha$ 2-Helix in Tpx besteht aus vielen sauren Aminosäuren (<sup>71</sup>DENESD<sup>76</sup> in *T. brucei* Tpx), und grenzt an den „Tryptophan-Deckel“, gebildet aus Trp39 und Trp70 (Abbildung 4-8).<sup>[105,106]</sup> Die beiden Tryptophane bilden eine flache Abdeckung über den Cysteinresten des aktiven Zentrums. Allerdings unterscheiden sich die Kristallstruktur von *T. brucei* Tpx an diesem Punkt dramatisch von den Tpx-Strukturen aus *C. fasciculata* und *L. major*. So ist die Indol-Seitenkette von Trp39 in der Kristallstruktur von *T. brucei* Tpx nicht über dem aktiven Zentrum orientiert, sondern dem Protein abgewandt und bildet einen Kristallkontakt zur nächsten Kette (Abbildung 1-10a). Alphey et al. postulierten, dass es sich um eine mögliche Konformation zur Interaktion mit Zielproteinen handelt.<sup>[106]</sup> Da diese Orientierung der Trp39-Seitenkette in keiner weiteren Kristallstruktur sowie der in Lösung aufgenommenen NMR-Struktur zu finden ist, handelt es sich allerdings vermutlich um ein Kristallisationsartefakt.

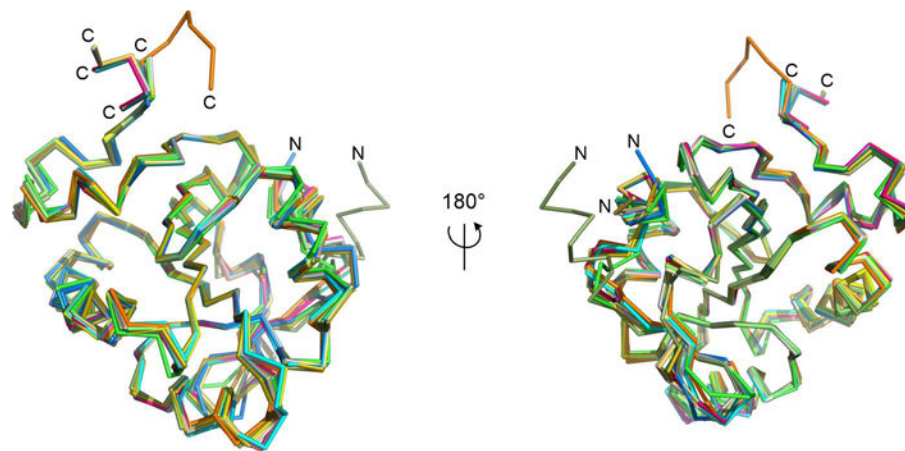


Abbildung 1-9 Überlagerung der verfügbaren Tpx-Strukturen aus *C. fasciculata* (PDB 1qk8, 1o7u, 1o85, 1o8x, 1o8w, 1ezk, 1ewx, 1oc9, 1o6j, 1o81, 1oc8, 1fga, 1i5g), *L. major* (3s9f) und *T. brucei* (PDB 1o73). Es sind die in Tabelle 1-3 aufgelisteten Strukturen, ausgenommen PDB 1okd, zur *T. brucei* Tpx-Struktur (PDB 1o73) koordiniert. Die Ausrichtung entspricht der Orientierung von Tpx in Abbildung 1-8a.

Für die strukturelle Aufklärung des katalytischen Mechanismus von Tpx wurde neben dem oxidierten Zustand auch der reduzierte Zustand untersucht. So existiert eine Kristallstruktur von Tpx aus *C. fasciculata* im reduzierten Zustand. Jedoch handelt es sich um eine heterogene Einzelzelle im Kristall, die in der Kette A oxidiert und Kette B reduziert vorliegt (Abbildung 1-10b).<sup>[107]</sup> Ein Unterschied zwischen den Ketten ist die Vergrößerung des Abstands der  $S\gamma$  zwischen Cys41 und Cys44 (entspricht Cys40 und Cys43 in *TbTpx*) von 2,5 Å in der oxidierten Kette zu 3,9 Å in der reduzierten Kette. Des Weiteren verringert sich der Abstand zwischen Cys44 und Ser37 um 0,4 Å. Weitere Veränderungen wie die Torsionswinkel des Proteinrückgrats von Cys41 und der Seitenkette von Cys44 sowie Trp40 sind vernachlässigbar.<sup>[107]</sup> Die geringen Veränderungen und die heterogene Einzelzelle führen jedoch zu der Frage, ob der reduzierte Zustand der Kette B im Kristall den realen reduzierten Zustand von Tpx in Lösung widerspiegelt. Ein weiteres Vorgehen zur strukturellen Aufklärung des reduzierten Zustands von Tpx stellte die strahlungsinduzierte Reduktion der Disulfidbindung dar.<sup>[106,109]</sup> Der Unterschied zwischen der oxidierten Struktur und strahlungsinduziert-reduzierten Strukturen beschränkt sich allerdings auf das Fehlen der Disulfidbindung. Der Abstand zwischen  $S\gamma$  von Cys40 und Cys43 vergrößert sich von 2,1 Å auf 2,8 Å.

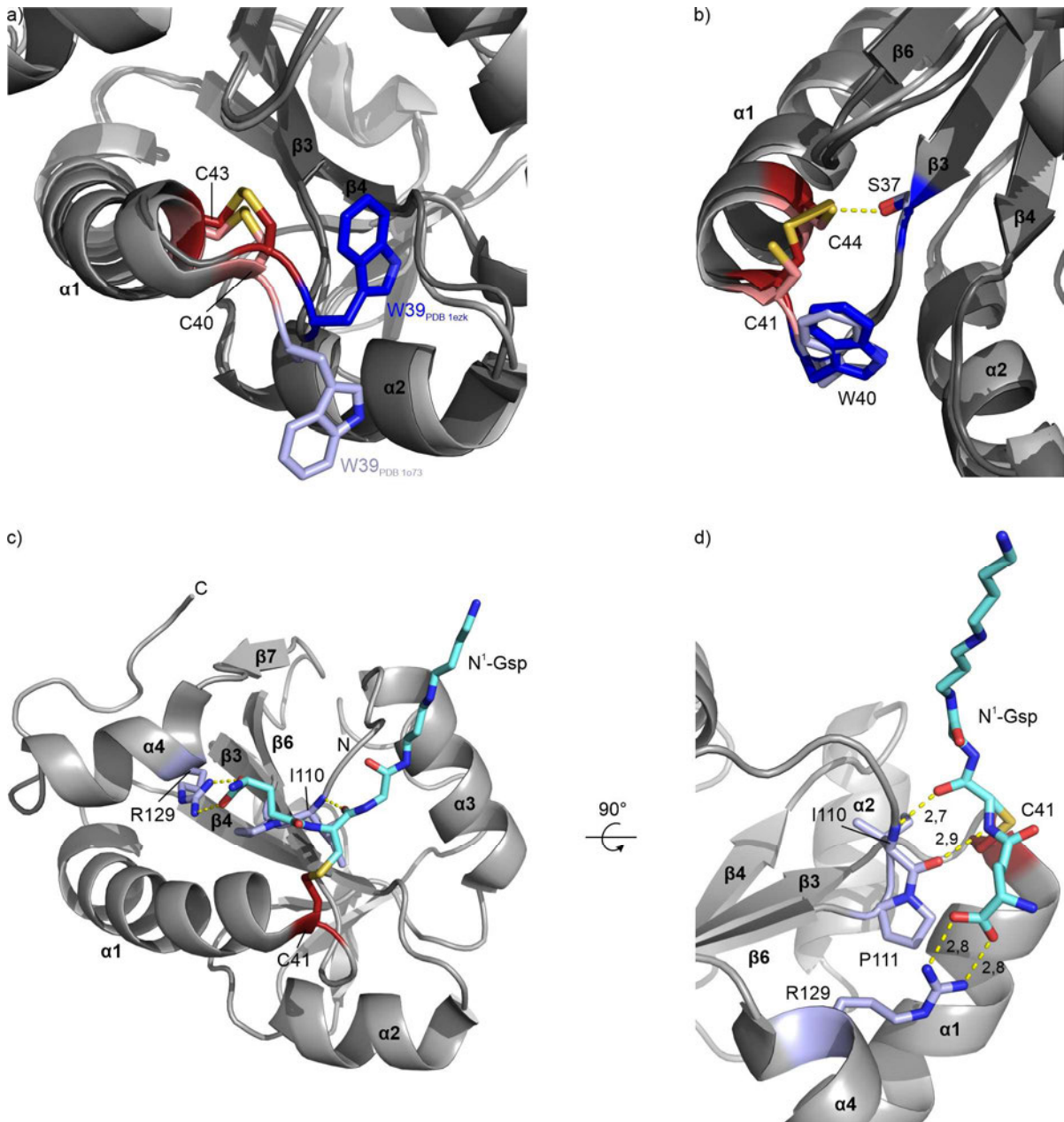


Abbildung 1-10 Strukturelle Besonderheiten einzelner Tpx-Kristallstrukturen. (a) Die Überlagerung der Struktur von Tpx aus *T. brucei* (PDB 1o73; hellgrau) und TpxI aus *C. fasciculata* (PDB 1ezk; dunkelgrau) zeigt die unterschiedliche Orientierung der Trp39-Seitenkette in den Kristallstrukturen. Die Indol-Seitenkette ist in der *TbTpx*-Struktur (hellblau) vom Protein abgewandt und in der *CfTpx*-Struktur (blau) über dem aktiven Zentrum orientiert. Die Orientierung der Trp39-Seitenkette in *CfTpx* (PDB 1ezk) ist repräsentativ für alle verfügbaren Tpx-Strukturen. Cys40 und Cys43 sind als rote Stäbchen dargestellt. (b) Überlagerung der Kette A, oxidiert (dunkelgrau), und Kette B, reduziert (hellgrau), der *C. fasciculata* Tpx-Kristallstruktur (PDB 1fg4). Die Strukturen unterscheiden sich z. B. in einem größeren Abstand zwischen  $S\gamma$  von Cys41 und Cys44 in der reduzierten Kette als in der oxidierten Kette. Weitere Unterschiede sind dem Haupttext zu entnehmen. (c) und (d) zeigen die Kristallstruktur der *C. fasciculata* TryparedoxinII-Cys44Ser-Mutante im Komplex mit  $N^1$ -Glutathionylspermidin ( $N^1$ -Gsp; PDB 1i5g). Als Stäbchen sind Aminosäuren hervorgehoben, die Kontaktpunkte mit  $N^1$ -Gsp (cyan) darstellen, Ille110, Pro111 und Arg129 in hellblau sowie Cys41 in rot. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gelb gestrichelte Linien dargestellt und die Abstände sind in Å angegeben. Farbcodierung der Nicht-Kohlenstoff-Atome: gelb: Schwefel; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff.

Ein weiterer Zustand des katalytischen Zyklus von Tpx ist die Trypanothion-gebundene Form. Es wurde gezeigt, dass die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion der Elektronenübertragung von GSH auf Tpx im gekoppelten Aktivitätsassay drei Größenordnungen langsamer ist als die äquivalente Reaktion von T(SH)<sub>2</sub> mit Tpx.<sup>[72]</sup> Aufgrund der ähnlichen pK-Werte und Standardredoxpotentiale E<sup>0</sup> von GSH und T(SH)<sub>2</sub> (siehe Tabelle 1-1) ist die Begründung für diesen enormen Unterschied der Geschwindigkeitskonstanten nicht auf die katalytischen Eigenschaften der leichten Thiole zurückzuführen. Der bevorzugte Elektronentransfer von T(SH)<sub>2</sub> auf Tpx könnte strukturelle Gründe haben. Eine Kristallstruktur von Tpx im Komplex mit T(SH)<sub>2</sub> zu erhalten war bislang nicht möglich. Es gelang allerdings eine Kristallstruktur einer Tpx-Cys44Ser-Mutante (TpxII) aus *C. fasciculata* im Komplex mit einem *Dead-End-Derivat* von T(SH)<sub>2</sub>, dem N<sup>1</sup>-Glutathionylspermidin (N<sup>1</sup>-Gsp), welches auch ein Zwischenprodukt der Trypanothion-Synthese ist, zu lösen (Abbildung 1-10c und d).<sup>[107]</sup> Es wurden die folgenden Interaktionspunkte zwischen Tpx und N<sup>1</sup>-Gsp identifiziert (Abbildung 1-10d): i) die Cysteylseitenkette von N<sup>1</sup>-Gsp bildet eine Disulfidbrücke mit Cys41; ii) Arg129 und die Carboxylgruppe des Glutathionarms von N<sup>1</sup>-Gsp bilden Wasserstoffbrückenbindungen; iii) weitere Wasserstoffbrückenbindungen bestehen zwischen dem Amid und Carbonylsauerstoff der Ile110-Pro111-Peptidbindung und dem Amid und Carbonylsauerstoff des Cysteylrestes des Glutathionylarms. Aufgrund des fehlenden N<sup>8</sup>-gebundenen Glutathionarm basieren weitere mögliche Interaktionspunkte wie die Seitenkette von Glu73 mit dem Spermidinlinker und der Arg45-Seitenkette mit der Carboxylgruppe des N<sup>8</sup>-gebundenen Glutathionarm auf einem Modell.<sup>[107]</sup> Weiterführende NMR-spektroskopische Untersuchungen von CfTpx mit einem Redox-inaktiven T(SH)<sub>2</sub>-Derivat, dem N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(γ-Glu-Ala-Gly)spermidin, bestätigten die in der Kristallstruktur identifizierten Interaktionspunkte von Tpx mit N<sup>1</sup>-Gsp sowie die postulierten Interaktionspunkte des Modells.<sup>[110]</sup> Ein Schwachpunkt dieser kristallographischen und NMR-spektroskopischen Untersuchungen ist die Verwendung von T(SH)<sub>2</sub>-Derivaten anstelle von T(SH)<sub>2</sub>.

Die Abwesenheit der erwarteten Konformationsänderungen in den reduzierten und strahlungsinduziert-reduzierten Kristallstrukturen von Tpx sowie die N<sup>1</sup>-Gsp-gebundene Kristallstruktur zeigen die Schwierigkeiten auf, den reduzierten Zustand und die Interaktion von Tpx mit T(SH)<sub>2</sub> kristallographisch abzubilden. Eine weitere Herangehensweise an die strukturelle Aufklärung des katalytischen Mechanismus von Tpx könnte die NMR-spektroskopische Untersuchung der verschiedenen Tpx-Formen sein. Die NMR-Spektroskopie bietet den Vorteil, dass die Proteine in Lösung vorliegen und deshalb möglicherweise physiologisch relevantere Zustände beobachtet werden können. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Dissertation verfolgt.

Tabelle 1-3 Aufstellung in der PDB verfügbarer Tryparedoxin-Strukturen sortiert nach dem Organismus (Stand Dez. 2020). Es ist die Kennziffer des PDB-Eintrags (Auflösung der Struktur in Å), die Proteinform, die verwendete Methode zum Lösen der Struktur und der mittels PyMOL bestimmte RMSD der Überlagerung der aufgelisteten Tpx-Struktur zur *T. brucei* Tpx-Struktur (PDB 1o73) angegeben.

	<b>Organismus</b>	<b>PDB-Eintrag</b>	<b>Form</b>	<b>Methode</b>	<b>RMSD</b>
TpxI	<i>C. fasciculata</i>	1qk8 (1,4 Å)	oxidiert	X-ray	0,596 Å
TpxI	<i>C. fasciculata</i>	1o7u (1,5 Å)	oxidiert - strahlungsinduziert	X-ray	0,616 Å
TpxI	<i>C. fasciculata</i>	1o85 (1,5 Å)	reduziert - strahlungsinduziert	X-ray	0,645 Å
TpxI	<i>C. fasciculata</i>	1o8x (1,3 Å)	Punktmutation Cys43Ala	X-ray	0,612 Å
TpxI	<i>C. fasciculata</i>	1o8w (1,7 Å)	reduziert - strahlungsinduziert	X-ray	0,582 Å

TpxI	<i>C. fasciculata</i>	1okd	oxidiert	NMR	1,324 Å
TpxI	<i>C. fasciculata</i>	1ezk (1,9 Å)	oxidiert	X-ray	0,763 Å
TpxI	<i>C. fasciculata</i>	1ewx (1,7 Å)	oxidiert	X-ray	0,633 Å
TpxII	<i>C. fasciculata</i>	1oc9 (2,35 Å)	reduziert - strahlungsinduziert	X-ray	0,412 Å
TpxII	<i>C. fasciculata</i>	1o6j (2,35 Å)	reduziert - strahlungsinduziert	X-ray	0,416 Å
TpxII	<i>C. fasciculata</i>	1o81 (1,5 Å)	oxidiert	X-ray	0,476 Å
TpxII	<i>C. fasciculata</i>	1oc8 (1,5 Å)	oxidiert	X-ray	0,475 Å
TpxII	<i>C. fasciculata</i>	1fg4 (1,9 Å)	heterogene Einzelzelle – Kette A oxidiert, Kette B reduziert	X-ray	0,545 Å
TpxII	<i>C. fasciculata</i>	1i5g (1,4 Å)	N <sup>1</sup> -Glutathionylspermidin kovalent an Cys41 gebunden, Punktmutation Cys44Ser	X-ray	0,686 Å
TpxI	<i>L. major</i>	3s9f (1,8 Å)	oxidiert	X-ray	0,702 Å
Tpx	<i>T. brucei</i>	1o73 (2,28 Å)	oxidiert	X-ray	-

## 1.6 Tryparedoxin als Zielprotein für die Wirkstoffentwicklung

Wie in Kapitel 1.4 angeführt ist die T(SH)<sub>2</sub>/TR-Kaskade ein ausgezeichneter Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Arzneistoffe. Füller et al. (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Krauth-Siegel, Universität Heidelberg) testeten fast 80.000 Moleküle gegen die Peroxid-Entgiftungskaskade und fanden zwölf zeitabhängige Inhibitoren gegen Tpx.<sup>[21]</sup> Diese Inhibitoren reagieren unter Abspaltung einer

Abgangsgruppe in einer kovalenten Reaktion mit dem katalytischen Cys40 der Oxidoreduktase. Die zwölf identifizierten Inhibitoren besaßen eine antitrypanosomale Aktivität gegen lebende *T. b. brucei* BS-Zellen im niedrigen mikromolaren Bereich, vereinzelt sogar mit EC<sub>50</sub>-Werten von unter 1 µM.<sup>[21]</sup> Zwei dieser Inhibitoren stachen aufgrund eines hohen Selektivitätsindex zwischen den EC<sub>50</sub>-Werten in *T. b. brucei* BS-Zellen und HeLa-Zellen (EC<sub>50</sub>-Wert für HeLa Zellen nach 72 h Inkubationszeit: >50 µM) heraus: Compound 1, welcher hier im Folgenden als CFT (2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)-thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on) bezeichnet wird und Compound 3 (3-Butyl-7-methyl-8-(((3-(trifluormethyl)phenyl)thio)methyl)-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion) (Abbildung 1-11).<sup>[21]</sup> Allerdings zeigten weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] nach der Veröffentlichung von Füller et al., dass die inhibitorische Wirkung von Compound 3 gegen Tpx vermutlich durch eine Verunreinigung der Substanz, möglicherweise durch den Hersteller, hervorgerufen wurde. Eine neuere Charge von Compound 3 wies keinerlei antitrypanosomale Aktivität auf und bewirkte keine Inhibition von Tpx (persönliches Gespräch mit Prof. Dr. [REDACTED]). Die Interaktion von CFT und Compound 3 mit *T. brucei* Tpx wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels NMR Spektroskopie überprüft und es konnte in Übereinstimmung mit den Daten der AG

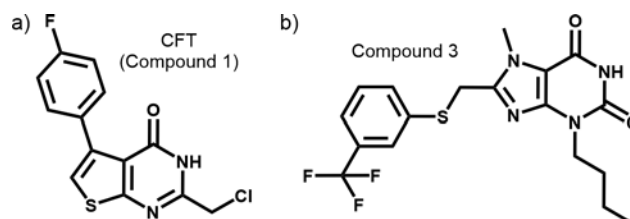


Abbildung 1-11 Molekülstrukturen von (a) CFT und (b) Compound 3.<sup>[21]</sup>

█ keine Interaktion mit Compound 3 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Im Weiteren beschäftigte sich diese Arbeit also nur noch mit der Aufklärung des molekularen Bindemechanismus von CFT an Tpx.

## 1.7 Ziel der Dissertation

### Teil 1:

Wie in Kapitel 1.5 eingeleitet ist die oxidierte Form von Tpx kristallographisch ausführlich untersucht worden. Allerdings scheint die weitere Aufklärung des katalytischen Mechanismus von Tpx, der reduzierte, Trypanothion-gebundene und Protein-gebundene Zustand (siehe Abbildung 1-7) von Tpx aus kristallographischer Sicht schwierig zu sein. Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war die Aufklärung der strukturellen Veränderungen von Tpx zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand sowie der Interaktion zwischen Tpx und Trypanothion ( $TS_2/T(SH)_2$ ) mit Hilfe der NMR-Spektroskopie. Diesbezüglich wurde insbesondere die Funktion von vier hochkonservierten Tryptophanresten in Tpx für die Struktur und die Aktivität des Proteins untersucht.

### Teil 2:

Füller et al.<sup>[21]</sup> präsentierten die ersten selektiven, kovalenten Inhibitoren gegen Tpx. Allerdings ist der molekulare Bindemechanismus der Inhibitoren an Tpx unbekannt. Das Ziel des zweiten Teils dieser Dissertation war die Aufklärung des molekularen Bindemechanismus von Tpx und dem kovalenten Inhibitor 2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)-thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (CFT). Dafür wurde im ersten Schritt die Rolle der kovalenten Bindung für die Tpx-CFT-Interaktion untersucht. Des Weiteren wurde die im Rahmen dieser Arbeit erhaltene Kristallstruktur von Tpx im Komplex mit CFT analysiert und ein Inhibitor-induzierter Dimerkomplex festgestellt. Aufgrund des kristallographisch ermittelten Tpx<sub>2</sub>-CFT<sub>2</sub>-Dimerkomplexes sollte überprüft werden, ob dieser auch in Lösung gebildet wird. Außerdem wurde die Rolle der beobachteten Protein-Protein-, Inhibitor-Inhibitor und Protein-Inhibitor-Wechselwirkungen in der Tpx-CFT-Kristallstruktur für die Dimerbildung untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalie [Artikelnummer]	Anbieter
1 kb DNA Ladder [N3232L]	New England Biolabs, Ipswich, MA USA
Agar-Agar, Kobe I [5210.2]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agarose Genetic Analysis Grade [BP1356-500]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Aktivkohle pulv., für Entfärbezwecke [5963.3]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Alanin [3076.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ameisensäure [4724.2]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumacetat [7869.2]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumchlorid $\text{NH}_4\text{Cl} \geq 99\%$ , krist. [5470.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS) [9592.2]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz [K029.2]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Arginin [1655.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Aspartic acid [A9256-100G]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Bathocurpoinedisulfonic acid disodium salt [B1125-1G]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Benzamidin [12072-10G]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
D(+)-Biotin [3822.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Brillant Blau R250 (C.L 42660) [3862.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau Natriumsalz [A512.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Calciumchlorid Dihydrat $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ [T885.2]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Centrum von A bis Zink	Pfizer Consumer Healthcare GmbH, Berlin
Chlorhexidine [282227-1G]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
CutSmart® Buffer [B7204S]	New England Biolabs, Ipswich, MA USA
L-Cysteine [C7352-25G]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Deoxynucleotide Solutions, Mix [N0447S]	New England Biolabs, Ipswich, MA USA
Dimethylsulfoxid [4720.4]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ [P030.3]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT) [6908.2]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Eisen(III)-chlorid $\text{FeCl}_3$ [5192.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol, absolute, $\geq 99\%$ [E/0600DF/21]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Ethidium bromide [E8751]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dikaliumsalz Dihydrat [1408.3]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

## 2 Material und Methoden

Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat [X986.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum, qualified, Brazil [10270106]	Gibco™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Formaldehyde solution 37 wt.% in H <sub>2</sub> O [252549-500ML]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Gel Loading Dye, Purple (6x) [B7024S]	New England Biolabs, Ipswich, MA USA
Gelatin from Bovine Skin [G9391]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
D(+)-Glucose anhydrous [G/0500/60]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
L-Glutamin [3772.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Glutaminsäure, ≥98,5 %, Ph.Eur., für die Biochemie [3774.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycerol Analytical reagent grade [1705424]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Glycin [3187.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin PUFFERAN® ≥99 %, p.a. [3908.3]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Guanidin Hydrochlorid ≥98 %, techn. [6069.3]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt [2363.3]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hellmanex III [9-307-011-4-507]	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
HEPES [BP310-1]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
L-Histidin [3852.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hydrochloric acid 37% [20252.335]	AnalaR NormaPur, VWR International GmbH, Darmstadt
Hygromycin B-Lösung [1287.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hypoxanthine [H9636-5G]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Imidazol PUFFERAN® ≥99%, p.a., Ultra Qualität [X998.4]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
IMDM Iscove's Modified Dulbecco's Medium [42200030]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
IPTG [CN08.4]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Isoleucin [1698.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [P018.3]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kanamycinsulfat [T832.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LB-Medium (Luria/Miller) [X968.4]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Leucine [L8000-50G]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
L-Lysinhydrochlorid [9357.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O [HN03.2]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumsulfat Heptahydrat MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O [T888.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
mal-PEG-COOH [PEG1060.0500]	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz
Mangan(II)-sulfat Monohydrat MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O [4487.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol [63689-25ML-F]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Methanol, ≥99.9% [M/4000/17]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
L-Methionine [M9625-25G]	Sigma-Aldrich, Darmstadt

Milchpulver [T145.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NAD [AE11.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NADPH-Tetranatriumsalz [AE14.2]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid, $\geq 99,5\%$ NaCl [S/3120/63]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat $\geq 98\%$ , p.a., ACS [K300.3]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid NaOH [P031.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Nicotinsäure [3815.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Nickel(II) sulfate hexahydrate ReagentPlus <sup>®</sup> , crystalline [N4882-1KG]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin [P4333-100ML]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
L-Phenylalanin [4491.3]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) [6367.2]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Phleomycin from <i>Streptomyces verticillus</i> [P9564-5MG]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Phosphoric acid, extra pure 85% solution in water [295700025]	Acros Organics, Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Poly(ethylene glycol) BioUltra, 8,000 [89510-250G-F]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Precision Plus Protein <sup>™</sup> Dual Color Standards [1610374]	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
L-Prolin [T205.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Propan-2-ol, $\geq 99,8\%$ [P/7500/17]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Protease Inhibitor Cocktail [P8849]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Roti <sup>®</sup> -Lumin [P078.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (37,5:1) [3029.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SDS-Pellets $\geq 99\%$ , für die Biochemie [CN30.3]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Serin [4682.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SIGMAFast <sup>™</sup> Proteaseinhibitor-Tabletten [S8820]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Sodium bicarbonate [31437-500G-M]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
TEMED [2367.3]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tetracycline hydrochloride [T7660-5G]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Thiamin Hydrochlorid [T911.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Threonin [T206.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Thymidine [T1895-1G]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Tris-(2-carboxyethyl)-phospin-Hydrochlorid TCEP	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris Base [BP152-5]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Triton X <sup>®</sup> 100 [3051.3]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypton/Pepton aus Casein [8952.2]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Tryptophan [4858.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypanothion, T(SH) <sub>2</sub>	Hergestellt von ██████████, BZH Universität Heidelberg

Trypanothiondisulfid, TS <sub>2</sub>	Hergestellt von ██████████, BZH Universität Heidelberg
Tween® 20 [9127.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Tyrosine, reagent grade [T3754-50G]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
L-Valine, reagent grade [V0500-25G]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 35% rein, stabilisiert [9683.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Zinksulfat Heptahydrat ZnSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O [K301.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

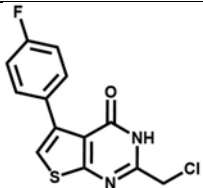
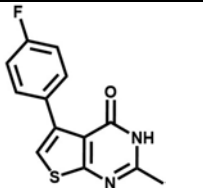
### 2.1.2 Isotope für die NMR-Spektroskopie

Isotope [Artikelnummer]	Anbieter
Ammonium chloride ( <sup>15</sup> N, 99%) [NLM-467-10]	Eurisotop, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA
L-Arginine:HCl ( <sup>15</sup> N <sub>4</sub> , 98%) [NLM-396-0.1]	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA
L-Cysteine- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> , <sup>15</sup> N [658057-100MG]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
D-Glucose (U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , 99%) [CLM-1396-10]	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA
L-Lysine:2HCl (Alpha- <sup>15</sup> N, 95-99%) [NLM-143-1]	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA
L-Proline- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> , <sup>15</sup> N [608114-100MG]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
L-Tryptophan ( <sup>15</sup> N <sub>2</sub> , 98%) [NLM-800-0.25]	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA

### 2.1.3 Tryparedoxin-Inhibitoren

Die Substanzen CFT und MFT wurden von Dipl. Chem. ██████████, Doktorand im Arbeitskreis von Prof. Dr. ██████████, an der JGU Mainz gemäß Wagner et al., 2019<sup>[111]</sup> synthetisiert.<sup>[111]</sup>

Tabelle 2-1 Aufstellung der untersuchten Tpx-Inhibitoren mit Molekülstruktur, Namen, IUPAC-Bezeichnung, Summenformel und Molekulargewicht (MW) in g/mol.

Struktur	Name	IUPAC-Bezeichnung	Summenformel	MW [g/mol]
	CFT	2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)- thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> ClFN <sub>2</sub> OS	294,73
	MFT	2-Methyl-5-(4- fluorphenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin- 4(3H)-on	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> FN <sub>2</sub> OS	260,29

**2.1.4 Kits**

<b>Kit [Artikelnummer]</b>	<b>Anbieter</b>
ATPlite Luminescence Assay System [6016941]	PerkinElmer, Rodgau
E.Z.N.A. <sup>®</sup> Plasmid Mini Kit	OMEGA BIO-TEK, VWR, Darmstadt
KAPA HiFi PCR Kit [07958846001]	Roche, Mannheim
NucleoBond Xtra Midi (50) [740410.50]	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren

**2.1.5 Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterialien [Artikelnummer]</b>	<b>Anbieter</b>
10 µL Graduated Tip [S1111-3000]	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg
200 µL Yellow, Bevelled Tip [S1111-1006]	
1000 µL Blue, Graduated Tip [S1111-6001]	
10 µL XL Filter Tips, Graduated, Racked, PP, Natural, Sterile [771 261]	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
20 µL Filter Tips, Graduated, Racked, PP, Natural, Sterile [773 261]	
300 µL Filter Tips, Graduated, Racked, PP, Natural, Sterile [738 261]	
1250 µL Filter Tips, Graduated, Racked, PP, Natural, Sterile [750 261]	
Blotting Papier [FT-2-518-580600 N]	Sartorius AG, Göttingen
Campingaz <sup>TM</sup> C206 GLS durchstechbare Kartusche	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Cryo.s <sup>TM</sup> [126263]	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläser 24x24mm [H875]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Disposable Serological Pipet 5 mL [13-678-12D]; 10 mL [13-678-12E]; 25 mL [13-678-14B]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Electroporation cuvettes gap width 0.2 cm [Z706086-50EA]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Falcon <sup>TM</sup> Chambered Cell Culture Slides [10364551]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Gewebekulturplatte 24 Well steril, mit Abdeckplatte [662160]	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pasteurpipetten 1,0 mL, ungraduiert, 104 mm lg. [1-6152]	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Reaction Tubes, 1.5 mL, PP, graduated [616 201]	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaction Tubes, 2 mL, PP, graduated [623201]	
Röhrchen 15 mL, konischer Boden [188271]	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen 50 mL, konischer Boden [227261]	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen 50 mL, konischer Boden, Stehrand [210261]	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhre 3,5 mL, 55x12mm, PP [55.535]	SARSTEDT AG & CO. KG, Nümbrecht

## 2 Material und Methoden

Rotilabo®-Sicherheitsreaktionsgefäße, PP. Farblos, 0,5 mL [XC62.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
StarGuard® Comfort, Nitril-Handschuhe XS [SG-C-XS]	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg
Stericup® Quick Release Durapore® 0.22 µm PVDF, 500 ml [S2GVU05RE]	Merck KGaA, Darmstadt
Stericup® Receiver Flask 500 ml [S200B05RE]	
Stericup® Receiver Flask 1000 ml [S200B10RE]	
Sterile Kulturröhrchen, PS, ungraduiert, 12 mL, mit Verschluss [AEX9.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Transfer membrane Roti® PVDF 0.45, 375 x 26.5 cm [T830.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Zellkultur Microplatte, 96 well, PS, F-Boden [655980]	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflasche, 50 mL [690175]	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflasche, 250 mL [658175]	
Zellkulturflasche, 550 mL [660160]	
ZelluTrans Dialyseschlauch aus regenerierter Zellulose Norminal MWCO:3,500 [E659.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

### 2.1.6 Geräte

Laborgerät	Typ	Anbieter
Analytische Waage	ACJ/ACS	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern
	AE 100	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Bechergläser	5 L, 2 L, 1 L, 600 mL, 500 mL, 250 mL, 150 mL, 100 mL, 50 mL	SCHOTT AG, Mainz
Imaging System	Stella 3200	Elysia-raytest GmbH, Straubenhardt
Bunsenbrenner	Campingaz™ Labogaz 206	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
CD Spektrometer	J-815	JASCO Deutschland GmbH, Pfungstadt
Chromatographie Säulen	Enrich™ SEC 70 High-Resolution Size Exclusion Column	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
	Superdex™ 75 Increase 10/300 GL	GE Healthcare GmbH, Solingen
	HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 pg	
	HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 pg	

Chromatographie System	NGC Quest™ 10 Plus Chrom System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
CO <sub>2</sub> Inkubator	CB 210	Fa. BINDER GmbH, Tuttlingen
Elektroporator	Nucleofector™ 2b	Lonza Cologne GmbH, Köln
Glasflaschen	2 L, 1 L, 500 mL, 250 mL, 100 mL, 50 mL	SCHOTT AG, Mainz
Gelscanner	ViewPix700	SEIKO Epson Corporation, Meerbusch
Gelschüttler	RS-DS 5	Phoenix Instrument, Garbsen
Gelelektrophorese System	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
	Mini-PROTEAN® short plates [1653308]	
	Mini-PROTEAN® glass plates 1.0 mm gap [1653311]	
	Tetra Blotting Module	
	PerfectBlue™ Gelsystem Mini S [40-0708]	PEQLAB/VWR International GmbH, Darmstadt
	PerfectBlue™ Gelsystem Mini M [40-0911]	
	PerfectBlue™ Gelsystem Mini L [40-1214]	
Glaskolben	2000 mL, 1000 mL, 500 mL, 250 mL, 100 mL (mit und ohne Schikane)	SCHOTT AG, Mainz
Heizblock	Multi-Therm™ Cool-Heat-Shake	Benchmark Scientific, Inc. PO Box, NJ, Edison
Heiz- und Magnetrührer	ROTILABO® MH 15	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Inkubator	INCU-Line® IL-10	VWR International GmbH, Darmstadt
ITC Instrument	MicroCal iTC <sub>200</sub>	Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK
Kamera für Ethidiumbromid-gefärbte Gele	QUANTUM-ST4 1100/26MX Serial N	PEQLAB/VWR International GmbH, Darmstadt
Kamera für Ethidiumbromid-gefärbte Gele – Drucker	P95	Mitsubishi Electric Europe B.V., Ratingen
Laborhebebühne	Swiss Boy 110	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Durchlichtmikroskop	Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mikroskop	Axiovert 200 M Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Neubauer Zählkammer	improved Linien dunkel [T729.1]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

NMR Spektrometer	600 MHz Bruker Avance III HD	Bruker, Karlsruhe
	700 MHz Bruker Avance III HD	
	800 MHz Bruker Avance III HD	
Pipette	Multipipette® M4	Eppendorf AG, Hamburg
	Research® plus, Einkanal 0,1 – 2,5 µL, hellgrau	
	Research® plus, Einkanal 0,5 – 10 µL, hellgrau	
	Research® plus, Einkanal 2 – 20 µL, gelb	
	Research® plus, Einkanal 20 – 200 µL, gelb	
	Research® plus, Einkanal 100 – 1000 µL, blau	
	Xplorer®, 12-Kanal, 5 - 100 µL, gelb	
Pipette Controller D-6017	neoLab Migge GmbH, Heidelberg	
Plattenleser	Infinite® M200 Pro plate reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Power Supply	peqPower 300	PEQLAB/VWR International GmbH, Darmstadt
	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
	PowerPac™ HC High- Current Power Supply	
Rotoren	A27-8x50	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
	F9-6x1000 LEX	
	JA-25.50	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA
	J-LITE JLA-8.1000	
Säulen	Econo-Column® Chromatography Columns	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Schüttler	Multitron	Infors HAT, Schweiz, Bottmingen
Sicherheitswerkbank	S2020 1.2, EN12469: 2000, Class II, Safety Cabinet	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Spektrophotometer	U-5100	Hitachi High-Technologies, Krefeld
	Nanodrop 2000c	peqlab, Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Thermocycler	Biometra T Gradient 95	Analytik Jena AG, Jena
Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS HD 2200	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV/VIS Spektrometer	Lambda35	PerkinElmer, Rodgau
Vakuumpumpe	Membran-Vakuumpumpe	VAKUUMBRAND GmbH + CO, Wertheim
Vortexer	RS-VA10	Phoenix Instrument, Garbsen
Waage	PLJ 600-2GM	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern
	PM2000	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Zentrifuge	Mini centrifuge ROTILABO®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
	Fresco 21 Centrifuge	Heraeus, Fisher Scientific GmbH, Schwerte
	Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
	Sorvall Lynx 6000 centrifuge	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
	Avanti J26XP	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA
Zentrifugengefäß	Nalgene™ Oak Ridge PPCO-Zentrifugenröhrchen mit Dichtungsverschluss für Highspeed-Anwendungen	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
	Fiberlite 1000 ml-Flaschen	
	50 mL, Polycarbonate Tube with Snap-On Cap, 29 x 104 mm	Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA
	1L (1000mL) Bottle Assy, J-Lite, 1000ml, PP, 95 x 191 mm	
Zweiwegehahn	Two-way stopcocks [7328102]	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen

### 2.1.7 Programme

Programm	Betreiber
AxioVision Release 4.9.1 SE64	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
BeStSel, <a href="http://bestsel.elte.hu/">http://bestsel.elte.hu/</a>	József Kardos, Department of Biochemistry, Budapest, Ungarn <sup>[112]</sup>
CARA 1.8.4.2	CARA definition team, Rochus Keller <sup>[113]</sup>
ChemBioDraw	CambridgeSoft Corporation, PerkinElmer, Inc., Rodgau

Clustal Omega, <a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>	EMBL-EBI, Hinxton, UK
CorelDRAW Graphics Suite 2019 Version 21.3.0.755	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
EMBOSS Needle, <a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/</a>	EMBL-EBI, Hinxton, UK
ExPASy Bioinformatics Resource Portal, <sup>[114]</sup> <a href="https://www.expasy.org/">https://www.expasy.org/</a>	SIB Swiss Institute of Bioinformatics
GraFit Version 5.0.13	Erithacus Software Limited, East Grinstead, UK
GraphPad Prism 8.4.3	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Microsoft® Excel® für Office 365 MSO (16.0.12527.20242) 64-Bit	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft® Word für Office 365 MSO (16.0.12527.20242) 64-Bit	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Origin7.0; OriginPro 8G SR4 v8.0951 (B951)	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
PyMOL 4.6.0 – Build 26.20.100.7324	Schrödinger, Inc. New York, NY, USA
SWISS-MODEL, <sup>[114]</sup> <a href="https://swissmodel.expasy.org/">https://swissmodel.expasy.org/</a>	SIB Swiss Institute of Bioinformatics
TALOS+, <a href="https://spin.niddk.nih.gov/NMRPipe/talos/">https://spin.niddk.nih.gov/NMRPipe/talos/</a>	Bax Group, National Institutes of Health, USA
Topspin 4.0.7	Bruker BioSpin GmbH, Billerica, MA, USA

### 2.1.8 Oligonukleotide

Die nachfolgend aufgelisteten Oligonukleotide (ausgenommen Tpx\_C43S\_for, Tpx\_C43S\_rev) wurden im Rahmen dieser Arbeit gestaltet und von Sigma Aldrich, Darmstadt hergestellt. Die Oligonukleotide Tpx\_C43S\_for und Tpx\_C43S\_rev wurden von Prof. Dr. [REDACTED], BZH Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

Verwendung	AK-interne Nummerierung und Name	Sequenz 5'-3'
Einführung der Punktmutante S38A in <i>TbTpx</i>	P473 Tpx_S38A_for	tctgccgctggtgcccccatg
	P474 Tpx_S38A_rev	gcaccacgcggcagaaaagtaaagaaacac
Einführung der Punktmutante W39A in <i>TbTpx</i>	P446 Tpx_W39A_for	ctgcctccgctgcccccatgc
	P447 Tpx_W39A_rev	gggggcacgcggaggcagaaaagtaaag
Einführung der Punktmutante W39F in <i>TbTpx</i>	P538 Tpx_W39F_for	ctgcctctttgcccccatgcc
	P539 Tpx_W39F_rev	gggggcaaaaggaggcagaaaagtaaagaaac
Einführung der Punktmutante W39Y in <i>TbTpx</i>	P536 Tpx_W39Y_for	ctgcctctattgcccccatgcc
	P537 Tpx_W39Y_rev	gggggcaataggaggcagaaaagtaaagaaac
Einführung der Punktmutante C40S in <i>TbTpx</i>	P101 Tpx_C40S_for	ctttctgcctcctggtcccccatgcc
	P102 Tpx_C40S_rev	gtaaaacccggcatgggggggaccaggaggc

Einführung der Punktmutante C43S in <i>TbTpx</i>	P99 Tpx_C43S_for	ctggtgccccccatcccggggttttacacc
	P100 Tpx_C43S_rev	ggtgtaaaaccccgggatggggggcaccag
Einführung der Punktmutante C40/43S in <i>TbTpx</i>	P103 Tpx_C40/43S_for	ctttctgctctggtccccccatccc
	P104 Tpx_C40/43S_rev	gtaaaaccccgggatgggggggaccaggaggc
Einführung der Punktmutante R44A in <i>TbTpx</i>	P269 Tpx_R44A_for	ccccatgcgcgggttttacaccggtc
	P270 Tpx_R44A_rev	gtgtaaaacccgcgcatggggggcac
Einführung der Punktmutante W70A in <i>TbTpx</i>	P489 Tpx_W70A_for2	ctgattccgcggatgaaaacgagagcgacttc
	P490 Tpx_W70A_rev2	cgtttcatcgcggaaatcagcacgacttcg
Einführung der Punktmutante W70F in <i>TbTpx</i>	P542 Tpx_W70F_for	ctgattccttgatgaaaacgagagcgacttc
	P543 Tpx_W70F_rev	cgtttcatcaaaggaaatcagcacgacttcaag
Einführung der Punktmutante W70Y in <i>TbTpx</i>	P652 Tpx_W70Y_for2	gctgattcctatgatgaaaacgagagcgacttc
	P653 Tpx_W70Y_rev2	ctcgtttcatcataggaatcagcacgacttcg
Einführung der Punktmutante Y81F in <i>TbTpx</i>	P313 Tpx_Y81F_for	cgacttccatgattactcggcaagatgc
	P314 Tpx_Y81F_rev	ccacggcatcttgcgaagtaatcatgg
Einführung der Punktmutante W86A in <i>TbTpx</i>	P596 Tpx_W86A_for	gatgccggcgctcgtctcccatttg
	P597 Tpx_W86A_rev	gcgagcggcgcacatcttgccgtag
Einführung der Punktmutante K102A in <i>TbTpx</i>	P674 Tpx_K102A_for	gaattggcgcgacatttggcgtggaatc
	P675 Tpx_K102A_rev	gccaaatgtcgcgccaattccgaaactg
Einführung der Punktmutante K102E in <i>TbTpx</i>	P676 Tpx_K102E_for	aattggcgagacatttggcgtgg
	P677 Tpx_K102E_rev	gccaaatgtctcgccaattccgaaac
Einführung der Punktmutante E107A in <i>TbTpx</i>	P670 Tpx_E107A_for	ggcgtggcgtccattccgactcttacc
	P671 Tpx_E107A_rev	ggaatggagcccacgccaatgtcttgc
Einführung der Punktmutante E107K in <i>TbTpx</i>	P672 Tpx_E107K_for	ggcgtgaaatccattccgactcttacc
	P673 Tpx_E107K_rev	ggaatggatttcacgccaatgtcttgc
Einführung der Punktmutante I109A in <i>TbTpx</i>	P303 Tpx_I109A_2_for	catttggcgtggaatccgcgactcttacc
	P304 Tpx_I109A_2_rev	gattccgtctcttgaaaacttctgtagccag
Einführung der Punktmutante T129A in <i>TbTpx</i>	P544 Tpx_T129A_for	cgtgcccggtcattgaggatcc
	P545 Tpx_T129A_rev	cacgggcacgggctgagtg
Einführung der Punktmutante W142A in <i>TbTpx</i>	P598 Tpx_W142A_for	cttccggcgccaactgactcgag
	P599 Tpx_W142A_rev	gttggcgccgaaagtggcacc
Linearisierung des Plasmids pHD1700 für Gibson Assembly	P106 pHD1700_g_for	ggatccaacgagcaaaagctcatttc
	P107 pHD1700_g_rev	cataagcttgaattttacttttgggtgaattgaag
Amplifikation der Gensequenz von <i>dTRPML</i> für Gibson Assembly in pHD1700	P115 <i>dTRPML</i> _g_for	gtaaaattcacaagcttatgcagagctacggccc
	P116 <i>dTRPML</i> _g_rev	gtttgctcgttgatcccttcataataactagaaaggctggtgaacc

## 2.1.9 Plasmide und Eigenschaften der Proteinkonstrukte

#	Vektor	Bezeichnung	Verwendung	Herkunft
p025	pcDNA3.1-cGFP-His	<i>dTRPML</i>	Expression des <i>dTRPML</i> in <i>HEK293</i> Zellen mit c-terminalem cGFP-His <sub>6</sub>	Dr. [REDACTED], Harvard University Cambridge, USA
p081	pMAL	MBP-His <sub>6</sub> -TEV	Expression der TEV-Protease in <i>E. coli</i>	Dr. [REDACTED], Goethe Universität Frankfurt am Main
p107	pHD1700	<i>T. brucei</i> Trx2	Tet-induzierbare Expression von <i>T. brucei</i> Trx2 in <i>T. b. brucei</i> BSF449 mit N-terminalem Myc-tag	Dr. [REDACTED] [REDACTED], Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
p108	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx in <i>E. coli</i>	Dr. [REDACTED] [REDACTED], Biochemie Zentrum BZH Universität Heidelberg
p109	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_C40S	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>C40S</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p110	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_C43S	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>C43S</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p111	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_C40/43S	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>C40/43S</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p166	pHD1700	<i>dTRPML</i>	Tet-induzierbare stabile Expression von <i>Drosophila melanogaster</i> TRPML in <i>T. b. brucei</i> BSF449 mit N-terminalem Myc-tag	Diese Arbeit
p185	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_I109A	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>I109A</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p186	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_R44A	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>R44A</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p187	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_Y81F	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>Y81F</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p220	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> PxIII	Expression des Fusionsproteins Trx-PxIII (ohne mitochondriale Zielsequenz) in <i>E. coli</i>	Dr. [REDACTED] [REDACTED], Biochemie Zentrum BZH Universität Heidelberg

p297	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_W39A	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>W39A</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p298	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_S38A	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>S38A</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p299	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_W70A	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>W70A</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p322	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_W39F	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>W39F</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p323	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_W39Y	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>W39Y</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p326	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_T129A	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>T129A</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p327	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_W70F	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>W70F</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p332	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_W86A	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>W86A</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p333	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_W142A	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>W142A</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p409	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_W70Y	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>W70Y</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p421	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_E107A	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>E107A</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p422	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_E107K	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>E107K</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p423	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_K102A	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>K102A</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p424	pETtrx_1b	<i>T. brucei</i> Tpx_K102E	Expression des Fusionsproteins Trx-Tpx <sup>K102E</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p591	pET3a	<i>T. brucei</i> TR	Expression der TbTR mit T7-tag in <i>E. coli</i>	Dr. [REDACTED], [REDACTED], Biochemie Zentrum

## 2 Material und Methoden

				BZH Universität Heidelberg
p593	pET19b	<i>Crithidia fasciculata</i> TryS_C59A	Expression der Cf TryS <sup>C59A</sup>	Dr. [REDACTED], [REDACTED], Biochemie Zentrum BZH Universität Heidelberg

Tabelle 2-2 Ausgewählte Eigenschaften der verwendeten Proteinkonstrukte. Die Konstrukte sind nach der in der Arbeitsgruppe internen Nummerierung der Plasmide (#) sortiert, aus denen diese nach Expression und Aufreinigung resultieren. Angegeben ist der Name des Konstrukts, der Extinktionskoeffizient bei 280 nm in M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (mit ProtParam von ExPASy bestimmt), das Molekulargewicht in Da und die Anzahl der Aminosäuren.

#	Konstrukt	Extinktionskoeffizient bei 280 nm [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	MW [Da]	Aminosäureanzahl
p081	His <sub>6</sub> -TEV	32220	28617,5	249
p108	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>WT</sup>	45170	30274,2	279
	Tpx <sup>WT</sup>	29575	16076,2	147
p109	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>C40S</sup>	45045	30258,19	279
	Tpx <sup>C40S</sup>	29450	16060,14	147
p110	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>C43S</sup>	45045	30258,19	279
	Tpx <sup>C43S</sup>	29450	16060,14	147
p111	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>C40/43S</sup>	45045	30242,12	279
	Tpx <sup>C40/43S</sup>	29450	16044,08	147
p166	dTRPML-Myc	102190	77220,63	678
p185	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>I109A</sup>	45170	30232,17	279
	Tpx <sup>I109A</sup>	29575	16034,12	147
p186	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>R44A</sup>	45170	30189,14	279
	Tpx <sup>R44A</sup>	29575	15991,09	147
p187	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>Y81F</sup>	43680	30258,25	279
	Tpx <sup>Y81F</sup>	28085	16060,2	147
p220	Trx-His <sub>6</sub> -PxIII	33140	32865,45	300
	PxIII	17545	18351,03	164
p297	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>W39A</sup>	39670	30159,11	279
	Tpx <sup>W39A</sup>	24075	15961,07	147
p298	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>S38A</sup>	45170	30258,25	279
	Tpx <sup>S38A</sup>	29575	16060,2	147
p299	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>W70A</sup>	39670	30159,11	279
	Tpx <sup>W70A</sup>	24075	15961,07	147
p322	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>W39F</sup>	39670	30235,21	279
	Tpx <sup>W39F</sup>	24075	16037,16	147
p323	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>W39Y</sup>	41160	30251,21	279

	Tpx <sup>W39Y</sup>	25565	16053,16	147
p326	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>T129A</sup>	45170	30244,22	279
	Tpx <sup>T129A</sup>	29575	16046,17	147
p327	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>W70F</sup>	39670	30235,21	279
	Tpx <sup>W70F</sup>	24075	16037,16	147
p332	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>W86A</sup>	39670	30159,11	279
	Tpx <sup>W86A</sup>	24075	15961,07	147
p333	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>W142A</sup>	39670	30159,11	279
	Tpx <sup>W142A</sup>	24075	15961,07	147
p409	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>W70Y</sup>	41160	30251,21	279
	Tpx <sup>W70Y</sup>	25565	16053,16	147
p421	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>E107A</sup>	45170	30216,21	279
	Tpx <sup>E107A</sup>	29575	16018,16	147
p422	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>E107K</sup>	45170	30273,3	279
	Tpx <sup>E107K</sup>	29575	16075,26	147
p423	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>K102A</sup>	45170	30217,15	279
	Tpx <sup>K102A</sup>	29575	16019,10	147
p424	Trx-His <sub>6</sub> -Tpx <sup>K102E</sup>	45170	30275,19	279
	Tpx <sup>K102E</sup>	29575	16076,20	147

Nachfolgend ist die Nukleotidsequenz für Tpx<sup>WT</sup> mit daraus resultierender Aminosäuresequenz angegeben. Die ersten drei Aminosäuren gehören zu dem N-terminalen Tag und bleiben nach Spaltung des Trx-His<sub>6</sub>-Tpx-Fusionsproteins durch die TEV-Protease übrig. Das native Tpx Protein beginnt mit der vierten Aminosäure. Daher wurde die Nummerierung der Aminosäuren erst mit diesem Glycin gestartet (grün unterlegt), um die Vergleichbarkeit mit der Literatur zu gewährleisten. Gelb unterlegte Aminosäuren, mit den zugehörigen Nukleotidtripletts, markieren Aminosäuren, welche in dieser Arbeit in Einzelmutanten, verändert wurden. Zusätzlich wurde noch die Doppelmutante Tpx<sup>C40/43S</sup> generiert (siehe auch Anhang 6.5).

```

1 - GGC GCC ATG GGT TCTGGCCTCGCTAAGTATCTTCCTGGCGCAACCAACCTGCTGTCCAAG - 60
1 - G A M G S G L A K Y L P G A T N L L S K - 20

61 - TCGGGTGAAGTTTCACTGGGATCCCTCGTTGGGAAACTGTGTTTCTTTACTTTTCTGCC - 120
21 - S G E V S L G S L V G K T V F L Y F S A - 40

121 - TCCTGGTGCCCCCCATTGCCGGGGTTTTACACCGGTCCTCGCCGAGTTCTACGAGAAGCAT - 180
41 - S W C P P C R G F T P V L A E F Y E K H - 60

181 - CATGTGGCGAAAACTTCGAAGTCGTGCTGATTTCCTGGGATGAAAACGAGAGCGACTTC - 240
61 - H V A K N F E V V L I S W D E N E S D F - 80

241 - CATGATTACTACGGCAAGATGCCTGGCTCGCTCTCCCATTTGACCAACGCTCGACAGTT - 300
81 - H D Y Y G K M P W L A L P F D Q R S T V - 100

301 - TCGGAATTGGGCAAGACATTTGGCGTGGAATCCATTCCGACTCTTATCACAATCAATGCT - 360
101 - S E L G K T F G V E S I P T L I T I N A - 120

```

361 - GATACCGGTGCCATCATTGGCACTCAGGCCCGTACC CGTGTTCATTGAGGATCCCGATGGT - 420  
 121 - D T G A I I G T Q A R T R V I E D P D G - 140  
 421 - GCCAACTTTCCGTGGCCCAACTGA - 444  
 141 - A N F P W P N \* - 147

## 2.1.10 Zelllinien

### 2.1.10.1 Bakterienstämme

Für die Proteinexpression wurde der *E. coli* Bakterienstamm BL21-Gold (DE3) und Rosetta-gami 2(DE3) verwendet. Die Vervielfältigung von Plasmiden wurde mittels DH5α *E. coli* Zellen durchgeführt.

Zelllinien [Artikelnummer]	Genotyp	Anbieter/Herkunft
BL21-Gold (DE3) Competent Cells [230132]	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> ompT hsdS(rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> Tetr gal λ(DE3) endA I	Agilent, Santa Clara, CA, USA
MAX Efficiency <sup>®</sup> DH5α <sup>™</sup> Competent Cells [18258-012]	F <sup>-</sup> Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk, mk <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 λ-thi</i> 1 <i>gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Rosetta-gami <sup>™</sup> 2(DE3) Competent Cells [71351]	Δ( <i>ara-leu</i> )7697 Δ <i>lacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> (DE3) F <sup>+</sup> [ <i>lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro</i> ] <i>gor522::Tn10 trxB pRARE2</i> (Cam <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	Novagen, Sigma-Aldrich, Darmstadt

### 2.1.10.2 Trypanosomenstämme

Es wurde in der Zellkultur die Blutstrom Zelllinie BS449 Wildtyp verwendet, welche dem Lister strain 427<sup>[115]</sup> entstammt und einen konstitutiv exprimierten Tetrazyclin-Repressor<sup>[116]</sup> trägt. Diese Zellen wurden von Dr. ██████████, BZH Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt. Ausgehend von dieser Zelllinie wurde die Zelllinie BS449 *dTRPML* OE generiert. Hierfür wurden die Trypanosomenzellen mit dem Vektor pHD1700\_*dTRPML* (siehe Gibson Assembly 2.2.1.2) transfiziert (siehe Transfektion von Parasitenzellen 2.2.4.3), welcher für eine Tet-induzierbare ektopische Kopie des *Drosophila melanogaster* TRPML Kanal codiert.

**2.1.11 Enzyme**

<b>Enzym [Artikelnummer]</b>	<b>Anbieter</b>
DnaseI [P130717]	AppliChem GmbH, Darmstadt
DpnI [R0176L]	New England Biolabs, Ipswich, MA USA
Lysozym [L6876]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
NotI-HF® [R3189S]	New England Biolabs, Ipswich, MA USA
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase [M0530L]	New England Biolabs, Ipswich, MA USA
Ribonuclease A from bovine pancreas [R5503-500MG]	Sigma-Aldrich, Darmstadt
T4 DNA Ligase [M0202S]	New England Biolabs, Ipswich, MA USA
T5 Exonuclease [M0363S]	New England Biolabs, Ipswich, MA USA
Taq DNA Ligase [M0208S]	New England Biolabs, Ipswich, MA USA
<i>T. b.</i> Trypanothion-Reduktase (TR)	Hergestellt von [REDACTED], BZH Universität Heidelberg

**2.1.12 Antikörper**

<b>Antikörper [Artikelnummer]</b>	<b>Anbieter/Herkunft</b>
Anti-c-Myc antibody produced in rabbit [C3956-.2MG]	Merck KgaA, Darmstadt
DE 16055 $\alpha$ mtTXNPx guinea pig SAC 697 FINA 06/06/2016	Dr. [REDACTED], Biochemie Zentrum BZH Universität Heidelberg
Goat anti-guinea pig IgG-HRP [sc-2438], Lot C0713 HRP conjugated	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
Goat anti-Guinea Pig IgG (H+L) Highly Cross Absorbed, Alexa Fluor® 488, Invitrogen™ [10193752]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Alexa Fluor® 594, Ready Probes™ [15106896]	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Mouse anti-rabbit IgG [sc-2357], Lot 49552	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA

## 2.2 Methoden

Einige der hier aufgeführten Methoden wurden bereits publiziert (Wagner et al., 2017<sup>[117]</sup>; Wagner et al., 2019<sup>[111]</sup>; Dietschreit et al., 2020<sup>[118]</sup>) und diesen Publikationen als Teil der vorliegenden Arbeit entnommen. Ergebnisse, deren Methoden nicht von mir persönlich durchgeführt wurden, sind an den entsprechenden Stellen gekennzeichnet und weisen auf die zugehörige Publikation hin.

Ich habe die Bachelorarbeiten von [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED], sowie die Masterarbeiten von [REDACTED] und [REDACTED] betreut. Teile ihrer Arbeit habe ich in diese Dissertation aufgenommen und an den entsprechenden Stellen gekennzeichnet.

### 2.2.1 Klonierung

#### 2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion PCR

Die Gensequenz von *T. brucei brucei* Tpx wurde von Füller et al., 2012<sup>[21]</sup> in den Vektor pETtrx\_1b kloniert. Die Einführung von Punktmutationen in *TbTpx* erfolgte durch eine Quik change PCR mit dem KAPA HiFi PCR Kit. Die verwendeten Oligonukleotide bzw. Primer sind Kapitel 2.1.8 zu entnehmen und das Pipettierschema ist nachfolgend aufgelistet.

##### Reaktionsansatz

- |                            |          |
|----------------------------|----------|
| • DNA Template (~40 ng/μL) | 0,5 μL   |
| • Forward Primer (10 μM)   | 1,5 μL   |
| • Reverse Primer (10 μM)   | 1,5 μL   |
| • dNTPs                    | 0,75 μL  |
| • KAPA HiFi Polymerase     | 0,5 μL   |
| • 5x KAPA HiFi Puffer      | 5 μL     |
| • MP-H <sub>2</sub> O      | 15,25 μL |

Die PCR wurde mit dem folgenden Programm in einem Thermocycler durchgeführt:

1)	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2)	Denaturierung	98 °C	20 s
3)	Primeranlagerung	5 °C unter T <sub>m</sub> der Primer	15 s
4)	Elongation	72 °C	2-7 min
5)	Finale Elongation	72 °C	2-7 min

Die Schritte 2 bis 4 wurden 30x wiederholt. Die Anlagerungstemperatur der Primer wurde 5 °C unter der Schmelztemperatur T<sub>m</sub> der Primer gewählt und, falls nötig, eine „Ramp“ verwendet. Bei einer „Ramp“ startet die Temperatur für die Primeranlagerung niedrig und erhöht sich bei jedem Zyklus, der durchlaufen wird, um beispielsweise 0,2 °C. Die Elongationszeit sowie die finale Elongationszeit wurden abhängig von der Länge der PCR-Produkte und entsprechend der Anleitung des KAPA HiFi PCR Kits ausgewählt. Der Erfolg jeder PCR wurde mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.1.3) überprüft. Für die Entfernung des eingesetzten Plasmids wurde ein DpnI-Verdau durchgeführt. Bei der Vervielfältigung von Plasmid-DNA in *E. coli* Bakterien wird diese methyliert. Das Restriktionsenzym DpnI erkennt methylierte DNA und schneidet diese. Durch den Verdau des PCR-Produkts mit DpnI kann das eingesetzte Templat entfernt werden. Nachfolgend ist der Restriktionsansatz des Verdau aufgelistet:

**DpnI Restriktionsansatz**

• PCR-Produkt	22,5 µL
• DpnI	1 µL
• Cut Smart Puffer 10x	5 µL
• MP-H <sub>2</sub> O	21,5 µL

Der Restriktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Das DpnI-verdaute PCR-Produkt wurde in DH5α *E. coli* Zellen transformiert (Kapitel 2.2.1.5), die Plasmid-DNA extrahiert und sequenziert (Kapitel 2.2.1.6).

**2.2.1.2 Gibson Assembly**

Gibson Assembly ist eine gentechnische Methode zur Fusion eines mittels PCR linearisierten Plasmids und eines Inserts ohne die Verwendung von Restriktionsenzymen.<sup>[119]</sup>

Das Plasmid pHD1700\_Trx2 wurde unter Einsatz der Primer pHD1700\_g\_for und pHD1700\_g\_rev in einer Quik change PCR linearisiert und das Trx2 codierende Insert entfernt. Eine PCR des Plasmids pcDNA3.1-cGFP-His\_dTRPML mit den Primern dTRPML\_g\_for und dTRPML\_g\_rev lieferte das Genfragment dTRPML. Das Pipettierschema, sowie das verwendete Programm ist 2.2.1.1 zu entnehmen.

Der Erfolg der PCR, sowie die Reinheit der PCR-Produkte wurde unter zu Hilfenahme einer Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.1.3) überprüft. Anschließend wurde ein DpnI-Verdau (Kapitel 2.2.1.1) der PCR-Produkte durchgeführt.

<b>5x Isothermer Reaktionspuffer</b>	<b>Menge auf 6 mL</b>
• 1 M Tris-HCl (pH 7.5), steril	3 mL
• 1 M MgCl <sub>2</sub> , steril	300 µL
• 10 mM dNTP Mix 10	600 µL
• 1 M DTT	300 µL
• PEG-8000	1,5 g
• 100 mM NAD	300 µL

**Gibson Assembly Mastermix**

• 5x isothermer Reaktionspuffer	320 µL
• T5 Exonuclease 10 U/µL	0,64 µL
• Phusion DNA Polymerase 2 U/µL	20 µL
• Taq DNA Ligase 40 U/µL	0,16 µL
• MP-H <sub>2</sub> O	860 µL

Gibson Assembly Mastermix wurde in 1,5 mL Reaktionsgefäßen zu jeweils 15 µL aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Es wurden 50 ng des PCR-Produkts des Vektors (pHD1700) sowie des PCR-Produkts des Inserts (dTRPML) vereinigt und mit MP-H<sub>2</sub>O auf 5 µL aufgefüllt. 15 µL des Gibson Assembly Mastermix wurden auf Eis aufgetaut und in einen auf 50 °C vorgeheizten Heizblock gestellt. Anschließend wurde das DNA-Gemisch aus Vektor und Insert hinzugefügt und 60 min bei 50 °C inkubiert. 5 µL des

Reaktionsgemisches wurden nachfolgend in einer Transformation von DH5 $\alpha$  *E. coli* Zellen eingesetzt (Kapitel 2.2.1.5). Die Plasmid-DNA wurde extrahiert und mittels Sequenzierung überprüft (Kapitel 2.2.1.6).

### 2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE Puffer	Menge auf 1 L	Konzentration
• Tris-Base	242,3 g	2 M
• 99% Essigsäure	57,2 mL	1 M
• EDTA	37,2 g	0,1 M

Da in dieser Arbeit ausschließlich Plasmid-DNA und große DNA-Fragmente mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese untersucht wurden, wurden 1%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Das Agarosepulver wurde durch Erhitzen in 1x TAE Puffer gelöst und in einen Gießstand mit herausnehmbarem Kamm gegossen. 2,5  $\mu$ L der Probe wurden mit 0,5  $\mu$ L 6x Purple Gel Loading Dye gemischt und in die Taschen des Agarosegels gefüllt. Als DNA-Standard wurden 5  $\mu$ L 1 kb DNA ladder verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 130 V durchgeführt und 1x TAE als Laufpuffer verwendet. Das Gel wurde für 30 min in einem Ethidiumbromid-Bad inkubiert und unter UV-Licht die DNA detektiert.

### 2.2.1.4 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Luria-Bertani (LB)-Medium	Menge auf 1 L
• Trypton	10 g
• Hefeextrakt	5 g
• Natriumchlorid	10 g
• pH-Wert	7,0 $\pm$ 0,2

Solution I	Menge auf 100 mL	Konzentration
• 1 M CaCl <sub>2</sub> , steril	7 mL	70 mM CaCl <sub>2</sub>
• 1 M MgCl <sub>2</sub> , steril	5 mL	50 mM MgCl <sub>2</sub>

Solution II	Menge auf 100 mL	Konzentration
• 1 M CaCl <sub>2</sub> , steril	7 mL	70 mM CaCl <sub>2</sub>
• 1 M MgCl <sub>2</sub> , steril	5 mL	50 mM MgCl <sub>2</sub>
• 50% Glycerol, steril	60 mL	30% Glycerol

Für die Herstellung bzw. Vervielfältigung kompetenter *E. coli* Zellen wurden 10  $\mu$ L BL21-Gold (DE3), Rosetta-gami 2(DE3) oder DH5 $\alpha$  *E. coli* Zellen in 2 mL LB-Medium ohne Antibiotikum über Nacht bei 37 °C im Bakterienschüttler (180 - 200 rpm) inkubiert. Die Kultur wurde in 100 mL frisches LB-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm OD<sub>600</sub> = 0,5 wachsen gelassen. Die Bakteriensuspension wurde in zwei 50 mL Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 3900 rpm 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in je 20 mL Solution I resuspendiert. Die Suspensionen wurden für 1-2 Stunden auf Eis ruhen gelassen und anschließend bei 3900 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden jeweils in 1,5 mL Solution I resuspendiert und vereinigt. 3 mL Solution II wurden hinzugefügt und in 1,5 mL Reaktionsgefäße mit jeweils 50  $\mu$ L

Bakteriensuspension aliquotiert. Die Zellsösungen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.1.5 Transformation von kompetenten *E. coli* Bakterienzellen

LB-Agar	Menge auf 0,33 L
• Agar	5 g
• in LB-Medium	

Die Aufnahme von Fremd-DNA, hier von Plasmiden in *E. coli* Zellen, erfolgte durch die Hitzeschock-Methode.<sup>[120,121]</sup> 50  $\mu\text{L}$  kompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 0,5  $\mu\text{L}$  Plasmid  $\sim 40\text{ ng}$  hinzugefügt. Die Lösung wurde gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zell-Plasmid-Lösung wurde 45 s bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt und 2 min auf Eis abgekühlt. Der Lösung wurden 500  $\mu\text{L}$  LB-Medium zugesetzt und 1,5 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. 50-500  $\mu\text{L}$  der Bakteriensuspension wurden auf einer LB-Agarplatte ausplattiert. Diese enthielt zur Selektion Antibiotikum entsprechend des Antibiotikaresistenzgens, welches auf dem Plasmid codiert ist (Kanamycin 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Ampicillin 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Die Platte wurde über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### 2.2.1.6 Plasmid-DNA Extraktion und Sequenzierung

Nach erfolgreicher Transformation des Plasmids in DH5 $\alpha$  *E. coli* wurde ein Klon, welcher auf einer LB-Agarplatte mit Selektionsantibiotikum gewachsen war, mit einer sterilen Pipettenspitze in ein Kulturröhrchen überführt. Das Kulturröhrchen beinhaltete 5–7 mL LB-Medium mit Selektionsantibiotikum. Das Röhrchen wurde im  $\sim 45^{\circ}$  Winkel über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Bakterienrührer (180–200 rpm) inkubiert und anschließend bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 3900 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach der Anleitung und mit Hilfe des E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Mini Kit aufgeschlossen und die Plasmid-DNA extrahiert. Die erhaltenen Plasmide wurde von der Firma StarSEQ, Mainz sequenziert.

## 2.2.2 Proteinexpression und Aufreinigung

### 2.2.2.1 Herstellung einer Vorkultur

Im Anschluss an eine erfolgreiche Transformation (Kapitel 2.2.1.5) eines Plasmids in BL21-Gold (DE3) *E. coli* Zellen wurden für eine Vorkultur mehrere Klone mit einer sterilen Pipettenspitze in einen Kolben mit 50–200 mL LB-Medium, welches das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielt, überführt. Die Vorkultur wurde über Nacht im Bakterienrührer bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $\sim 180\text{ rpm}$  inkubiert.

### 2.2.2.2 Proteinexpression in unmarkiertem Medium

2xYT	Menge auf 1 L
• Trypton/Pepton	20 g
• Hefeextrakt	10 g
• Natriumchlorid	10 g
• pH-Wert	7,5 (mit 4 M NaOH eingestellt)

950 mL 2xYT-Medium, mit Selektionsantibiotikum, wurden in einem Schikanekolben vorgelegt und 50 mL der Bakteriensuspension aus der Vorkultur hinzugefügt. Der Kolben wurde im Bakterienrührer bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 120–130 rpm bis zu einer  $\text{OD}_{600} = 0,7 - 1,0$  inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde für 15 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Anschließend wurde die Proteinexpression

durch die Zugabe von 0,15 mM IPTG (1,5 mL 100 mM IPTG Stammlösung) gestartet. Die Proteinexpression erfolgte bei 18 °C für Tpx und Tpx-Mutanten oder bei 16 °C für PxIII, und 120 – 130 rpm für maximal 20 h im Bakterienschüttler. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min geerntet und in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Das Zellpellet wurde entweder sofort aufgeschlossen und das Protein aufgereinigt (Kapitel 2.2.2.4) oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Proteinaufreinigung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2.3 Proteinexpression in Isotopenmarkiertem Medium

<b>Minimalmedium</b>	<b>Menge auf 1 L</b>
• $\text{KH}_2\text{PO}_4$	15 g
• $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	33,9 g
• $\text{NH}_4\text{Cl}$	1 g (0,75 g bei $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ )
• NaCl	2,5 g
• 20% Glucose, steril	100 mL (2 g $^{13}\text{C}_6\text{-D-Glucose}$ bei $^{13}\text{C}$ Markierung)
• 1 M $\text{MgSO}_4$ , steril	4 mL
• 10 mM $\text{FeCl}_3$ , steril filtriert	1 mL
• Magic Mix, steril filtriert	2 mL
• Trace Elements (ohne Trp), steril filtriert	10 mL

Zur Herstellung des **Magic Mix** wurde eine Tablette Centrum gemörsert und in 40 mL MP- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Die Suspension wurde 15 min bei 3900 rpm und 22 °C zentrifugiert und der Überstand steril filtriert.

<b>Trace Elements</b>	<b>Menge auf 10 mL</b>
• $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2 mg
• $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2 mg
• $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2 mg
• Tryptophan <sup>#</sup>	50 mg
• Thiamin Hydrochlorid	50 mg
• Nicotinsäure	50 mg
• Biotin	1 mg

<sup>#</sup> wurde nicht eingesetzt, wenn alle Aminosäuren bzw. Tryptophan isotopenmarkiert werden sollten.

<b>Definiertes Medium</b>	<b>Menge auf 1 L</b>
• Alanin	0,5 g
• Arginin	0,4 g
• Aspartat	0,4 g
• Cystein	0,05 g
• Glutamin	0,4 g
• Glutamat	0,65 g
• Glycin	0,55 g
• Histidin	0,1 g
• Isoleucin	0,23 g
• Leucin	0,23 g
• Lysin Hydrochlorid	0,42 g
• Methionin	0,25 g

• Phenylalanin	0,13 g
• Prolin	0,1 g
• Serin	2,1 g
• Threonin	0,23 g
• Tyrosin	0,17 g
• Valin	0,23 g
• Adenin	0,5 g
• Guanosin	0,65 g
• Thymin	0,2 g
• Uracil	0,5 g
• Cytosin	0,2 g
• Natriumacetat	1,5 g
• Bernsteinsäure	1,5 g
• NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g
• NaOH	0,85 g
• K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,5 g
• 20% Glucose, steril	100 mL
• 1 M MgSO <sub>4</sub> , steril	4 mL
• 10 mM FeCl <sub>3</sub> , steril filtriert	1 mL
• Magic Mix, steril filtriert	2 mL
• Trace Elements, steril filtriert	10 mL

Für eine einheitliche <sup>15</sup>N-Markierung eines Proteins wurde Minimalmedium mit 0,75 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl als Medium für die Proteinexpression verwendet. Einer <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N Markierung des Proteins wurde dem Minimalmedium neben 0,75 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl auch 2 g <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-D-Glucose hinzugefügt. Die Isotopenmarkierung spezifischer Aminosäuren erfolgte in definiertem Medium<sup>[122]</sup>, welches <sup>15</sup>N-Lysin, <sup>15</sup>N-Arginin, <sup>15</sup>N-Tryptophan, <sup>15</sup>N-Cystein oder <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N-Prolin und alle anderen Aminosäuren in unmarkierter Form enthielt.

Es wurden 50 – 100 mL der Vorkultur 10 min bei 3900 rpm und RT zentrifugiert und das Zellpellet in 1 - 2 L definiertem oder Minimalmedium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde analog der Expression in unmarkiertem Medium weiter behandelt (siehe Kapitel 2.2.2.2).

#### 2.2.2.4 Proteinaufreinigung

##### Puffer A

- 50 mM NaP<sub>i</sub>
- 300 mM NaCl
- pH 7,5

### **Puffer B**

- 50 mM NaP<sub>i</sub>
- 300 mM NaCl
- 500 mM Imidazol
- pH 7,5

### **Tpx-Puffer und Dialysepuffer**

- 25 mM NaP<sub>i</sub>
- 150 mM NaCl
- pH 7,5

Ein Zellpellet, welches bei -20 °C gelagert wurde, wurde zuerst auf Eis aufgetaut. Das Zellpellet wurde in 75 mL Puffer A resuspendiert und 50 µM PMSF (37,5 µL 100 mM PMSF Stammlösung), jeweils eine Spatelspitze RNase, DNase und Lysozym, sowie 50 µL Proteaseinhibitorlösung hinzugefügt. Die Bakterienzellen wurden auf Eis 5 – 7x für 1:30 min bei 5x 10% cycle mit einer Stärke von ~60% mit Ultraschall aufgeschlossen. Zwischen den Ultraschalleinheiten wurde jeweils etwa 1 min pausiert, um den Fortschritt des Aufschlusses zu beurteilen, die Lösung zu mischen und um eine Überhitzung der Lösung zu vermeiden. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 rpm für mindestens 45 min abgetrennt. Die nachfolgenden Aufreinigungsschritte wurden für Tpx und Tpx-Mutanten bei Raumtemperatur und für PxIII bei 4 °C durchgeführt. Der Überstand wurde zwei Mal auf eine 5 – 10 mL NiNTA Affinitätssäule gegeben, um das His<sub>6</sub>-tragende Fusionsprotein (Trx-His<sub>6</sub>-Tpx oder Trx-His<sub>6</sub>-PxIII) zu binden. Die Affinitätssäule wurde mit jeweils 2x 5 Säulenvolumen (CV) Puffer A und 2x 5 CV Puffer A mit 10 mM Imidazol (zusammengesetzt aus 49 mL Puffer A und 1 mL Puffer B) gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. Das Fusionsprotein wurde in sechs Elutionsschritten mit Puffer A mit 200 mM Imidazol (zusammengesetzt aus 6 mL Puffer A und 4 mL Puffer B) von der Affinitätssäule eluiert. Mittels Nanodrop wurden die Absorptionen der einzelnen Elutionsfraktionen bei 280 nm bestimmt und die Proteinkonzentration des Fusionsproteins mittels des entsprechenden Extinktionskoeffizienten (siehe Kapitel 2.1.9) errechnet. Elutionen, deren Abs<sub>280</sub> ≥ 0,01 AU waren, wurden vereinigt. Der Trx-His<sub>6</sub> Teil des Fusionsproteins wurde während einer Dialyse gegen Dialysepuffer und in Anwesenheit von His<sub>6</sub>-TEV-Protease (molekulares Verhältnis TEV-Protease:Proteinkonzentration 1:40) von Tpx oder PxIII über Nacht abgespalten. Nach der Restriktion des Fusionsproteins wurde eine zweite NiNTA Affinitätssäule durchgeführt, um His<sub>6</sub>-TEV-Protease, Trx-His<sub>6</sub> und ungeschnittenes Fusionsprotein von freiem Tpx oder PxIII abzutrennen. Dafür wurde die Proteinlösung auf eine zweite NiNTA Affinitätssäule, welche das doppelte Volumen der ersten Affinitätssäule hatte, zwei Mal aufgetragen. Der Durchfluss enthielt Trx-His<sub>6</sub>-freies Tpx oder PxIII. Die Säule wurde mit 6x 1 CV Tpx-Puffer mit 5 mM Imidazol (zusammengesetzt aus 24 mL Puffer A, 1 mL Puffer B und 25 mL MP-H<sub>2</sub>O) gewaschen. Die Abs<sub>280</sub> der einzelnen Waschschrte wurden mittels Nanodrop bestimmt und Fraktionen, welche eine Absorption größer 0,01 AU hatten, sowie der Durchfluss wurden vereinigt. Die Proteinlösung wurde aufkonzentriert und ein finaler Aufreinigungsschritt mit Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Die Reinheit der Proteine wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

## 2.2.3 Biochemische und Biophysikalische Analysemethoden

### 2.2.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

4x SDS-Ladepuffer	Menge in 50 mL	Konzentration
• 1 M Tris pH 6,8	10 mL	200 mM
• 1 M DTT	20 mL	400 mM
• SDS	4 g	8% (w/v)
• Bromphenolblau	0,2 g	0,4% (w/v)
• Glycerol	20 mL	40%

Für eine spätere Coomassie-Färbung wurden die Proteinproben 1:4 mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt; diese hatten eine finale Konzentration von 25  $\mu$ M. Es wurden jeweils 10  $\mu$ L eingesetzt, was zu einer Proteinmenge von 4 ng für Tpx und 4,6 ng für PxIII führt. Zellproben für eine spätere Western Blot-Analyse wurde ebenfalls 1:4 4x SDS-Ladepuffer hinzugefügt und eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ $\mu$ L hergestellt. Die Zellproben wurden 5 min bei 95 °C vor dem Auftragen auf das SDS-Gel erhitzt. Von jeder Zellprobe wurden 10  $\mu$ L verwendet und somit  $5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt.

Trenngel	Menge in 40 mL (für 8 Gele)	
	12%	15%
• 30% Acrylamid-Mix	16 mL	20 mL
• 1,5 M Tris pH 8,8	10 mL	10 mL
• MP-H <sub>2</sub> O	13,2 mL	9,2 mL
• 10% SDS	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L
• 10% APS	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L
• TEMED	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L

5% Sammelgel	Menge in 12 mL (für 8 Gele)
• 30% Acrylamid-Mix	2,1 mL
• 1 M Tris pH 6,8	1,5 mL
• MP-H <sub>2</sub> O	8,2 mL
• 10% SDS	120 $\mu$ L
• 10% APS	120 $\mu$ L
• TEMED	12 $\mu$ L

Für das Gießen der SDS-Gele wurde das Mini-PROTEAN® Tetra Cell System von BioRad verwendet. 15%ige SDS-Gele wurden für Proteinproben verwendet und 12%ige SDS-Gele für Zellproben mit anschließendem Western Blot. Jedes SDS-Gel wurde mit einem 5%igen Sammelgel hergestellt.

10x SDS-Laufpuffer	Menge in 1 L	Konzentration
• Tris-Base	30 g	0,25 M
• Glycin	144 g	1,92 M
• SDS	100 g	1%

Die SDS-PAGE wurde in einer Elektrophoresekammer, gefüllt mit 1x SDS-Laufpuffer bei 100-190 V und Raumtemperatur, durchgeführt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Lauffront das Ende

des SDS-Gels erreichte. Als Proteinstandard fungierte der Precision Plus Protein™ Dual Color Standards. Die Proteine wurde durch Coomassie Färbung oder Western Blot sichtbar gemacht (siehe Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.3).

### 2.2.3.2 Coomassie Färbung

<b>Coomassie Färbelösung</b>	<b>Menge in 500 mL</b>
• Coomassie Brillant Blau R250	0,5 g
• Ethanol abs.	200 mL
• Phosphorsäure, 85% in Wasser	10 mL
• Wasser	290 mL

<b>Coomassie Entfärbelösung</b>	<b>Menge in 500 mL</b>
• Ethanol abs.	200 mL
• Phosphorsäure, 85% in Wasser	10 mL
• Wasser	290 mL

Die SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese in Coomassie Färbelösung kurz erhitzt und für ~30 min oder über Nacht auf einem Gelschüttler inkubiert. Die Färbelösung wurde anschließend entfernt und die Gele mit Coomassie Entfärbelösung so lange gewaschen, bis die Proteinbanden klar erkennbar und der Hintergrund entfärbt waren. Für eine kurzfristige Lagerung wurden die Gele in Wasser gelagert. Die SDS-Gele wurden eingescannt und für eine dauerhafte Konservierung im Vakuum getrocknet.

### 2.2.3.3 Western Blot-Analyse

<b>Tankblotpuffer</b>	<b>Menge in 1 L</b>
• Tris-Base	3,0 g
• Glycin	14,4 g
• Ethanol abs.	200 mL

Die zu verwendende 0,45 nm PVDF Membran wurde auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten (8,5x6 cm) und in 100% Methanol aktiviert. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das SDS-Gel mit der aktivierten PVDF Membran in einem Tetra Blotting Modul der Mini-PROTEAN® Tetra Cell laut Herstellerangaben platziert. Der Elektrophoresekammer wurde außerdem ein Kühlakku sowie ein Rührfisch hinzugefügt und die Kammer mit Tankblotpuffer befüllt. Das Blotting wurde für 1 h bei 110 V auf einem Magnetrührer unter konstantem Rühren des Rührstabes durchgeführt.

<b>10x PBS Puffer</b>	<b>Menge in 1 L</b>	<b>Konzentration</b>
• NaCl	80 g	137 mM
• KCl	2,0 g	2,7 mM
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O	14,4 g	10 mM
• KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	2,4 g	1,8 mM
• pH 7,4		

<b>PBS/T</b>	<b>Menge in 500 mL</b>
• 10x PBS Puffer	50 mL
• Tween20	0,5 g
• Wasser	450 mL

Die Membran wurde in 5% Milchpulver in PBS/T geschwenkt und nachfolgend 1 h bei Raumtemperatur in 5% Milchpulver in PBS/T auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde über Nacht in der Erstantikörper-Lösung (in 1% Milchpulver in PBS/T) unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Der Antikörper wurde entfernt, die Membran in PBS/T geschwenkt und anschließend 3x 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Der Membran wurde die Zweitantikörper-Lösung (in PBS/T) hinzugefügt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper-Lösung wurde entfernt und die Membran 3x 10 min in PBS/T gewaschen. Die Membran wurde mit der Entwicklerlösung Roti-Lumin nach Herstellerangaben behandelt und die Chemolumineszenz der Banden detektiert.

#### 2.2.3.4 Gekoppelter Aktivitätsassay der Peroxid-Entgiftungs-Kaskade (Px-Assay)

##### TR-Assaypuffer

- 40 mM Hepes
- 1 mM EDTA
- pH 7,5 (KOH)

##### Px-Assaypuffer

- 100 mM Tris
- 5 mM EDTA
- pH 7,5

##### Tpx-Puffer

- 25 mM NaPi
- 150 mM NaCl
- pH 7,5

Sowohl die Aktivität als auch die Inhibierung von Tpx wurde *in vitro* in einem gekoppelten Peroxidaseassay gemessen, welcher alle Komponenten der Peroxid-Entgiftungs-Kaskade enthält (Abbildung 1-5). Alle Messungen wurden an einem UV/Vis Spektrometer bei 25 °C durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden zunächst ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DMSO und Inhibitor gemischt und 5 min inkubiert, um ein Redox-Gleichgewicht zu erhalten. Die Lösung wurde in eine 10 mm Quarzküvette überführt und die Messung umgehend nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestartet. Die Abnahme von NADPH bei 340 nm wurde über 60-100 s aufgenommen und die Datenpunkte in OriginPro 8G linear gefittet, um die Steigung zu erhalten.

Vor der Bestimmung der Aktivität von Tpx oder der Inhibierung wurde die spontane Reduktion der Kaskade bestimmt. Bei dieser handelt es um die spontane Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch NADPH, unabhängig von der Aktivität der Kaskade. Der Mischung des Reaktionsansatzes, der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen, fehlt daher PxIII. Die aus den Messungen der spontanen Reduktion erhaltenen Steigungen wurden von den aus Aktivitäts- und Inhibitionsmessungen erhaltenen Steigungen abgezogen.

Stammlösungen	Volumen im Assay	Konzentration
• NADPH (4,8 mM in TR-Assaypuffer)	15 µL	360 µM
• TR (2 U/mL in TR-Assaypuffer)	10 µL	100 mU/mL
• Trypanothion (2,2 mM in MP-H <sub>2</sub> O)	10 µL	110 µM
• Tpx (50 µM in Tpx-Puffer)	20 µL	5 µM
• Px-Assaypuffer	140 µL	
• Wasserstoffperoxid (4 mM in MP-H <sub>2</sub> O)	5 µL	100 µM

Für die Messung der Aktivität von Tpx wurde das nachfolgende Pipettierschema verwendet:

Stammlösungen	Volumen im Assay	Konzentration
• NADPH (4,8 mM in TR-Assaypuffer)	15 µL	360 µM
• TR (2 U/mL in TR-Assaypuffer)	10 µL	100 mU/mL
• Trypanothion (2,2 mM in MP-H <sub>2</sub> O)	10 µL	110 µM
• Tpx (50 µM in Tpx-Puffer)	20 µL	5 µM
• PxIII (1,83 µM in Tpx-Puffer)	10 µL	92 nM
• Px-Assaypuffer	126 µL	
• DMSO	4 µL	2%
• Wasserstoffperoxid (4 mM in MP-H <sub>2</sub> O)	5 µL	100 µM

### 2.2.3.5 Gekoppelter Aktivitätsassay der Peroxid-Entgiftungs-Kaskade in Anwesenheit eines Inhibitors

Die Inhibition von Tpx wurde unter denselben Bedingungen wie die spontane Reduktion und die Aktivität in Kapitel 2.2.3.4 durchgeführt. Es wurde die nachfolgende Zusammensetzung verwendet:

Stammlösungen	Volumen im Assay	Konzentration
• NADPH (4,8 mM in TR-Assaypuffer)	15 µL	360 µM
• TR (2 U/mL in TR-Assaypuffer)	10 µL	100 mU/mL
• Trypanothion (2,2 mM in MP-H <sub>2</sub> O)	10 µL	110 µM
• Tpx (50 µM in Tpx-Puffer)	20 µL	5 µM
• PxIII (1,83 µM in Tpx-Puffer)	10 µL	92 nM
• Px-Assaypuffer	128 µL	
• Inhibitor (100 µM - 5 mM)	1-4 µL	1-50 µM
• Wasserstoffperoxid (4 mM in MP-H <sub>2</sub> O)	5 µL	100 µM

Für eine Inhibitorkonzentrationsabhängige Bestimmung der Tpx-Aktivität wurde das Reaktionsgemisch nach dem Einstellen des Gleichgewichts und vor der Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, jeweils 5 min mit dem Inhibitor inkubiert. Dabei wurden folgende molare Tpx:CFT Verhältnisse verwendet: 1:0,5 (1 µL 500 µM CFT), 1:1 (2 µL 500 µM CFT), 1:1,5 (3 µL 500 µM CFT), 1:2 (4 µL 500 µM CFT), 1:3 (1,2 µM 2,5 mM CFT), 1:5 (2 µL 2,5 mM CFT) und 1:10 (4 µL 2,5 mM CFT).

Die zeitabhängige Inhibition durch CFT und MFT wurde mit einem molaren Verhältnis von Tpx:CFT 1:1 durchgeführt. Es wurde ein sechsfacher Mastermix hergestellt, welcher alle Komponenten, ausgenommen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enthält. Der Mastermix wurde mit CFT oder MFT (12 µL 500 µM Inhibitor auf

1170  $\mu\text{L}$  Mastermix) bei 25 °C inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten (5, 10, 15, 25, 35 und 45 min) wurden 195  $\mu\text{L}$  des Mastermix in eine Küvette überführt und die Reaktion durch das Hinzufügen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gestartet.

Für die kinetische Analyse der Tpx-Inhibition durch CFT wurde ähnlich wie bei den zeitabhängigen Inhibitionsmessungen verfahren. Abweichend wurde hier ein 8,5-facher Mastermix hergestellt, ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$ , der mit CFT inkubiert wurde. Es wurden 17  $\mu\text{L}$  verschiedener CFT-Stocklösungen hinzugefügt, um 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30 und 50  $\mu\text{M}$  finale CFT-Konzentrationen zu erhalten. Es wurden 195  $\mu\text{L}$  des Mastermix in eine Küvette überführt und nach 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25 und 30 min  $\text{H}_2\text{O}_2$  hinzugefügt, um die Reaktion zu starten. Für die Messungen besonders kurzer Zeitpunkte (30 s und 1 min) wurden 193  $\mu\text{L}$  des Reaktionsansatzes (ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  und CFT) in einer Küvette vorgelegt und CFT (2  $\mu\text{L}$  verschiedener CFT-Stocklösungen, um finale Konzentrationen von 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30 und 50  $\mu\text{M}$  zu erhalten) hinzugefügt. Nach 30 s oder 1 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gestartet.

### 2.2.3.6 *Gelshift*-Assay zur Detektion freier Thiolgruppen mit mal-PEG

#### Screeningpuffer

- 20 mM HEPES
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- pH 7,5

100  $\mu\text{M}$  Tpx oder Tpx-Mutante wurde in einem finalen Volumen von 40  $\mu\text{L}$  im Screeningpuffer mit 4 mM TCEP und 200  $\mu\text{M}$  CFT (2  $\mu\text{L}$  4 mM CFT Stammlösung in DMSO) oder dem äquivalenten Volumen DMSO (2  $\mu\text{L}$ ) für 30 min bei 25 °C inkubiert. Nachfolgend wurden 10  $\mu\text{L}$  50 mM mal-PEG, im Probenpuffer gelöst sowie 50  $\mu\text{L}$  Probenpuffer hinzugefügt (100  $\mu\text{L}$  finales Volumen). Die Proteinlösung wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. In einer SDS-PAGE wurden jeweils 4  $\mu\text{g}$  Protein pro Probe in einem 15%igem SDS-Gel eingesetzt, um das Molekulargewicht zu überprüfen.

### 2.2.3.7 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie wurde mit 10  $\mu\text{M}$  Protein, wenn nicht anders angegeben, in 2,5 mM  $\text{NaPi}$  pH 7,5, 15 mM NaCl (200  $\mu\text{L}$  finales Volumen) in einer 1 mm Quarzküvette durchgeführt. Die Basislinie wurde mit einer Probe von 2,5 mM  $\text{NaPi}$  pH 7,5, 15 mM NaCl korrigiert. Die Spektren wurden mit fünf Akkumulationen, 1 nm Bandbreite und einer Lesegeschwindigkeit von 50 nm/min von 260 nm bis 190 nm aufgenommen.

### 2.2.3.8 Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die analytischen SEC-Läufe wurden mit 100  $\mu\text{M}$  Protein in einem finalen Volumen von 200  $\mu\text{L}$  in Tpx-Puffer (25 mM  $\text{NaPi}$  pH 7,5, 150 mM NaCl) an einer 24 mL hochauflösenden Chromatographie-Säule (Enrich™ 70 10x300 SEC oder Superdex™ 75 Increase 10/300 GL) bei 4 °C und einer Flussrate von 0,8 mL/min durchgeführt.

Reduziertes Tpx wurde durch die Zugabe von 4 mM TCEP erhalten. Für SEC Läufe in Anwesenheit von CFT wurde reduziertes Tpx für 30 min bei 25 °C vorinkubiert. Es wurden die folgenden molaren Verhältnisse von Tpx:CFT verwendet: 1:0,25; 1:0,5; 1:1; 1:1,5; 1:2 und 1:3.

### 2.2.3.9 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) diente der Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_D$  des Dimerkomplexes, bestehend aus zwei Tpx-CFT-Komplexen. Der Tpx-CFT-Komplex wurde durch die Inkubation von Tpx<sup>WT</sup>, Tpx<sup>K102E</sup> und Tpx<sup>W39A</sup> mit 4 mM TCEP und einem zweifachen molaren Überschuss CFT (in DMSO gelöst) zu Tpx hergestellt. Freies CFT, DMSO und TCEP wurden mittels SEC (25 mM NaPi pH 7,5, 150 mM NaCl) entfernt. Die ITC-Experimente wurden bei 25 °C durchgeführt. Für die Dissoziationsexperimente wurde der Tpx-CFT-Komplex oder Tpx allein, als Kontrolle, in SEC-Puffer mit den folgenden Konzentrationen injiziert: Tpx<sup>WT</sup> 215 µM; Tpx<sup>WT</sup>-CFT 118 µM; Tpx<sup>W39A</sup>-CFT 277 µM und Tpx<sup>K102E</sup>-CFT 311 µM. Als weitere Kontrolle diente die Titration von Tpx<sup>WT</sup>-CFT (118 µM) in die Kammer, welche bereits Tpx<sup>WT</sup>-CFT (118 µM) enthält. Nach einer initialen Wartezeit von 120 s erfolgten 20 aufeinanderfolgende Injektionen von 2 µL alle 180 s. Für jedes Experiment wurde die Referenzkraft auf 11 µcal<sup>-1</sup> und die Rührgeschwindigkeit auf 750 rpm eingestellt. Die Thermogramme wurden unter Annahme eines Dissoziationsmodells mit Hilfe des Programms Origin7.0 ausgewertet. Es wurden jeweils drei unabhängige Titrations durchgeföhrt und die erhaltenen Werte gemittelt.

### 2.2.3.10 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Um Proteine in der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) betrachten zu können, benötigen diese Atome deren Kernspin ungleich null ist. Hierfür wurden Isotope des Stickstoffs <sup>15</sup>N oder Kohlenstoffs <sup>13</sup>C in die Proteine eingeföhrt. Dies erfolgte durch die Kultivierung der Bakterien während der Proteinexpression im Medium (siehe Kapitel 2.2.2.3), welches isotonenmarkierte Glukose oder Ammoniumchlorid als einzige Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle enthält. Des Weiteren konnten die Inhibitoren CFT und MFT NMR-spektroskopisch betrachtet werden, da der Phenylring mit einem Fluor <sup>19</sup>F, einem NMR-aktiven Kern, substituiert ist (Abbildung 1-11).

Jede NMR-Probe hatte ein finales Volumen von 500 µL in 25 mM NaPi pH 7,5, 150 mM NaCl und wurde mit 10% D<sub>2</sub>O versetzt. Alle Spektren wurden bei 298 K aufgenommen. Die aufgenommenen Spektren, sowie der Experimenttyp, das Pulsprogramm etc. sind Tabelle 2-3 zu entnehmen.

Eine Zuordnung der Resonanzen im <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D Spektrum, wurde mit Hilfe von <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N markierten Proben und standardisierten Triple Resonanzpulssequenzen durchgeföhrt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von CARRA<sup>[113]</sup>. Die Betrachtung, Prozessierung und der Export der Spektren wurden mit Topspin durchgeföhrt.

Der Unterschied der chemischen Verschiebung zwischen zwei Resonanzen, aus unterschiedlichen <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D Spektren, die der gleichen Aminosäure zugeordnet wurden, wurde mit Gleichung 2-1 <sup>[123]</sup> berechnet:

$$\Delta\delta (^1H, ^{15}N \text{ chem. shift}) = \sqrt{\delta H^2 + \left(\frac{\delta N}{6,51}\right)^2} \quad (\text{Gleichung 2-1})$$

Für die <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N hetNOE Relaxationsmessungen wurde jeweils ein <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektrum (NONOE Spektrum) und zwei Spektren unter <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-hetNOE-Bedingungen von <sup>15</sup>N-Tpx<sup>WT</sup> aufgenommen.<sup>[124]</sup> Basierend auf der Zuordnung der NMR-Resonanzen von Tpx<sup>WT</sup>, im oxidierten und reduzierten Zustand, wurden die Integrale der Resonanzen im HSQC- und unter hetNOE-Bedingungen bestimmt. Mittels Gleichung 2-2 wurde <sup>{1H}</sup>-<sup>15</sup>N-hetNOE aus zwei Messreihen bestimmt. Dies wurde jeweils im oxidierten und reduzierten Zustand durchgeföhrt.

$$\{^1H\}\text{-}^{15}N\text{-hetNOE} = \frac{\int \text{Resonanzintensität hetNOE}}{\int \text{Resonanzintensität NONOE}} \quad (\text{Gleichung 2-2})$$

Für die Bestimmung der Halbwertszeit des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes wurde oxidiertes <sup>15</sup>N-Tpx<sup>WT</sup> mit einem 1,5-fachen Überschuss T(SH)<sub>2</sub> versetzt. Es wurden <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC-Spektren mit jeweils einer Aufnahmedauer von 45 min über einen Zeitraum von 11,25 h nach der T(SH)<sub>2</sub>-Zugabe aufgenommen. Die Integrale der NH-Resonanzen von vier Aminosäuren, welche im T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand verschwinden, wurden mittels Topspin bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Des Weiteren wurden von fünf Aminosäuren die Unterschiede der NH-Resonanzen zwischen dem oxidierten Zustand und den verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von T(SH)<sub>2</sub> mit Gleichung 2-1 bestimmt. Die Unterschiede wurden gegen die Zeit aufgetragen. Die sigmoidalen Kurven der Auftragung der Integrale sowie der  $\Delta\delta$  Unterschiede wurden mittels GraphPad Prism gefittet und die Halbwertszeit des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex für die einzelnen Aminosäuren erhalten.

Für die <sup>19</sup>F NMR-Messungen des Inhibitors CFT, gebunden an Tpx, wurde Tpx mit 4 mM TCEP reduziert und 30 min bei 25 °C mit CFT in einem 1:3 molaren Tpx:CFT Verhältnis inkubiert. Die Probe wurde mittels SEC aufgetrennt, um freies CFT zu entfernen. Fraktionen, welchen den Tpx-CFT-Komplex enthielten, wurden vereinigt und aufkonzentriert.

Tabelle 2-3 Durchgeführte NMR Messungen mit Markierung der Probe, Konzentration in  $\mu\text{M}$ , der Redox-Zustand der Probe und der Probe zugesetzte Substanzen, die Art des Experiments, das verwendete Pulsprogramm und die Frequenz des Spektrometers in MHz. Außerdem sind für die 1D  $^{19}\text{F}$ -Messungen die Anzahl der Scans (ns) angegeben.

Probe/Markierung	Konzentration	Redox-Zustand/Zusatz	Experimenttyp	Pulsprogramm	Frequenz
$^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ Tpx <sup>WT</sup>	345 $\mu\text{M}$	ox	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz
			H(CCCO)NH	hccconhgp3d3	600 MHz
			HNCO	hncogpwg3d	600 MHz
			HNCA	hncagpwg3d	600 MHz
			HNCACO	hncacogpwg3d	600 MHz
			HNCACB	hncacbgpwg3d	600 MHz
			HBHA(CBCACO)NH	hbhaconhgpwg3d	600 MHz
			$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ NOESY-HSQC	noesyhsqcetgpsi3d	600 MHz
	255 $\mu\text{M}$	red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP)	HNHA	hnhagp3d	600 MHz
			$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz
			HNCO	hncogpwg3d	600 MHz
			HNCACB	hncacbgpwg3d	600 MHz
			HNCA	hncagpwg3d	600 MHz
			HBHA(CBCACO)NH	hbhaconhgpwg3d	600 MHz
$^{15}\text{N}$ -Lys Tpx <sup>WT</sup>	153 $\mu\text{M}$	ox	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	800 MHz
		red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP)	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	800 MHz
$^{15}\text{N}$ -Arg Tpx <sup>WT</sup>	300 $\mu\text{M}$	ox	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz
		red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP)	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz
$^{15}\text{N}$ -Trp, $^{13}\text{C}$ $^{15}\text{N}$ -Pro Tpx <sup>WT</sup>	338 $\mu\text{M}$	ox	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz
		red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP)	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz
			HNCO	hncogpwg3d	600 MHz
	214 $\mu\text{M}$	ox	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz

$^{13}\text{C}$ $^{15}\text{N}$ -Cys, $^{13}\text{C}$ $^{15}\text{N}$ -Pro Tpx <sup>WT</sup>			HNCO	hncogpwg3d	600 MHz		
			HNCA	hncagpwg3d	600 MHz		
			HNCACB	hncacbpgwg3d	600 MHz		
			$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC	hsqctgp	600 MHz		
		red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP)			$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpph	600 MHz
					HNCO	hncogpwg3d	600 MHz
					HNCA	hncagpwg3d	600 MHz
					HNCACB	hncacbpgwg3d	600 MHz
			$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC	hsqctgp	600 MHz		
$^{15}\text{N}$ Tpx <sup>WT</sup>	475 $\mu\text{M}$	ox	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpph	600 MHz		
			{ $^1\text{H}$ }- $^{15}\text{N}$ hetNOE	15Nhetnoe6_wg.ed	600 MHz		
		red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP)			$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpph	600 MHz
					{ $^1\text{H}$ }- $^{15}\text{N}$ hetNOE	15Nhetnoe6_wg.ed	600 MHz
$^{15}\text{N}$ Tpx <sup>WT</sup>	180 $\mu\text{M}$	ox	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpph	600 MHz		
		1:1,5 T(SH) <sub>2</sub> (1,1 $\mu\text{L}$ 123 mM T(SH) <sub>2</sub> )	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpph	600 MHz		
$^{15}\text{N}$ Tpx <sup>WT</sup>	300 $\mu\text{M}$	ox	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpph	600 MHz		
		Titration: 0,61 $\mu\text{L}$ ; 1,22 $\mu\text{L}$ ; 4,88 $\mu\text{L}$ ; 9,76 $\mu\text{L}$ 123 mM T(SH) <sub>2</sub>	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpph	600 MHz		
$^{15}\text{N}$ Tpx <sup>WT</sup>	150 $\mu\text{M}$	red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP)	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpph	600 MHz		
		red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP) 1% DMSO (5 $\mu\text{L}$ d6-DMSO)	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpph	600 MHz		
		red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP) 225 $\mu\text{M}$ CFT (2,8 $\mu\text{L}$ 40 mM CFT) 2,18 $\mu\text{L}$ d6-DMSO	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpph	600 MHz		
$^{15}\text{N}$ Tpx <sup>WT</sup>	250 $\mu\text{M}$	red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP)	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ Best-Trosy-HSQC	b_trosyetz3gpsi.2	600 MHz		
		red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP) 375 $\mu\text{M}$ MFT (4,69 $\mu\text{L}$ 40 mM MFT)	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ Best-Trosy-HSQC	b_trosyetz3gpsi.2	600 MHz		

## 2 Material und Methoden

$^{13}\text{C } ^{15}\text{N Tpx}^{\text{WT}}$	250 $\mu\text{M}$	ox	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ Best-Trosy-HSQC	b_trosyetz3gpsi.2	600 MHz			
		1:2,4 T(SH) <sub>2</sub> (1,55 $\mu\text{L}$ 174 mM T(SH) <sub>2</sub> )	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ Best-Trosy-HSQC	b_trosyetz3gpsi.2	600 MHz			
		1:2,4 T(SH) <sub>2</sub> (1,55 $\mu\text{L}$ 174 mM T(SH) <sub>2</sub> ) 1:1,2 CFT (3,375 $\mu\text{L}$ 40 mM CFT)	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ Best-Trosy-HSQC	b_trosyetz3gpsi.2	600 MHz			
		1:2,4 T(SH) <sub>2</sub> (1,55 $\mu\text{L}$ 174 mM T(SH) <sub>2</sub> ) 1:1,2 MFT (3,375 $\mu\text{L}$ 40 mM MFT)	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ Best-Trosy-HSQC	b_trosyetz3gpsi.2	600 MHz			
$^{13}\text{C } ^{15}\text{N Tpx}^{\text{C40S}}$	200 $\mu\text{M}$	apo	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ Best-Trosy-HSQC	b_trosyetz3gpsi.2	600 MHz			
			Best-Trosy HNCA	b_trhncagp3d.2	600 MHz			
			Best-Trosy HNCO	b_trhncogp3d.2	600 MHz			
			Best-Trosy HNCACB	b_trhncacbgp3d.2	600 MHz			
$^{15}\text{N Tpx}^{\text{C40S}}$	134 $\mu\text{M}$	ox	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz			
			Titration: 0,27 $\mu\text{L}$ ; 0,54 $\mu\text{L}$ ; 2,17 $\mu\text{L}$ 123 mM T(SH) <sub>2</sub>	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz		
			$^{13}\text{C } ^{15}\text{N Tpx}^{\text{W39A}}$	200 $\mu\text{M}$	ox	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz
						HNCO	hncogp3d	600 MHz
$^{13}\text{C } ^{15}\text{N Tpx}^{\text{W39A}}$	200 $\mu\text{M}$	2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP)	HNCA	hncagp3d	600 MHz			
			$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ Best-Trosy-HSQC	b_trosyetz3gpsi.2	700 MHz			
$^{13}\text{C } ^{15}\text{N Tpx}^{\text{W39A}}$	200 $\mu\text{M}$	2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP)	Best-Trosy HNCACB	b_trhncacbgp3d.2	700 MHz			
			$^{15}\text{N Tpx}^{\text{W39A}}$	90 $\mu\text{M}$	ox	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz
$^{15}\text{N Tpx}^{\text{W39A}}$	90 $\mu\text{M}$	ox	red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP)	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz		
			0,62 $\mu\text{L}$ ; 2,59 $\mu\text{L}$ 174 mM T(SH) <sub>2</sub>	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz		
			red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP)	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz		
			1:1,5 CFT (1,7 $\mu\text{L}$ 40 mM CFT)	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz		
$^{15}\text{N Tpx}^{\text{W70A}}$	75 $\mu\text{M}$	ox	red 2 mM TCEP (1 $\mu\text{L}$ 1 M TCEP)	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz		
			1:2,4 T(SH) <sub>2</sub> (0,54 $\mu\text{L}$ 174 mM T(SH) <sub>2</sub> )	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz		
			$^{15}\text{N Tpx}^{\text{W142A}}$	180 $\mu\text{M}$	ox	$^1\text{H-}^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gpqh	600 MHz

		red 4 mM TCEP (2 $\mu$ L 1 M TCEP)	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gp-ph	600 MHz
		1,76 $\mu$ L; 7,3 $\mu$ L 123 mM T(SH) <sub>2</sub>	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC	fhsqcf3gp-ph	600 MHz
Tpx <sup>WT</sup> -CFT	750 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 512	600 MHz
	500 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 512	600 MHz
	250 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 512	600 MHz
	100 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 2k	600 MHz
	50 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 4k	600 MHz
	10 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 50k	600 MHz
Tpx <sup>W39A</sup> -CFT	700 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 64	600 MHz
	350 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 64	600 MHz
	200 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 128	600 MHz
	100 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 256	600 MHz
	50 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 256	600 MHz
	25 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 512	600 MHz
Tpx <sup>K102E</sup> -CFT	750 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 64	600 MHz
	500 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 64	600 MHz
	200 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 128	600 MHz
	100 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 256	600 MHz
	50 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 512	600 MHz
	20 $\mu$ M		$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 512	600 MHz
CFT	100 $\mu$ M	3% DMSO	$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 1k	600 MHz
MFT	100 $\mu$ M	3% DMSO	$^{19}\text{F}$ 1D	zgT2.ed; ns = 1k	600 MHz

## 2.2.4 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank mit laminarem Fluss durchgeführt. Alle Materialien und Zubehör wurden vor Verwendung autoklaviert oder desinfiziert.

### 2.2.4.1 Kultivierung von Blutstrom *T. b. brucei* Parasitenzellen

Grundmedium HMI-9	Menge auf 10 L	Konzentration
• Iscove's modifiziertes Dulbeccos Medium	176,6 g	17,66 g/L
• NaHCO <sub>3</sub>	30,24 g	36 mM
• Hypoxanthin	1,36 g	1 mM
• Natriumpyruvat	1,1 g	1 mM
• Thymidin	0,39 g	161 µM
• Bathocoprinsulfonat	0,28 g	49 µM

Die Komponenten wurden in 10 L MP-H<sub>2</sub>O gelöst und der pH-Wert auf 7-7,5 mit 4 M NaOH eingestellt. Das Medium wurde zur längeren Lagerung in 450 mL oder 900 mL in Flaschen aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Komplettiertes HMI-9 Medium	Menge auf 0,5 L	Konzentration
• Grundmedium	450 mL	90% (v/v)
• Hitzeinaktiviertes FCS <sup>#</sup>	50 mL	10% (v/v)
• Penicillin-Streptomycin (5000 U/mL)	5 mL	50 U/mL
• β-Mercaptoethanol (14,27 M)	7 µL	200 µM
• L-Cystein	93 mg/5 mL MP-H <sub>2</sub> O	150 mM
• Phleomycin (2,5 mg/mL)	40 µL	0,2 µg/mL

<sup>#</sup>Fetales Kälberserum wurde für 1 h bei 60 °C inaktiviert.

Das komplettierte HMI-9 Medium musste steril filtriert werden, da es nicht autoklaviert werden konnte, und wurde bei 4 °C gelagert.

BS449 WT Zellen wurden in 5 mL HMI-9 Medium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> sowie gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die Kultivierung von BS449 *d*TRPML OE Zellen wurde dem Medium 1 µL Hygromycin (50 mg/mL Stammlösung) auf 5 mL HMI-9 Medium für eine finale Konzentration von 10 µg/mL als Selektionsmedium hinzugefügt. Es wurden Zellkulturflaschen mit einer durchlässigen Kappe verwendet: für ein Zellkulturvolumen von 5-10 mL wurde eine 50 mL Zellkulturflasche, bei 10-30 mL eine 250 mL und bei 50 mL Zellkulturvolumen eine 500 mL Zellkulturflasche verwendet. Die Zellen wurden passagiert, wenn sie eine Zelldichte von 1-4 x 10<sup>6</sup> Zellen/mL erreicht hatten. Die Zellzahlen wurden mittels Neubauer Zählkammer bestimmt.

### 2.2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Glycerolstocks

3 x 10<sup>7</sup> Zellen wurden bei 2000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in 5 mL HMI-9 Medium mit 10% Glycerol (steril filtriert) vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in kryogene Lagergefäße überführt, jeweils 1 mL pro Gefäß und bei -80 °C oder in Stickstofftanks gelagert.

Die eingefrorenen 1 mL Zellsuspensionen wurden bei RT aufgetaut und in einer 50 mL Zellkulturflasche 4 mL konditioniertem Medium hinzugefügt. Für die Herstellung von konditioniertem Medium wurde komplettiertes HMI-9 Medium ~24 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden wie oben (2.2.4.1) beschrieben kultiviert.

### 2.2.4.3 Transfektion von Blutstrom *T. b. brucei* Parasitenzellen

Transfektionspuffer	Menge in 100 mL	Konzentration
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12 H <sub>2</sub> O	613 mg	30 mM
• NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	827 mg	60 mM
• KCl	37 mg	5 mM
• HEPES	1192 mg	50 mM
• CaCl <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O	2,2 mg	0,15 mM

HEPES, Phosphatsalze und KCl wurden einwogen und in 90 mL MP-H<sub>2</sub>O gelöst. Der pH-Wert wurde mit 300 µL 5 M KOH auf pH 7,3 eingestellt. Das benötigte CaCl<sub>2</sub> wurde hinzugefügt, das Volumen auf 100 mL mit MP-H<sub>2</sub>O aufgefüllt und autoklaviert. Da es nach dem Autoklavieren noch zu einem feinen weißen Niederschlag kam, wurde die Lösung vor Gebrauch homogenisiert.

10 µg des Plasmids (pHD1700\_dTRPML) in 20 µL wurden mit Hilfe von NotI in CutSmart Buffer für 2 h bei 37 °C geschnitten. Der Verdau wurde mit 100 µL 4 M Ammoniumacetat und 500 µL Ethanol abs. gemischt und für 2 h auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min verworfen und 100 µL 70% Ethanol als Waschschrift hinzugefügt. Die Lösung wurde für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde unter der Sterilbank über Nacht getrocknet und in 100 µL Transfektionspuffer<sup>[125]</sup> wieder gelöst. 4x10<sup>7</sup> BS449 WT Zellen wurden geerntet und in ~200 µL HMI-9 Medium resuspendiert. Die Plasmidlösung wurde der Zelllösung vorsichtig hinzugefügt und in eine Elektroporationsküvette überführt, unter Vermeidung möglicher Blasen. Die Küvette wurde in dem Amaxa Nucleofector System platziert und das vorinstallierte Programm X-001 verwendet. Die transfizierten Zellen wurden mit 18 mL konditioniertem

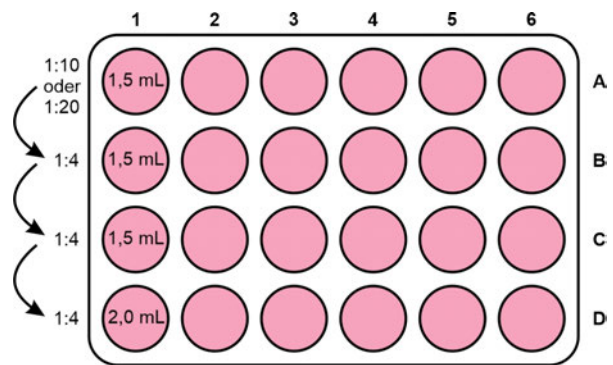


Abbildung 2-1 Verdünnungsschema für die Transfektion von Parasitenzellen. Für jede Transfektion wurden zwei 24-Wellplatten angesetzt. Die Verdünnung in der ersten Zeile A betrug 1:10 oder 1:20.

Medium (Medium ohne Zusätze wurde für 24 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator vorinkubiert) mit 10 µg/mL Hygromycin, dem Selektionsantibiotikum, versetzt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden in einer 24-Wellplatte 1:10 oder 1:20 in der ersten Zeile (A) in einem finalen Volumen von 2,0 mL in konditioniertem HMI-9 Medium verdünnt (Abbildung 2-1). In Zeile B bis D wurden 1,5 mL konditioniertes Medium vorgelegt und ausgehend von Zeile A immer 500 µL in die nächste Zeile gegeben, sodass eine Verdünnung von 1:4 für die Zeilen B bis D entstand. Klone waren nach 5-10 Tagen sichtbar und wurden entsprechend 2.2.4.1 kultiviert. Hierbei konnten die Klone BS449 dTRPML OE 10B5, BS449 dTRPML OE 20B1, BS449 dTRPML OE 20B6 isoliert werden.

### 2.2.4.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie dient der Visualisierung von Zellkompartimenten und Proteinen. Zellkompartimente können auf Grund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften mit bestimmten Substanzen eingefärbt werden, wie z. B die Färbung des Zellkerns durch die Anlagerung von 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) an DNA. Proteine können mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden, welche direkt gegen das Protein oder einen proteingebundenen Tag

gerichtet sind. Die Visualisierung des Zielproteins erfolgt über einen Zweitantikörper, welcher gegen den Erstantikörper gerichtet und an ein Fluorophor gekoppelt ist.

Die Expression der ektopischen Kopie des *Drosophila melanogaster* TRPML Kanals des Klons BS449 *dTRPML* OE 20B1 (Transfektion siehe 2.2.4.3) wurde bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/mL durch Tetrazyclin ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) induziert und 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  im  $\text{CO}_2$ -Inkubator inkubiert.  $2 \times 10^6$  Zellen wurden nachfolgend in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß aliquotiert. Es wurde ein Aliquot ohne Tetrazyclin-Induktion als Kontrolle und drei Aliquots der Tetrazyclin-induzierten Zellen hergestellt. Das Schema, welche Kammer induzierte bzw. unbehandelte Zellen enthält und wie die Verteilung der Antikörper erfolgte, ist nachfolgend aufgelistet.

<p><b>Kammer 1:</b> Unbehandelte Zellen Erstantikörper:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• mTXNPx</li> <li>• cMyc</li> </ul> <p>Zweitantikörper:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alexa Fluor 594 anti-Rabbit</li> <li>• Alexa Fluor 488 anti-Guinea-Pig</li> </ul>	<p><b>Kammer 2:</b> Tetrazyclin-induzierte Zellen Erstantikörper:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• mTXNPx</li> <li>• cMyc</li> </ul> <p>Zweitantikörper:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alexa Fluor 594 anti-Rabbit</li> <li>• Alexa Fluor 488 anti-Guinea-Pig</li> </ul>
<p><b>Kammer 3:</b> Tetrazyclin-induzierte Zellen Zweitantikörper:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alexa Fluor 488 anti-Guinea-Pig</li> </ul>	<p><b>Kammer 4:</b> Tetrazyclin-induzierte Zellen: Zweitantikörper:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alexa Fluor 594 anti-Rabbit</li> </ul>

Die Trypanosomenzellen wurden für 2 min bei 8000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und das Medium verworfen. Es wurden  $500 \mu\text{L}$  einer 4%igen Paraformaldehyd/PBS (PFA/PBS) Lösung zugegeben und vorsichtig resuspendiert. Die Zelllösung wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend zweimal mit 1 mL PBS gewaschen. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen in den verbliebenen  $\sim 300 \mu\text{L}$  PBS resuspendiert. Die Kammern des Objektträgers wurden vor dem Gebrauch mit abs. EtOH gewaschen und  $300 \mu\text{L}$  PBS nachfolgend in den Kammern vorgelegt. Anschließend wurde jeder Kammer ein Aliquot mit Zellsuspension hinzugefügt. Der Objektträger wurde über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Lösung wurde aus der Kammer gegossen und  $350 \mu\text{L}$  0,2% Triton-X in PBS pro Kammer hinzugefügt. Nach 20 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Lösung entfernt und zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurde mit  $350 \mu\text{L}$  0,5% Gelatine in PBS (Blocking-Lösung) für 20 min bei Raumtemperatur geblockt. Die Blocking-Lösung wurde entfernt und  $350 \mu\text{L}$  des Erstantikörpers (Verdünnung: mTXNPx 1:1000, cMyc 1:500) in Blocking-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur den entsprechenden Kammern hinzugefügt. Die Antikörperlösung wurde entfernt und die Kammern viermal mit jeweils  $500 \mu\text{L}$  PBS für 2 min gewaschen. Unter Ausschluss von Licht wurden  $350 \mu\text{L}$  des Zweitantikörpers in Blocking-Lösung (Verdünnung: Alexa Fluor 594 anti-Rabbit 1:1000, Alexa Fluor 488 anti-Guinea-Pig 1:1000) den Kammern hinzugefügt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden die Kammern zweimal mit  $500 \mu\text{L}$  PBS für 5 min gewaschen. Den Kammern wurden  $245 \mu\text{L}$  DAPI in PBS ( $20 \mu\text{L}$  50 mg/mL in 2 mL PBS) für 5 min hinzugefügt und weitere zweimal mit  $500 \mu\text{L}$  PBS für 5 min gewaschen. Die Abtrennungen der Kammern auf dem Objektträger wurden entfernt und  $5 \mu\text{L}$  90% Glycerol in PBS pro Feld, welches vorher einer Kammer entsprach, verteilt. Die mit Glycerol-benetzte Oberfläche des Objektträgers wurde mit einem Deckglas abgedeckt und blasenfrei mit einem

handelsüblichen farblosen Nagellack versiegelt. Die Fluoreszenz Detektion erfolgte mit Hilfe eines Axiovert 200 M Mikroskop.

#### 2.2.4.5 Antitrypanosomale Aktivität von CFT und MFT gegen BSF *T. b. brucei* – ATPlite Assay

Die zu testenden Substanzen CFT und MFT wurden zu 5 mM Stammlösungen in DMSO gelöst. 50  $\mu\text{L}$  der Stammlösung wurde in einem ersten Verdünnungsschritt mit 100  $\mu\text{L}$  HMI-9 Medium versetzt (1:3 Vorverdünnung, siehe Abbildung 2-2). 25  $\mu\text{L}$  dieser Verdünnung wurde in einer separaten 96-Wellplatte mit 225  $\mu\text{L}$  Medium in Well 2 gemischt (1:10 Verdünnung). In Well 3 bis 11 wurden 120  $\mu\text{L}$  Medium vorgelegt. 120  $\mu\text{L}$  der Substanz-Medium-Suspension aus Well 2 wurden mit dem Medium in Well 3 gemischt und 120  $\mu\text{L}$  aus Well 3 in Well 4 gegeben. Dies wurde bis zu Well 11 durchgeführt, sodass sich eine konsekutive 1:2 Verdünnung ergab. Well 1 enthielt 100% DMSO und Well 12 3% DMSO in HMI-9 Medium.

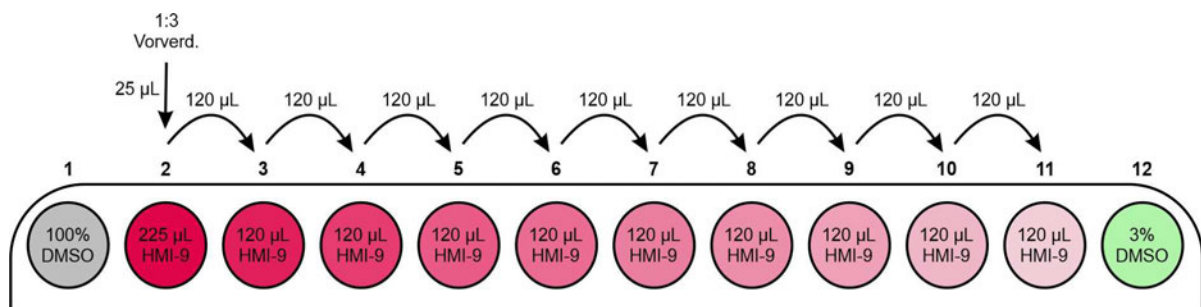
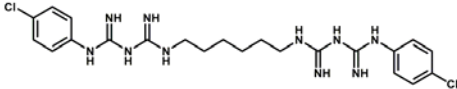
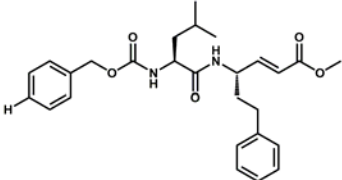
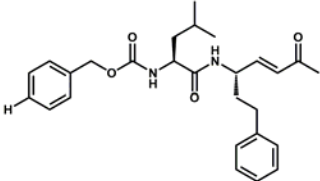


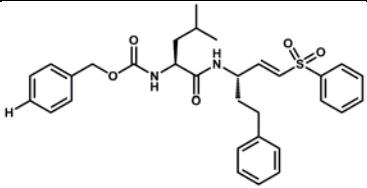
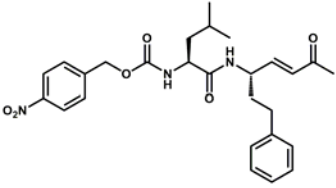
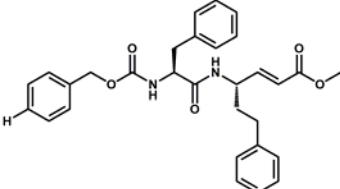
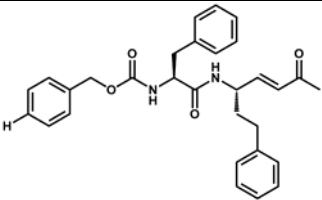
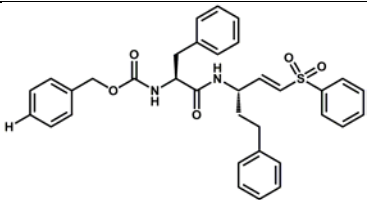
Abbildung 2-2 Pipettierschema der Substanzplatte für den ATPlite Assay. Aus der 1:3 Vorverdünnung und der 1:10 Verdünnung ergab sich in Well 2 eine 1:30 Verdünnung der Stammlösung und in Well 3 bis Well 11 eine konsekutive 1:2 Verdünnung. Well 1 beinhaltet 100% DMSO, als Positivkontrolle und Well 12 3% DMSO in HMI-9 Medium als Negativkontrolle.

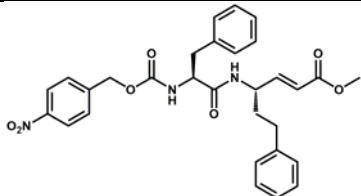
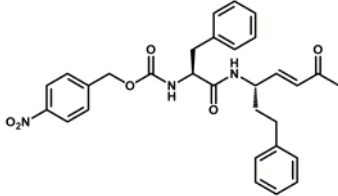
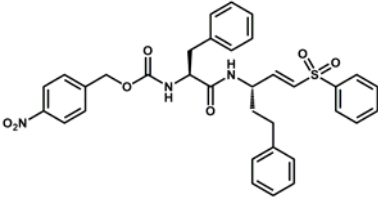
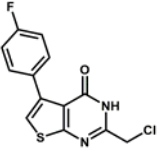
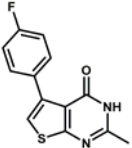
In einer weißen 96-Wellplatte wurden 90  $\mu\text{L}$  einer Zellsuspension mit 2500 Zellen/mL, die Zellzahl wurde mittels Neubauer Zählkammer bestimmt, vorgelegt. Aus der Substanzplatte wurden 10  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension hinzugefügt. Dadurch ergab sich eine DMSO-Konzentration von 10% in Well 1, welche die Positivkontrolle repräsentierte, da alle Zellen starben. Die Negativkontrolle in Well 12 enthielt eine 0,3%ige DMSO-Konzentration, welche der höchsten DMSO-Konzentration entspricht, die mit der jeweiligen zu testenden Substanz hinzugefügt wurde. Pro Substanz wurden mind. drei Reihen pro Platte und die Platten als Triplicate präpariert. Die Platten wurden für 24 h, 48 h und 72 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  im  $\text{CO}_2$ -Inkubator inkubiert. Vor der ATP Messung wurden jedem Well 50  $\mu\text{L}$  ATPlite 1 step Lösung hinzugefügt. Die Platte wurde 2 min orbital geschüttelt und die Lumineszenz bei Raumtemperatur mit einem Plattenleser bestimmt. Die gemessenen Werte wurden gegen die Substanzkonzentration aufgetragen, um eine Dosis-Wirkungs-Kurve zu erhalten. Die  $\text{EC}_{50}$ -Werte wurden mit Hilfe von GraFit bestimmt.

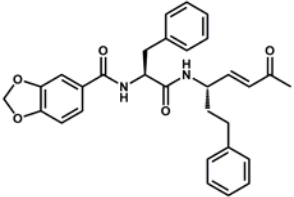
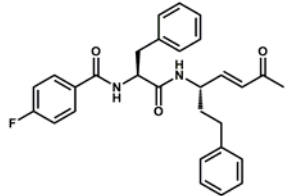
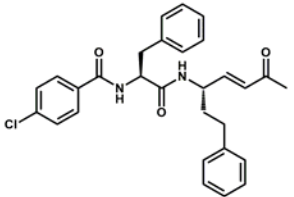
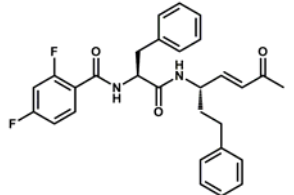
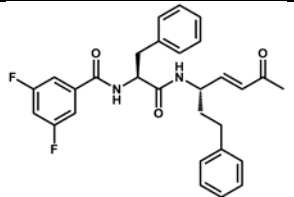
In Tabelle 2-4 sind die im Rahmen dieser Dissertation auf ihre antitrypanosomale Aktivität getesteten Substanzen zusammengefasst. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird nur auf MFT und CFT weiter eingegangen.

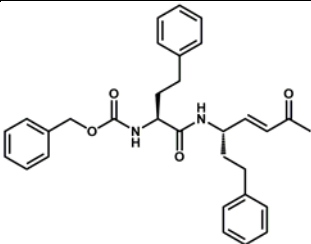
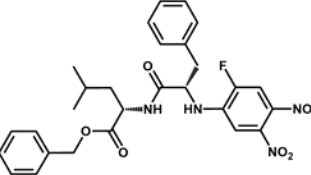
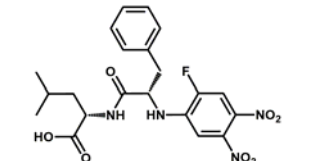
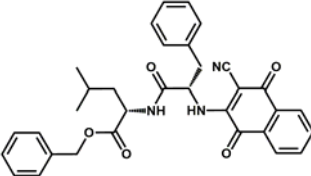
Tabelle 2-4 Im Rahmen dieser Arbeit auf ihre antitrypanosomale Aktivität mittels ATPlite Assay getestete Substanzen. Angegeben ist die Molekülstruktur, Name, IUPAC-Bezeichnung, Zielprotein in *T. brucei brucei* (soweit bekannt/vermutet), ermittelter EC<sub>50</sub>-Wert basierend auf eigenen Messungen und die entsprechende Veröffentlichung. Die vermuteten Zielproteine der Substanzen sind Rhodesain, Trypanothion-Reduktase und Tryparedoxin. Rhodesain ist eine im Lysosom lokalisierte Cysteinprotease der Papain-Familie in *Trypanosoma brucei*.<sup>[126]</sup> Trypanothion-Reduktase gehört zu den Flavoproteinen und hält Trypanothion im reduzierten Zustand (siehe Kapitel 1.4).<sup>[62]</sup> Tryparedoxin ist ein essenzielle Oxidoreduktase des Thiol-basierten Redox-Metabolismus (siehe Kapitel 1.4 und 1.5).<sup>[65,98]</sup>

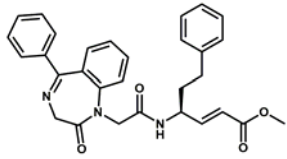
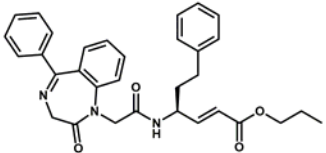
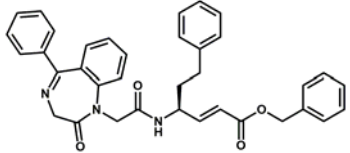
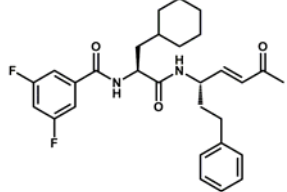
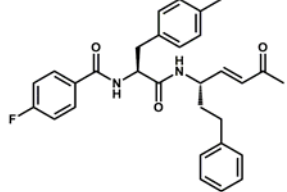
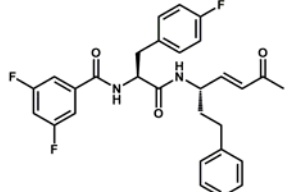
Struktur	Name	IUPAC-Bezeichnung	EC <sub>50</sub> -Wert	Zielprotein(e)	Publikation
	<b>Chlorhexidin<sup>†</sup></b>	1,1'-Hexamethylenbis[5-(4-chlorphenyl)biguanid]	0,67 ± 0,13 μM (24 h) 0,53 ± 0,16 μM (48 h) 0,57 ± 0,16 μM (72 h)	Trypanothion-Reduktase	Meiering, S.; Inhoff, O.; Mies, J.; Vincek, A.; Garcia, G.; Kramer, B.; Dormeyer, M.; Krauth-Siegel, R. L. Inhibitors of <i>Trypanosoma cruzi</i> trypanothione reductase revealed by virtual screening and parallel synthesis. <i>Journal of medicinal chemistry</i> <b>2005</b> , <i>48</i> , 4793–4802. <sup>[127]</sup>
	<b>1a; RK-46</b>	Benzyl (S)-1-((S,E)-5-(methylcarboxy)-1-phenylpent-4-en-3-ylcarbamoyl)-3-methylbutylcarbamate	6,08 ± 1,72 μM (24 h) 5,02 ± 2,67 μM (48 h)	Rhodesain	Previti, S.; Ettari, R.; Cosconati, S.; Amendola, G.; Chouchene, K.; Wagner, A.; Hellmich, U. A.; Ulrich, K.; Krauth-Siegel, R. L.; Wich, P. R.; Schmid, I.; Schirmeister, T.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Grasso, S.; Zappalà, M. Development of Novel Peptide-Based Michael
	<b>1b; RK-50</b>	Benzyl ((S)-4-Methyl-1-oxo-1-(((S,E)-6-oxo-1-phenylhept-4-en-3-yl)amino)pentan-2-yl)carbamate	3,85 ± 2,61 μM (24 h) 3,20 ± 1,77 μM (48 h)		

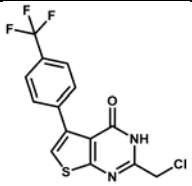
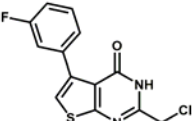
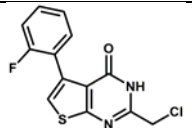
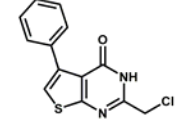
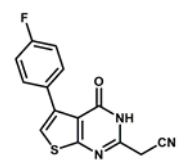
	<b>1c; RK-54</b>	Benzyl (S)-1-((S,E)-5-Phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-ylcarbamoyl)-3-methylbutylcarbamate	2,50 ± 0,46 μM (24 h) 2,62 ± 0,76 μM (48 h)	Acceptors Targeting Rhodesain and Falcipain-2 for the Treatment of Neglected Tropical Diseases (NTDs). <i>Journal of medicinal chemistry</i> <b>2017</b> , <i>60</i> , 6911–6923. <sup>[128]</sup>
	<b>2b; RK-51</b>	4-Nitrobenzyl ((S)-4-Methyl-1-oxo-1-(((S,E)-6-oxo-1-phenylhept-4-en-3-yl)amino)pentan-2-yl)carbamate	3,23 ± 1,98 μM (24 h) 2,48 ± 1,33 μM (48 h)	
	<b>3a; RK-48</b>	(S,E)-Methyl 4-((S)-2-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-3-phenylpropanamido)-6-phenylhex-2-enoate	12,9 ± 7,24 μM (24 h) 8,28 ± 6,41 μM (48 h)	
	<b>3b; RK-52</b>	Benzyl ((S)-1-Oxo-1-(((S,E)-6-oxo-1-phenylhept-4-en-3-yl)amino)-3-phenylpropan-2-yl)carbamate	3,18 ± 2,16 μM (24 h) 2,97 ± 1,19 μM (48 h)	
	<b>3c; RK-56</b>	Benzyl ((S)-1-Oxo-3-phenyl-1-(((S,E)-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)-pent-1-en-3-yl)amino)propan-2-yl)carbamate	23,7 ± 9,45 μM (24 h) 18,5 ± 9,81 μM (48 h)	

	<b>4a; RK-49</b>	(S,E)-Methyl 4-((S)-2-(((4-Nitrobenzyl)oxy)carbonyl)amino)-3-phenylpropanamido)-6-phenylhex-2-enoat	97,2 ± 60,3 µM (24 h) Substanz war nicht stabil nach 24 h		
	<b>4b; RK-53</b>	4-Nitrobenzyl ((S)-1-Oxo-1-(((S,E)-6-oxo-1-phenylhept-4-en-3-yl)-amino)-3-phenylpropan-2-yl)carbamate	6,05 ± 1,36 µM (24 h) 4,98 ± 1,45 µM (48 h)		
	<b>4c; RK-57</b>	4-Nitrobenzyl ((S)-1-Oxo-3-phenyl-1-(((S,E)-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)amino)propan-2-yl)carbamate	5,48 ± 0,49 µM (24 h) 4,17 ± 0,85 µM (48 h)		
	<b>CFT</b>	2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)-thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on	1,63 ± 0,85 µM (24 h) 2,98 ± 0,92 µM (48 h) 6,25 ± 1,99 µM (72 h)	Tryparedoxin	<u>Wagner, A.</u> ; Le, T. A.; Brennich, M.; Klein, P.; Bader, N.; Diehl, E.; Paszek, D.; Weickhmann, A. K.; Dirdjaja, N.; Krauth-Siegel, R. L.; Engels, B.; Opatz, T.; Schindelin, H.; Hellmich, U. A. Inhibitor-Induced Dimerization of an Essential Oxidoreductase from African Trypanosomes. <i>Angewandte Chemie Inter. Ed.</i> <b>2019</b> , <i>58</i> , 3640–3644. <sup>[111]</sup>
	<b>MFT</b>	2-Methyl-5-(4-fluorphenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on	Keine antitrypanosomale Aktivität unter 16,7 µM MFT-Konzentration		

	<b>4d; PS-2</b>	N-((S)-1-Oxo-1-(((S,E)-6-oxo-1-phenylhept-4-en-3-yl)amino)-3-phenylpropan-2-yl)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamid	5,05 ± 0,94 μM (24 h) 3,74 ± 0,38 μM (48 h)	Rhodesain	Ettari, R.; Previti, S.; Maiorana, S.; Amendola, G.; Wagner, A.; Cosconati, S.; Schirmeister, T.; Hellmich, U. A.; Zappalà, M. Optimization Strategy of Novel Peptide-Based Michael Acceptors for the Treatment of Human African Trypanosomiasis. <i>Journal of medicinal chemistry</i> <b>2019</b> , 62, 10617–10629. <sup>[129]</sup>
	<b>4h; PS-1</b>	4-Fluor-N-((S)-1-oxo-1-(((S,E)-6-oxo-1-phenylhept-4-en-3-yl)amino)-3-phenylpropan-2-yl)benzamid	5,14 ± 1,03 μM (24 h) 3,59 ± 0,23 μM (48 h)		
	<b>4i; PS-3</b>	4-Chlor-N-((S)-1-oxo-1-(((S,E)-6-oxo-1-phenylhept-4-en-3-yl)amino)-3-phenylpropan-2-yl)benzamid	4,77 ± 0,50 μM (24 h) 3,21 ± 0,48 μM (48 h)		
	<b>4k</b>	2,4-Difluor-N-((S)-1-oxo-1-(((S,E)-6-oxo-1-phenylhept-4-en-3-yl)amino)-3-phenylpropan-2-yl)benzamid	0,74 ± 0,21 μM (24 h) 0,67 ± 0,26 μM (48 h)		
	<b>4m; 19a</b>	3,5-Difluor-N-((S)-1-oxo-1-(((S,E)-6-oxo-1-phenylhept-4-en-3-yl)amino)-3-phenylpropan-2-yl)benzamid	3,96 ± 0,75 μM (24 h) 3,35 ± 0,95 μM (48 h)		

	<b>4n</b>	Benzyl ((S)-1-Oxo-1-((S,E)-6-oxo-1-phenylhept-4-en-3-ylamino)-4-phenylbutan-2-yl)carbamate	0,55 ± 0,13 μM (24 h) 0,44 ± 0,15 μM (48 h)		
	<b>7; PPK229</b>	Benzyl (2-fluor-4,5-dinitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucinat	0,095 ± 0,040 μM (24 h) 0,140 ± 0,014 μM (48 h)	Rhodesain	Klein, P.; Johe, P.; <u>Wagner, A.</u> ; Jung, S.; Kühlborn, J.; Barthels, F.; Tenzer, S.; Distler, U.; Waigel, W.; Engels, B.; Hellmich, U. A.; Opatz, T.; Schirmeister, T. New Cysteine Protease Inhibitors: Electrophilic (Het)arenes and Unexpected Prodrug Identification for the Trypanosoma Protease Rhodesain. <i>Molecules</i> <b>2020</b> , 25, <sup>[130]</sup>
	<b>8; PPK230</b>	(2-Fluor-4,5-dinitrophenyl)-L-phenylalanyl-L-leucin	18,59 ± 4,98 μM (24 h) 30,26 ± 22,68 μM (48 h)		
	<b>2; PPK101</b>	Benzyl (3-cyano-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-L-phenylalanyl-L-leucinat	0,13 ± 0,02 μM (24 h) 0,12 ± 0,01 μM (48 h)	Rhodesain	Klein, P.; Barthels, F.; Johe, P.; <u>Wagner, A.</u> ; Tenzer, S.; Distler, U.; Le, T. A.; Schmid, P.; Engel, V.; Engels, B.; Naphthoquinones as Covalent Reversible Inhibitors of Cysteine Proteases-Studies on Inhibition Mechanism and Kinetics. <i>Molecules</i> <b>2020</b> , 25, <sup>[23]</sup>

	<b>2a; CD-1</b>	( <i>S,2E</i> )-Methyl 4-(2-(( <i>Z</i> )-2,3-dihydro-2-oxo-5-phenylbenzo[e][1,4]diazepin-1-yl)acetamido)-6-phenylhex-2-enoate	14,8 ± 7,54 μM (24 h) 12,8 ± 8,15 μM (48 h)	Rhodesain	Di Chio, C.; Previti, S.; Amendola, G.; Cosconati, S.; Schirmeister, T.; Zappalà, M.; Ettari, R. Development of Novel Benzodiazepine-Based Peptidomimetics as Inhibitors of Rhodesain from <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> . <i>ChemMedChem</i> <b>2020</b> , <i>15</i> , 995–1001. <sup>[131]</sup>
	<b>2c; CD-2</b>	( <i>S,2E</i> )-Propyl 4-(2-(( <i>Z</i> )-2,3-dihydro-2-oxo-5-phenylbenzo[e][1,4]diazepin-1-yl)acetamido)-6-phenylhex-2-enoate	19,9 ± 4,96 μM (24 h) 5,92 ± 1,62 μM (48 h)		
	<b>2g; BDZ-S1</b>	( <i>S,2E</i> )-Benzyl 4-(2-(( <i>Z</i> )-2,3-dihydro-2-oxo-5-phenylbenzo[e][1,4]diazepin-1-yl)acetamido)-6-phenylhex-2-enoate	1,26 ± 0,51 μM (24 h) 1,25 ± 0,68 μM (48 h)		
	<b>3b; PS-10</b>	N-(( <i>S</i> )-3-Cyclohexyl-1-oxo-1-((( <i>S,E</i> )-6-oxo-1-phenylhept-4-en-3-yl)amino)propan-2-yl)-3,5-difluorbenzamid	2,05 ± 0,27 μM (24 h) 0,54 ± 0,22 μM (48 h)	Rhodesain	Maiorana, S.; Ettari, R.; Previti, S.; Amendola, G.; <u>Wagner, A.</u> ; Cosconati, S.; Hellmich, U. A.; Schirmeister, T.; Zappalà, M. Peptidyl Vinyl Ketone Irreversible Inhibitors of Rhodesain: Modifications of the P2 Fragment. <i>ChemMedChem</i> <b>2020</b> . <sup>[22]</sup>
	<b>3c; PS-11</b>	4-Fluor-N-(( <i>S</i> )-1-oxo-1-((( <i>S,E</i> )-6-oxo-1-phenylhept-4-en-3-yl)amino)-3-( <i>p</i> -tolyl)propan-2-yl)benzamid	1,86 ± 0,86 μM (24 h) 0,50 ± 0,15 μM (48 h)		
	<b>3f; PS-14</b>	3,5-Difluor-N-(( <i>S</i> )-3-(4-fluorophenyl)-1-oxo-1-((( <i>S,E</i> )-6-oxo-1-phenylhept-4-en-3-yl)amino)propan-2-yl)benzamid	2,23 ± 0,41 μM (24 h) 1,53 ± 0,15 μM (48 h)		

	<b>MA_MP_08</b>	2-(Chlormethyl)-5-(4-(trifluormethyl)phenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on	2,15 ± 0,65 µM (24 h) 2,50 ± 0,64 µM (48 h)	Tryparedoxin	Schwegler, E.; Preuß, M.; <u>Wagner, A.</u> ; Schindelin, H., Opatz, T., Hellmich, U. A. <i>in preparation</i> <sup>[132,133]</sup>
	<b>MA_MP_15</b>	2-(Chlormethyl)-5-(3-fluorphenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on	1,35 ± 0,38 µM (24 h) 1,07 ± 0,53 µM (48 h)		
	<b>MA_MP_16</b>	2-(Chlormethyl)-5-(2-fluorphenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on	1,00 ± 0,26 µM (24 h) 0,78 ± 0,30 µM (48 h)		
	<b>MA_MP_23</b>	2-(Chlormethyl)-5-phenylthieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on	0,64 ± 0,32 µM (24 h) 1,37 ± 0,42 µM (48 h)		
	<b>MA_MP_40</b>	2-(5-(4-Fluorphenyl)-4-oxo-3,4-dihydrothieno[2,3-d]pyrimidin-2-yl)acetonitril	Keine antitrypanosomale Aktivität unter 16,7 µM MA_MP_40-Konzentration		

#als Kontrollsubstanz im ATPlite-Assay

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Strukturelle Untersuchung von Tpx im oxidierten, reduzierten und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand

#### 3.1.1 Strukturelle Unterschiede von Tpx im oxidierten und reduzierten Zustand

Peroxide entstehen bei vielen zellulären metabolischen Prozessen, wie z. B. der enzymatischen Oxidation oder der aeroben Zellatmung, und können Zellkompartimente schädigen sowie zum Zelltod führen. In Trypanosomatiden erfolgt die Beseitigung solcher Peroxide über die Peroxid-Entgiftungs-Kaskade, welche aus drei Enzymen besteht: i) Trypanothion-Reduktase (TR)<sup>[47,62]</sup>; ii) Tryparedoxin (Tpx)<sup>[65,77]</sup> und iii) Glutathion-Peroxidase-artige Enzyme (Px) sowie 2-Cys Peroxiredoxine (Prx)<sup>[77]</sup> (Abbildung 1-5). NADPH als Elektronendonator für diese Kaskade überträgt Elektronen auf TR. Reduzierte TR reduziert Trypanothion-Disulfid (TS<sub>2</sub>) zu Trypanothion (T(SH)<sub>2</sub>), welches die Elektronen auf Tpx überträgt. Das reduzierte Tpx reduziert Px/Prx. Diese Peroxidasen entgiften im finalen Schritt Peroxide zu Wasser oder Alkohol. Die Oxidoreduktase Tpx ist also während seines katalytischen Zyklus in vier Zuständen zu finden (Abbildung 1-7): i) dem oxidierten Zustand, in dem die Seitenketten der Cysteinreste des aktiven Zentrums, Cys40 und Cys43, eine intramolekulare Disulfidbrücke bilden; ii) dem Trypanothion-gebundenen Zustand mit einer Disulfidbrücke zwischen Cys40 und einem der beiden Arme des Trypanothion; iii) dem reduzierten Zustand, in dem die Reste von Cys40 und Cys43 als freie Thiolgruppen bzw. Thiolat vorliegen und iv) dem Protein-gebundenen Zustand mit einer gemischten Disulfidbrücke zwischen Cys40 und einem Cystein eines Zielproteins. Die strukturellen Informationen dieser Zustände beschränkt sich für *T. brucei* Tpx auf eine Kristallstruktur im oxidierten Zustand.<sup>[106]</sup> Darüber hinaus sind Kristallstrukturen von Tpx aus *C. fasciculata* im oxidierten,<sup>[105]</sup> durch Strahlung reduzierten<sup>[106]</sup> und reduzierten Zustand<sup>[107]</sup> verfügbar (Tabelle 1-3). Die reduzierten Strukturen beschränken sich auf die Öffnung der Disulfidbrücke und zeigen im Vergleich zum oxidierten Zustand nur geringfügige Unterschiede. Dies warf die Frage auf, ob sich die strukturelle Veränderung von Tpx vom oxidierten in den reduzierten Zustand ausschließlich auf die Disulfidbindung beschränkt oder ob die Änderung des Redoxzustandes darüber hinaus in weiteren Teilen des Proteins wahrgenommen wird.

Um einen hochaufgelösten Einblick in die Struktur und die Dynamik von Tpx unter verschiedenen physiologischen Zuständen zu erhalten, können die strukturellen Unterschiede zwischen diesen Zuständen mittels Kernspinresonanz- (NMR-) Spektroskopie betrachtet werden. Aufgrund der Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von der chemischen Umgebung eines gemessenen Kerns können weiterhin strukturelle Effekte von Ligandenwechselwirkungen wie T(SH)<sub>2</sub> (Kapiteln 3.1.3 bis 3.1.6), möglichen Inhibitoren (Kapitel 3.2) oder Interaktionen mit anderen Proteinen wie z. B. den Peroxidasen beobachtet werden.

Eine Resonanz in einem zweidimensionalen <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC-Spektrum zeigt die Korrelation einer nicht-austauschenden <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-Bindung und somit aller NH-Bindungen eines Proteinrückgrats. So ergibt sich für jedes Protein und seine Zustände ein charakteristischer Fingerabdruck, wie in Abbildung 3-1a für Tryparedoxin in der oxidierten und reduzierten Form gezeigt. Des Weiteren können auch NH-Bindungen in den Seitenketten betrachtet werden, sofern kein Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel stattfindet. Die Zuordnung der Resonanzen des Tryparedoxin Wildtyps (Tpx<sup>WT</sup>) im oxidierten und reduzierten Zustand erfolgte mittels standardisierten Triple Resonanzpulssequenzen von einheitlich (engl. *uniform*) <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N markiertem Tpx<sup>WT</sup> (Abbildung 3-1a).<sup>[117]</sup> Die NH-Zuordnungen der Tryptophan-, Lysin-, Arginin- und Cysteinreste konnten jeweils durch aminosäurespezifisches

$^{15}\text{N}$ -Trp,  $^{15}\text{N}$ -Lys,  $^{15}\text{N}$ -Arg oder  $^{15}\text{N}$ -Cys markiertes Tpx<sup>WT</sup> bestätigt werden. Um eine vollständige Zuordnung, einschließlich der H $\epsilon$ -N $\epsilon$  Trp-Seitenkettenresonanzen, zu erhalten, wurden drei Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten, Tpx<sup>W39A</sup>, Tpx<sup>W70A</sup> und Tpx<sup>W142A</sup> kloniert, isotonenmarkiert exprimiert, aufgereinigt und jeweils  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Spektren im oxidierten Zustand aufgenommen. Die Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten werden in Kapitel 3.1.6 eingehender betrachtet. Der reduzierte Zustand von Tpx<sup>WT</sup> wurde durch die Zugabe von 2 mM TCEP, als Reduktionsmittel erreicht.<sup>[117]</sup>

a)

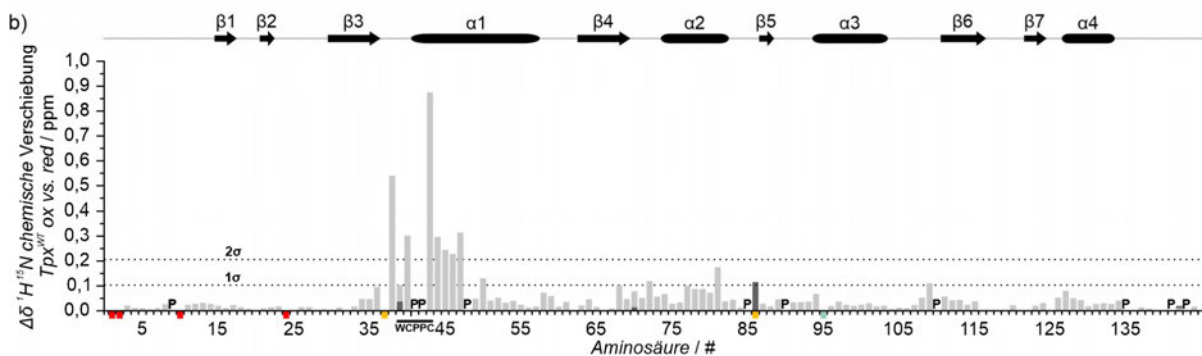
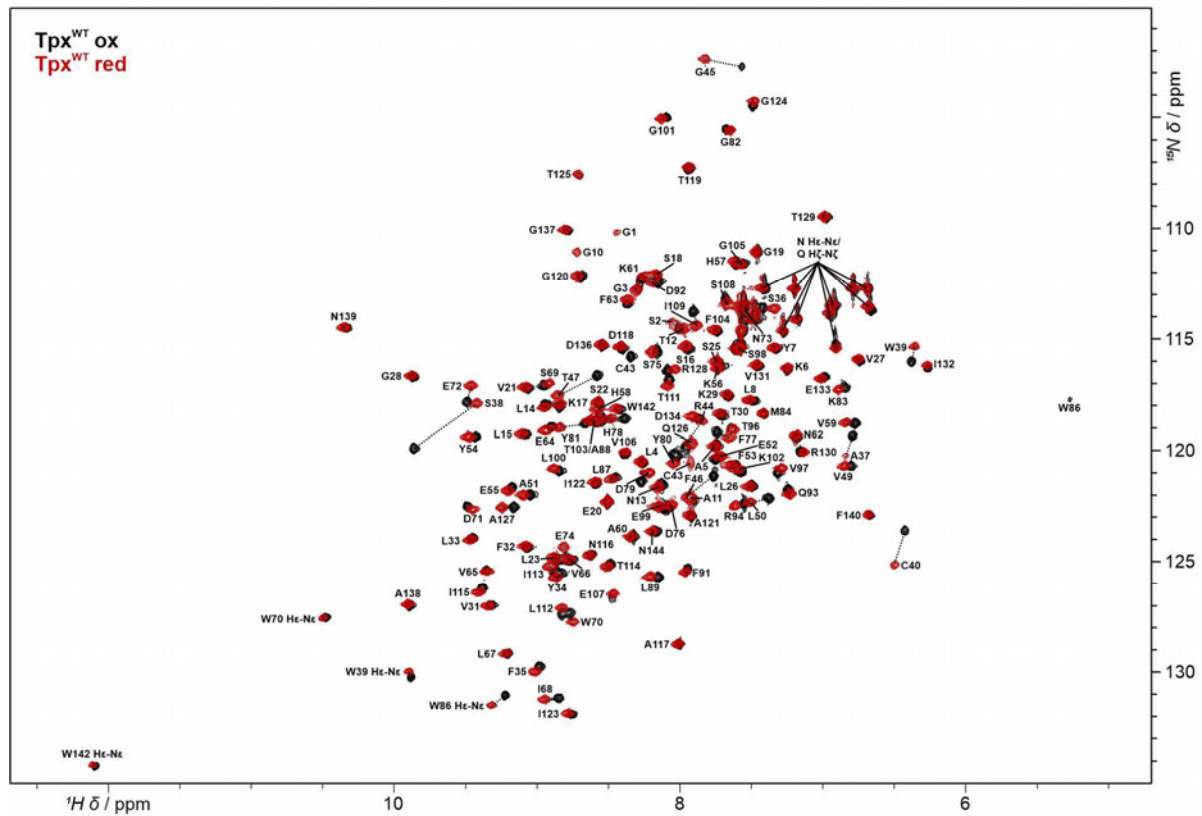


Abbildung 3-1 (a)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HSQC-Spektren von oxidiertem Tpx<sup>WT</sup> (schwarz) und durch 2 mM TCEP reduziertem Tpx<sup>WT</sup> (rot). (b) Unterschiede der chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$  (ppm) der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HSQC Tpx<sup>WT</sup>-Spektren zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand aus (a). Über dem Säulendiagramm ist die Topologie der Kristallstruktur von *T. brucei* Tpx (PDB 1o73) dargestellt. Die gestrichelten Linien stellen die ein- ( $1\sigma$ ) und zweifache ( $2\sigma$ ) Standardabweichung dar. Die einfache Standardabweichung  $1\sigma$  beträgt 0,103 ppm und die zweifache Standardabweichung  $2\sigma$  beträgt 0,205 ppm. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums W<sup>39</sup>CPPC<sup>43</sup>, die Position aller Prolinreste (P) sowie die Resonanzen, die weder im reduzierten noch im oxidierten (grün), nur im reduzierten (rot) oder nur im oxidierten Zustand (gelb) zugeordnet werden konnten, sind hervorgehoben. Die Differenzen der H $\epsilon$ -N $\epsilon$ -Resonanzen der Trp-Seitenketten sind als dunkelgraue Balken vor oder hinter dem Balken des Proteinrückgrats gezeigt. Modifiziert nach Wagner et al., 2017.<sup>[117]</sup>

Insgesamt konnten 96,3% (97,8%) der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , sowie 97,2% (98,6%) der  $\text{C}'$  der Proteinrückgrat Resonanzen im oxidierten (reduzierten) Zustand zugeordnet werden (siehe Anhang Tabelle 6-1; Tabelle 6-2). Die NMR-Zuordnungen sind in der BMRB Datenbank unter den Zugangsnummern 27049 (oxidiertes Zustand) und 27050 (reduzierter Zustand) verfügbar.<sup>[117]</sup>

Die Unterschiede der chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$  für die Resonanzen aller Aminosäuren zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand wurden mit Gleichung 2-1 berechnet (siehe Anhang Tabelle 6-3) und sind in Abbildung 3-1b dargestellt.<sup>[117]</sup> Es wurde die Standardabweichung der  $\Delta\delta$ -Werte, ausgenommen Prolinreste und nicht zugeordneter Resonanzen, berechnet.<sup>[134]</sup>

Unterschiede von  $\geq 2\sigma$  sind im und nahe des aktiven Zentrums für die Rückgrat-Amidresonanzen von Ser38, Cys40, Cys43, Arg44, Gly45, Phe46 und Thr47 zu finden. Geringere Unterschiede  $\geq 1\sigma$  weisen die NH-Resonanzen von Trp39, Leu53, Glu72, Tyr81 und Ile109 sowie die Seitenkette von Trp86 auf. Eine weitere Veränderung vom oxidierten in den reduzierten Zustand von  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  ist das Verschwinden der NH-Resonanzen des Proteinrückgrats von Trp86 und Ala37 im reduzierten Zustand. Die Unterschiede sind für eine bessere Übersicht in der oxidierten  $\text{Tp}^{\text{WT}}$ -Kristallstruktur (PDB 1o73) eingefärbt (Abbildung 3-2).

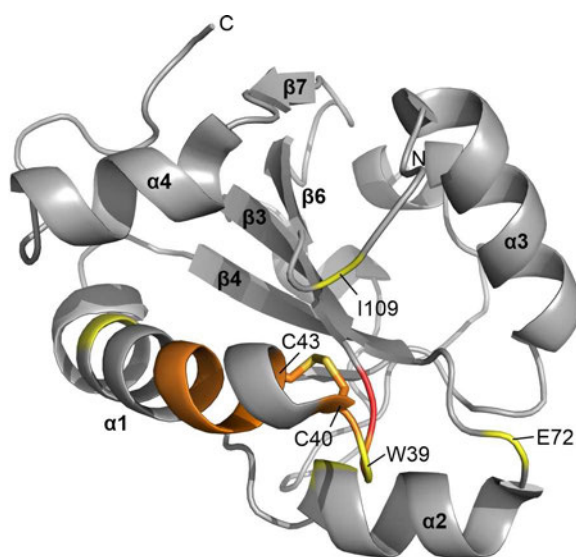


Abbildung 3-2 Kartierung der  $\Delta\delta$  Unterschiede der NH-Resonanzen des Proteinrückgrats zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand von  $\text{Tp}^{\text{WT}}$ . Aminosäuren, welche einen Unterschied der chemischen Verschiebung  $\geq 1\sigma$  aufweisen, sind in der Kristallstruktur von oxidiertem *T. brucei*  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  (PDB 1o73) gelb eingefärbt, solche mit  $\geq 2\sigma$  sind orange eingefärbt und im reduzierten Zustand fehlende NH-Resonanzen sind rot markiert. Farbcodierung Nicht-Kohlenstoffatome: gelb: Schwefel.

Anhand der chemischen Verschiebungen von H, N,  $\text{C}\alpha$ ,  $\text{C}\beta$  und  $\text{C}'$  aller Aminosäuren wurde eine Vorhersage der Sekundärstruktur mittels TALOS+ für den oxidierten und reduzierten Zustand von  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  durchgeführt (Abbildung 3-3). Die TALOS+-Vorhersage ist ein Hybrid-System zur Vorhersage von Torsionswinkeln des Protein-Rückgrats unter Verwendung der chemischen Verschiebungen für eine bestimmte Proteinsequenz.<sup>[135]</sup> Für jede Aminosäure wurde der  $\alpha$ -helikale-,  $\beta$ -Faltblatt-Anteil und der Anteil zufälliger Schleifen (engl. *random coil*) berechnet (siehe Anhang Tabelle 6-4 und Tabelle 6-5). Liegt der Anteil für ein Strukturelement über 50%, so kann davon ausgegangen werden, dass die entsprechende Aminosäure in einer solchen Sekundärstruktur vorliegt (Abbildung 3-3). Die Sekundärstrukturvorhersagen lieferten für beide Redox-Zustände eindeutige  $\alpha$ -helikale und  $\beta$ -Faltblatt Bereiche. Die Berechnungen zeigen für beide Zustände sieben Bereiche mit  $\geq 50\%$   $\beta$ -Faltblatt-Anteil, welche mit dem Topologie-Modell, basierend auf der Kristallstruktur von *T. brucei*  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  (PDB 1o73), (Abbildung 3-3 oben) gut übereinstimmen. Auch die  $\alpha$ -helikalen Bereiche passen sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand zur Topologie der Kristallstruktur. Allerdings unterscheiden sich die Vorhersagen basierend auf den NMR-Daten und die Kristallstruktur in der  $\alpha 1$ -Helix. Diese beginnt in der Kristallstruktur mit Cys40, in der TALOS+-Vorhersage für  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  im oxidierten Zustand mit Cys43 und im reduzierten Zustand jedoch erst mit Phe46. Zusätzlich gibt es in den NMR-Daten  $\alpha$ -helikale Bereiche im reduzierten Zustand

zwischen Leu4 bis Lys6 und Leu23 bis Ser25. In diesen Bereichen zeigt auch die Kristallstruktur Schleifen mit  $\alpha$ -helikalem Charakter, welche jedoch aufgrund ihrer Kürze nicht als  $\alpha$ -Helix der Sekundärstrukturelemente nummeriert wurden.

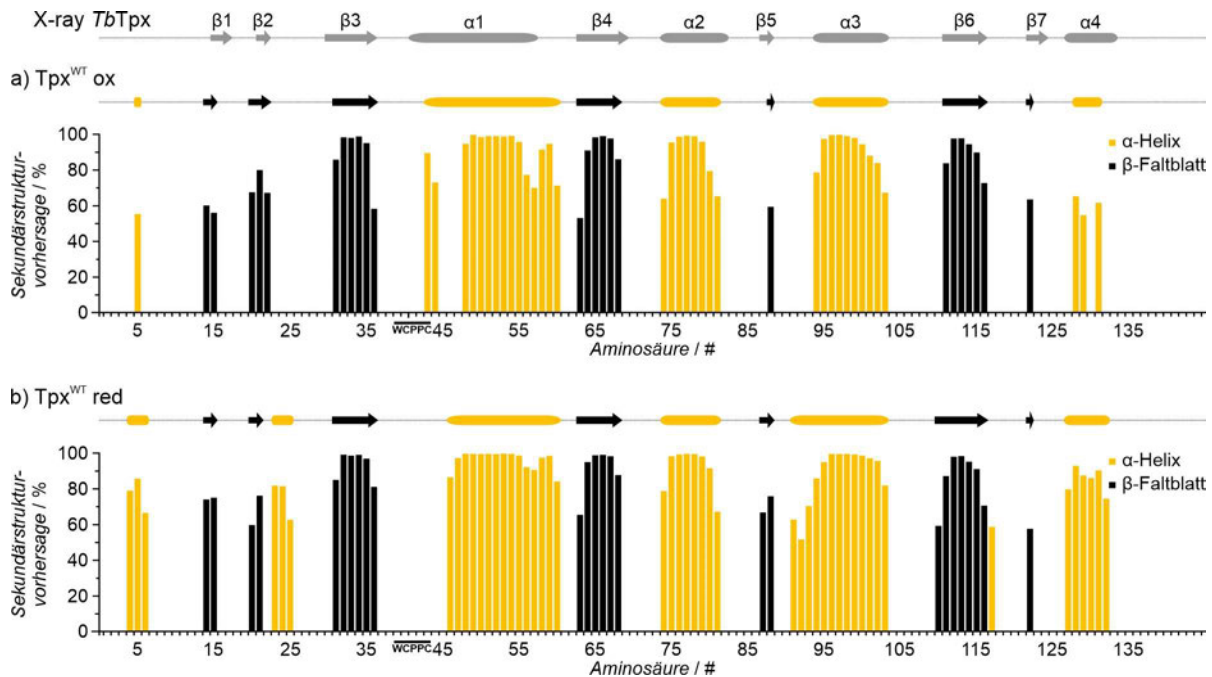


Abbildung 3-3 Vorhersagen der Sekundärstruktur von Tpx<sup>WT</sup> im (a) oxidierten und (b) reduzierten Zustand mittels TALOS+. Die chemischen Verschiebungen von H, N, C $\alpha$ , C $\beta$  und C' jeder Aminosäure dienen als Grundlage für die Berechnung. Über den Balkendiagrammen ist die Topologie der Kristallstruktur von *T. brucei* Tpx (grau; PDB 1o73) gezeigt. Beträgt die Berechnung für ein Sekundärstrukturelement,  $\alpha$ -Helix (gelb) oder  $\beta$ -Faltblatt (schwarz),  $\geq 50\%$ , so ist der prozentuale Anteil dieses Elements als Balken dargestellt. Es wird kein Balken gezeigt, wenn die Zuordnung *random coil* oder aufgrund fehlender chemischer Verschiebungen keine Vorhersage möglich war. Über den jeweiligen Diagrammen ist das zugehörige Topologie-Modell basierend auf den NMR-Daten gezeigt.

### 3.1.2 Betrachtung der Dynamikänderungen des Proteinrückgrats von Tpx zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand

Die NMR-Spektroskopie bietet neben der Strukturaufklärung auch die Möglichkeit, die Dynamik in Proteinen zu untersuchen. Die Dynamik des Proteinrückgrats im Nano- bis Pikosekunden Bereich von Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten und reduzierten Zustand wurde mittels heteronuklearem Overhauser-Effekt (<sup>1</sup>H)-<sup>15</sup>N-hetNOE) bestimmt (Abbildung 3-4a und b, Anhang Tabelle 6-6 und Tabelle 6-7). Hohe <sup>1</sup>H)-<sup>15</sup>N-hetNOE-Werte nahe 1 stellen rigidere Aminosäuren dar, hier entspricht die Resonanzintensität des hetNOE-Experiments dem des NONOE-Experiments (siehe Kapitel 2.2.3.10). Niedrige Werte nahe 0 zeigen eine hohe Flexibilität des Aminosäurerückgrats. Für einen besseren Bezug der Dynamik im oxidierten und reduzierten Zustand zur Struktur von Tpx wurden die erhaltenen hetNOE-Werte in der Tpx-Kristallstruktur (PDB 1o73) dargestellt (Abbildung 3-4c und d).

Betrachtet man die Dynamik des Proteinrückgrats von Tpx<sup>WT</sup> in Abbildung 3-4, stehen sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand drei Bereiche mit hoher Dynamik hervor: i) der N-Terminus des Proteins; ii) Aminosäuren Thr12 und Asn13, die sich N-terminal zum ersten  $\beta$ -Faltblatt befinden; und iii) Aminosäuren Gly19 und Glu20, Teil des  $\beta$ 2-Faltblatts. Eine weitere Aminosäure mit erhöhter Dynamik ist Trp86. Allerdings ist die Standardabweichung des hetNOE-Werts für Trp86 sehr hoch und es konnte nur der oxidierte Zustand untersucht werden, da die NH-Resonanz im reduzierten Zustand fehlte.

Die größten Veränderungen in der Dynamik zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand wurden im aktiven Zentrum beobachtet. Mit Ausnahme von Trp39 verändern alle Aminosäuren im aktiven Zentrum ihre Dynamik. Ser38, Cys43 und Arg44 sind im reduzierten Zustand rigider als im oxidierten, Cys40 und Gly45 sind hingegen flexibler (Abbildung 3-4b). Außerhalb des aktiven Zentrums nimmt die Flexibilität von Val59, Asn62 und Asn73 beim Übergang von Tpx vom oxidierten zum reduzierten Zustand zu, während sie bei Lys83 und Arg128 sinkt. Insgesamt verändert sich die Dynamik von Tpx zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand jedoch vergleichsweise wenig.

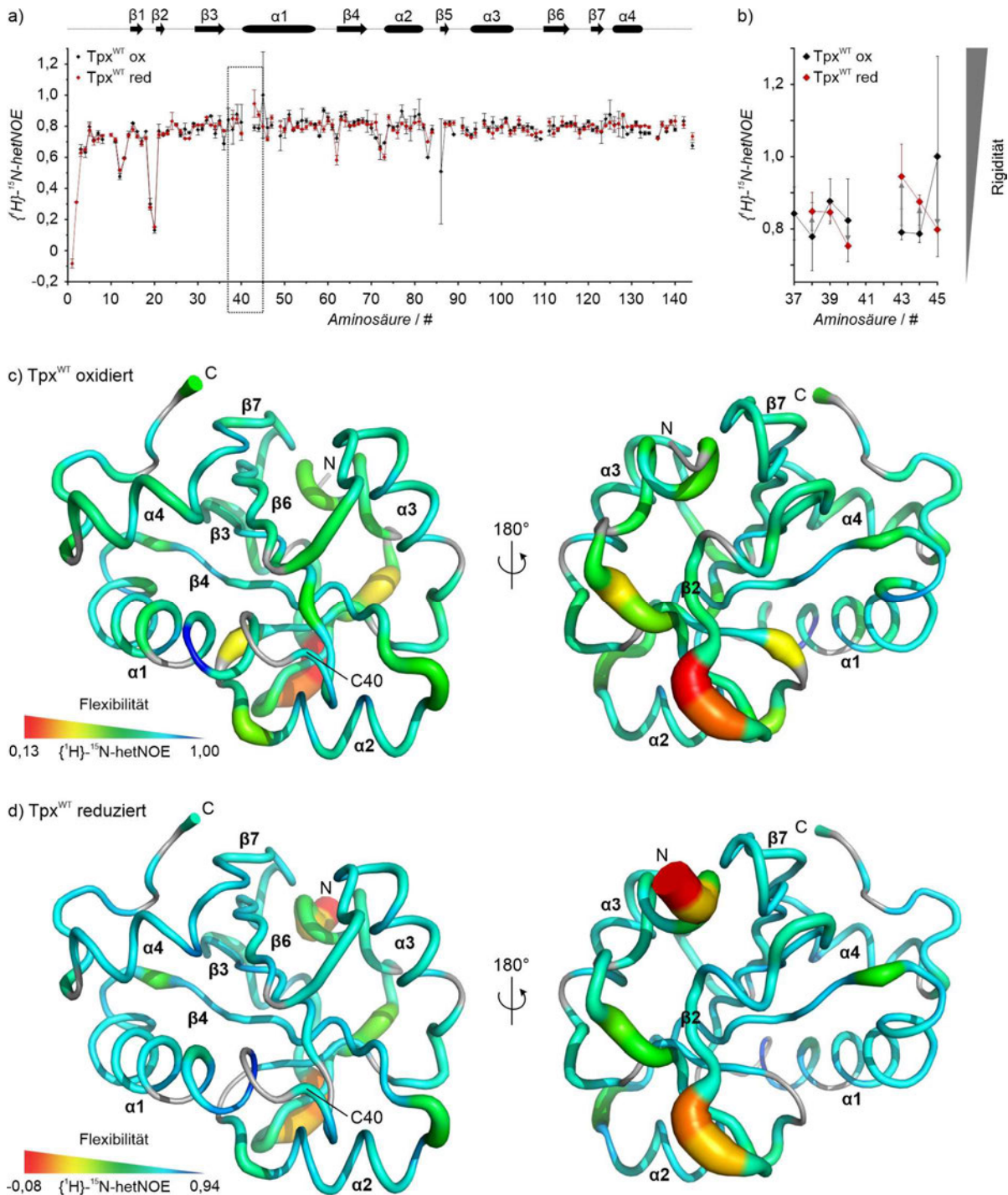


Abbildung 3-4 Dynamik des Proteinrückgrats von Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten und reduzierten Zustand. (a) Oberhalb des Diagramms ist die Topologie von Tpx dargestellt. Die jeweiligen  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ -hetNOE-Werte sind gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen und repräsentieren den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus diesen dar. (b) Vergrößerte Ansicht der  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ -hetNOE-Werte der Reste des aktiven Zentrums Ala37 bis Gly45, welches in (a) als gestrichelter Kasten hervorgehoben ist. Graue Pfeile veranschaulichen die Veränderung des hetNOE-Werts vom oxidierten (schwarz) zum reduzierten (rot) Zustand. In (c) und (d) sind die hetNOE-Werte der einzelnen Aminosäuren im oxidierten (c) und reduzierten Zustand (d) in der Tpx-Kristallstruktur (PDB 1o73) dargestellt. Die Farbcodierung ist der Abbildung selbst zu entnehmen. Zusätzlich sind rigidere Aminosäuren als schmale und flexiblere Aminosäuren breiter in der Schlauchdarstellung gezeigt. Nicht zugeordnete Aminosäuren und Prolinreste sind in grau und schmal dargestellt.

### 3.1.3 Betrachtung der Interaktion zwischen Tpx<sup>WT</sup> und Trypanothion mittels NMR-Spektroskopie

Neben dem oxidierten und reduzierten freien Zustand kann Tpx in Trypanothion-gebundener Form vorliegen (Abbildung 1-7). Trypanothion (T(SH)<sub>2</sub>) wird durch Trypanothion-Synthetase aus zwei Glutathionmolekülen gebildet, die über einen Spermidinlinker verbunden sind (siehe Abbildung 3-5a). Die Thiolgruppe eines Glutathionylarms von T(SH)<sub>2</sub> bindet an Cys40 von oxidiertem Tpx. Dabei entsteht ein gemischtes Disulfid-Intermediat aus Trypanothion und Tpx. Der katalytische Zyklus von Tpx und Trypanothion endet durch einen Zerfall des Disulfids in reduziertes Tpx und Trypanothion-Disulfid (TS<sub>2</sub>), allerdings werfen die Ergebnisse dieser Arbeit Fragen zu diesem allgemein akzeptierten Modell auf (siehe Kapitel 3.1.5 und 4.1.5). Die Interaktion von Tpx und T(SH)<sub>2</sub> ist aus zwei Gründen interessant: i) Tpx wird im Gegensatz zu den verwandten Oxidoreduktasen Thioredoxin und Glutaredoxin nicht durch eine Reduktase und nur bedingt durch Glutathion reduziert.<sup>[72]</sup> Der Elektronentransfer auf Tpx erfolgt hauptsächlich durch Trypanothion<sup>[65]</sup>; ii) Trypanothion kommt, wie Tpx, in allen Trypanosomatiden, nicht jedoch in Säugetieren vor.<sup>[47]</sup> Die strukturellen Informationen zur Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Interaktion beschränken sich bislang auf eine Kristallstruktur von Tpx aus *C. fasciculata* (CfTpx) im Komplex mit einem *Dead-End*-Derivat des Trypanothions (N<sup>1</sup>-Glutathionylspermidin), welches auch ein Zwischenprodukt der Trypanothion-Synthese ist, und NMR-Studien an CfTpx in Anwesenheit eines Redox-inaktiven Trypanothion-Derivats (N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(γ-Glu-Ala-Gly)spermidin) (Abbildung 3-5a).<sup>[107,110]</sup> Es sind somit keine Strukturinformationen über die Interaktion von Tpx mit Trypanothion selbst verfügbar. Um den molekularen Mechanismus der Interaktion zwischen T(SH)<sub>2</sub> und Tpx besser zu verstehen, wurde T(SH)<sub>2</sub> zu einheitlich markiertem <sup>15</sup>N Tpx<sup>WT</sup> titriert und <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektren aufgenommen (Abbildung 3-5b und Anhang Abbildung 6-1).

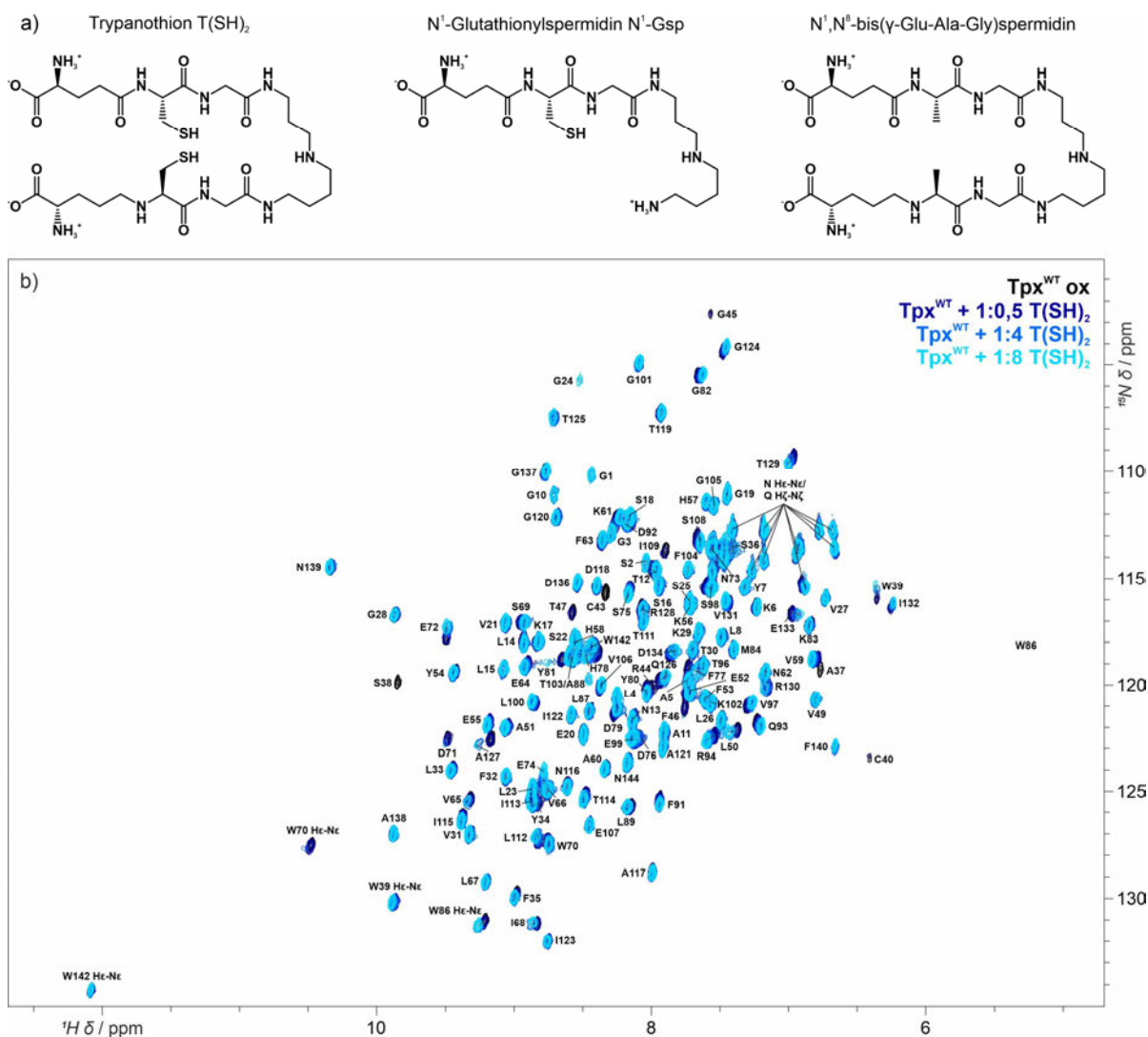


Abbildung 3-5 (a) Molekülstrukturen von Trypanothion ( $T(SH)_2$ ) und Trypanothion-Derivaten  $N^1$ -Glutathionylspermidin ( $N^1$ -Gsp) sowie  $N^1, N^8$ -bis( $\gamma$ -Glu-Ala-Gly)spermidin. (b)  $^1H$ - $^{15}N$  2D HSQC-Spektren von  $^{15}N$ - $Tpx^{WT}$  im oxidierten Zustand (schwarz) und in Anwesenheit verschiedener  $T(SH)_2$ -Konzentrationen (Blauschattierungen). Zu oxidiertem  $Tpx^{WT}$  wurde  $T(SH)_2$  im molaren Verhältnis 0,5; 1; 4 und 8 titriert. Das HSQC-Spektrum im 1:1 Verhältnis wurde für bessere Übersichtlichkeit herausgelassen, siehe Anhang Abbildung 6-1 für das entsprechende HSQC-Spektrum.

Eine Überlagerung der  $^1H$ - $^{15}N$  2D HSQC-Spektren von  $Tpx^{WT}$  (Abbildung 3-5), ohne und mit  $T(SH)_2$ , zeigt klare Veränderungen in den NH-Resonanzpositionen zwischen den Spektren, z. B. von Aminosäuren Trp39, Glu72 und Ala127. Außerdem verbreitern sich einzelne Resonanzen im  $T(SH)_2$ -gebundenen Zustand, sodass sie nicht mehr detektiert werden können, wie z. B. die von Cys40 und Thr47. Da es sich bei der Komplexbildung zwischen  $Tpx$  und Trypanothion um einen kovalenten Bindemechanismus im äquimolaren Verhältnis handelt, wurde erwartet, dass bei höheren molekularen  $Tpx:T(SH)_2$ -Verhältnissen wie 1:4 und 1:8 keine weitere Migration oder Intensitätsveränderung von NH-Resonanzen stattfindet. Wie in Abbildung 3-6b dargestellt, trifft dies auf Resonanzen, die sich in Anwesenheit von  $T(SH)_2$  verbreitern, auch zu. Diese sind bei einem äquimolaren Verhältnis von  $Tpx$  und Trypanothion bereits vollständig „verschwunden“. Für Resonanzen, die durch  $T(SH)_2$ -Zugabe eine Änderung der chemischen Verschiebung aufweisen, trifft dies jedoch nicht zu. Hier verändert sich die chemische Verschiebung bei  $Tpx:T(SH)_2$ -Verhältnissen  $> 1:1$  weiterhin. Auch bei einem molaren Verhältnis  $Tpx:T(SH)_2$  von 1:8 scheint noch keine Sättigung

erreicht zu sein, wie die Auftragung der Unterschiede der chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$  im Vergleich zum oxidierten Zustand in Abbildung 3-6a zeigt. Für die weitere Analyse des T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustands wurde das HSQC-Spektrum im molaren Tpx:T(SH)<sub>2</sub>-Verhältnis 1:8 verwendet.

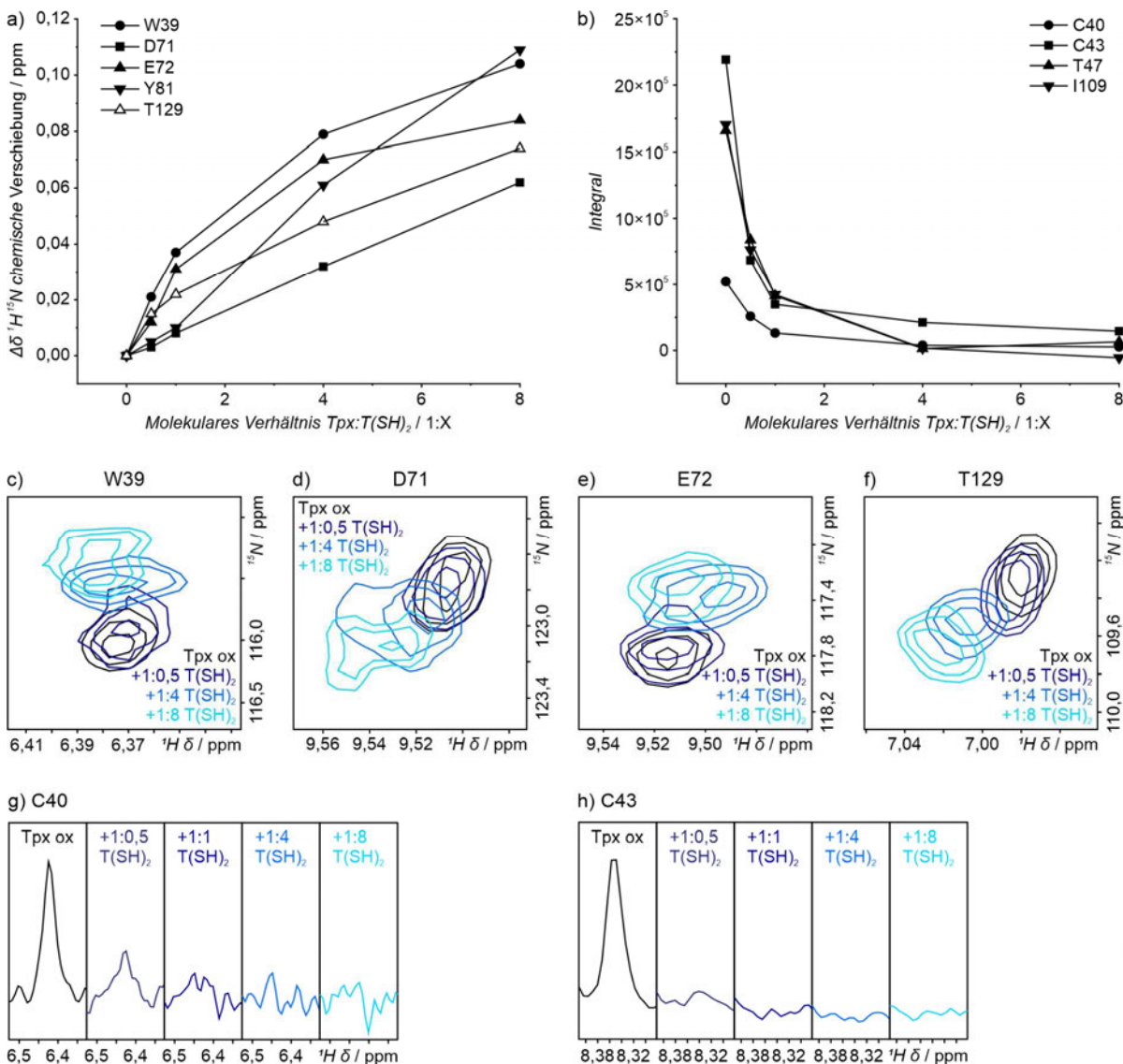


Abbildung 3-6 T(SH)<sub>2</sub>-abhängige Veränderungen der Position oder Intensität der NH-Resonanzen ausgewählter Aminosäuren in Tpx<sup>WT</sup>. Es sind die Veränderungen der (a) chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$  (ppm) im Vergleich zum oxidierten Zustand und (b) der Resonanz-Integrale gegen das molekulare Verhältnis Tpx:T(SH)<sub>2</sub> aufgetragen. (c-f) Die Ausschnitte der HSQC-Spektren zeigen die Migration der in (a) aufgetragenen Aminosäuren in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub>. Die <sup>1</sup>H-Projektionen der Resonanzen von (g) Cys40 und (h) Cys43 veranschaulichen die Abnahme der Intensität mit zunehmender T(SH)<sub>2</sub>-Konzentration.

Um zu bestimmen, ob der T(SH)<sub>2</sub>-gebundene Zustand mehr dem oxidierten oder reduzierten Zustand von Tpx<sup>WT</sup> ähnelt, wurden sowohl die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen zwischen dem oxidierten und dem T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand als auch zwischen dem reduzierten und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand mit Gleichung 2-1 berechnet (Abbildung 3-7; Anhang Tabelle 6-8 und Tabelle 6-9). Es wurde zudem die Standardabweichung  $\sigma$  der Unterschiede der chemischen Verschiebungen, ausgenommen Prolinreste und nicht zugeordnete Resonanzen, berechnet. Dadurch konnte eine Einstufung der Unterschiede vorgenommen werden. Unterschiede, die unter  $1\sigma$  Standardabweichung

liegen, wurden als nicht signifikant eingestuft, wohingegen Werte von  $\Delta\delta \geq 1\sigma$  als leichte Unterschiede und  $\Delta\delta \geq 2\sigma$  als starke Unterschiede angenommen wurden.<sup>[134]</sup>

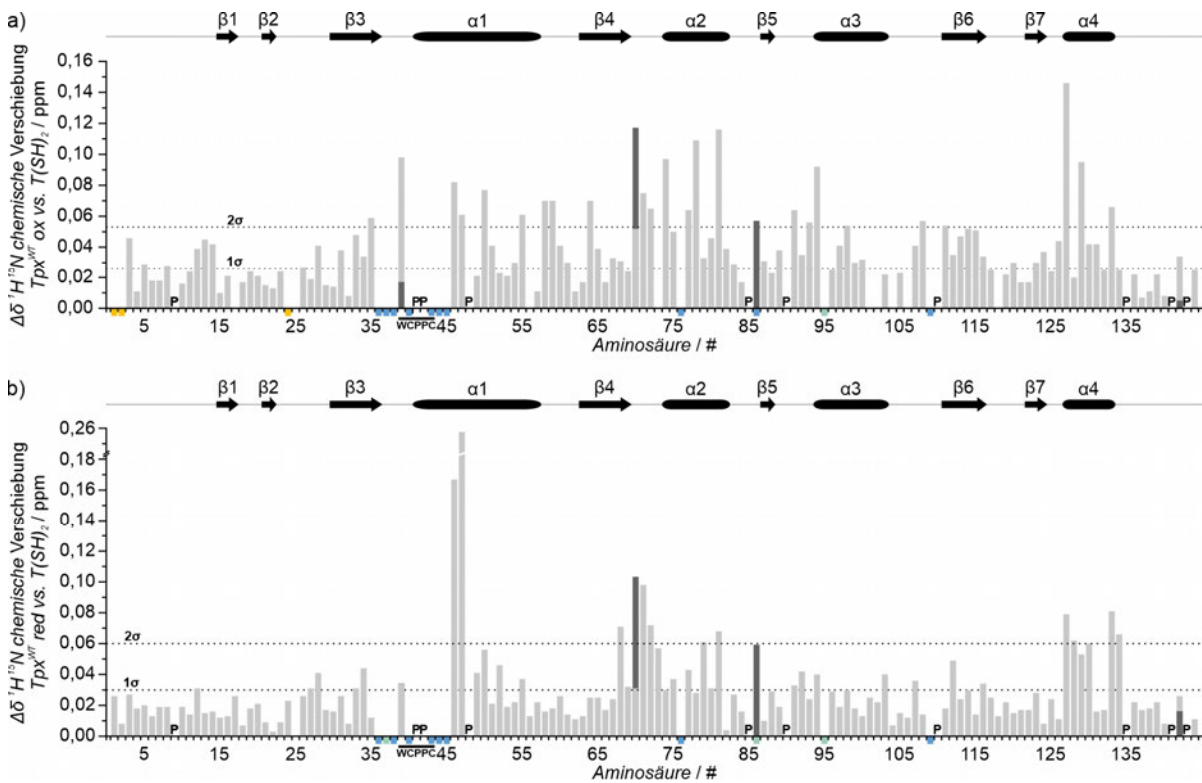


Abbildung 3-7 Unterschiede der chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$  (ppm) der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HSQC  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  Spektren zwischen dem (a) oxidierten oder (b) reduzierten Zustand und  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  in Anwesenheit von  $\text{T}(\text{SH})_2$  im molaren Verhältnis  $\text{Tp}^{\text{WT}}:\text{T}(\text{SH})_2$  1:8. Der Vergleich der Unterschiede in (a) und (b) lässt vermuten, dass der  $\text{T}(\text{SH})_2$ -gebundene Zustand von  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  dem reduzierten Zustand ähnlicher ist als dem oxidierten Zustand, da in (b) weniger Aminosäuren Unterschiede  $\geq 1\sigma$  oder  $\geq 2\sigma$  aufweisen. Die gestrichelten Linien repräsentieren die einfache ( $1\sigma$ ) bzw. zweifache ( $2\sigma$ ) Standardabweichung der Unterschiede der chemischen Verschiebungen. Die Standardabweichung entspricht für die Resonanz-Unterschiede zwischen oxidiertem und  $\text{T}(\text{SH})_2$ -gebundenem Zustand:  $1\sigma = 0,026$  ppm und  $2\sigma = 0,052$  ppm. Für die Standardabweichung von  $\Delta\delta$  zwischen dem reduzierten und  $\text{T}(\text{SH})_2$ -gebundenen Zustand ergibt sich:  $1\sigma = 0,030$  ppm und  $2\sigma = 0,060$  ppm. Diese Standardabweichungen entsprechen etwa einem Viertel der errechneten Standardabweichung der Unterschiede zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand. Über den Säulendiagrammen ist die Topologie der Kristallstruktur von  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  (PDB 1o73) dargestellt. Das aktive Zentrum  $\text{W}^{39}\text{CPPC}^{43}$  ist hervorgehoben. Die Differenzen der  $\text{H}\epsilon$ - $\text{N}\epsilon$ -Resonanzen der Trp-Seitenketten sind als dunkelgraue Balken vor oder hinter dem Balken des Proteinrückgrats gezeigt. (P: Prolinrest; blau: NH-Resonanz fehlt in Anwesenheit von  $\text{T}(\text{SH})_2$ ; gelb: Resonanz ist im oxidierten Zustand nicht vorhanden; grün: NH-Resonanz fehlt sowohl im oxidierten bzw. reduzierten Zustand als auch in Anwesenheit von  $\text{T}(\text{SH})_2$ ).

Der Vergleich von Abbildung 3-7a und b zeigt deutlich, dass die Zahl der Aminosäuren, deren chemische Verschiebung sich um  $\geq 1\sigma$  zwischen oxidiertem und  $\text{T}(\text{SH})_2$ -gebundenem Zustand veränderte, größer ist als die Zahl der Aminosäuren, die den Unterschied zwischen reduziertem und  $\text{T}(\text{SH})_2$ -gebundenem Zustand „spüren“. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  in Anwesenheit von  $\text{T}(\text{SH})_2$  dem reduzierten Zustand ähnlicher ist. Im Folgenden wurde die Interaktion zwischen  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  und  $\text{T}(\text{SH})_2$  mit dem reduzierten Zustand verglichen.

Eine Veränderung in der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung  $\geq 1\sigma$  zwischen reduziertem und Trypanothion-gebundenen Zustand wiesen die Aminosäuren Thr12, Val27, Gly28, Leu33, Tyr34, Trp39 (Proteinrückgrat und  $\text{H}\epsilon$ - $\text{N}\epsilon$ -Resonanz), Val49, Leu50, Glu52, Glu55, Ser69, Trp70 (Proteinrückgrat), Asn73, Glu74, Ser75, Phe77, Tyr80, Trp86 ( $\text{H}\epsilon$ - $\text{N}\epsilon$ -Resonanz), Phe91, Asp92, Arg94,

Ser98, Thr103, Glu107, Leu112, Thr114, Asn116 und Thr129 auf. Größere Unterschiede  $\geq 2\sigma$  zeigten die Resonanzen der Aminosäuren Phe46, Thr47, Ile68, Trp70 (H $\epsilon$ -N $\epsilon$ -Resonanz), Asp71, Glu72, Asp79, Tyr81, Ala127, Arg128, Arg130, Glu133 und Asp134. Die NH-Resonanzen der Aminosäuren Ser36, Ser38, Cys40, Cys43, Arg44, Gly45, Asp76 und Ile109 verbreiterten sich in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub>, sodass sie nicht mehr detektiert werden konnten. Für eine bessere Visualisierung der Unterschiede der chemischen Verschiebungen zwischen dem reduzierten und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand sind diese in Abbildung 3-8a in der Kristallstruktur von *T. brucei* Tpx (PDB 1o73) angefärbt. Aminosäuren, deren NH-Resonanzen sich im T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand verbreitern und nicht mehr detektiert werden konnten, erfuhren somit die größten Veränderungen und sind vor allem nahe dem aktiven Zentrum zu finden. Neben dem aktiven Zentrum sind besonders viele Effekte im Bereich N-terminal zu  $\alpha$ 2-Helix und innerhalb der  $\alpha$ 2-Helix sowie in der  $\alpha$ 4-Helix anzutreffen.

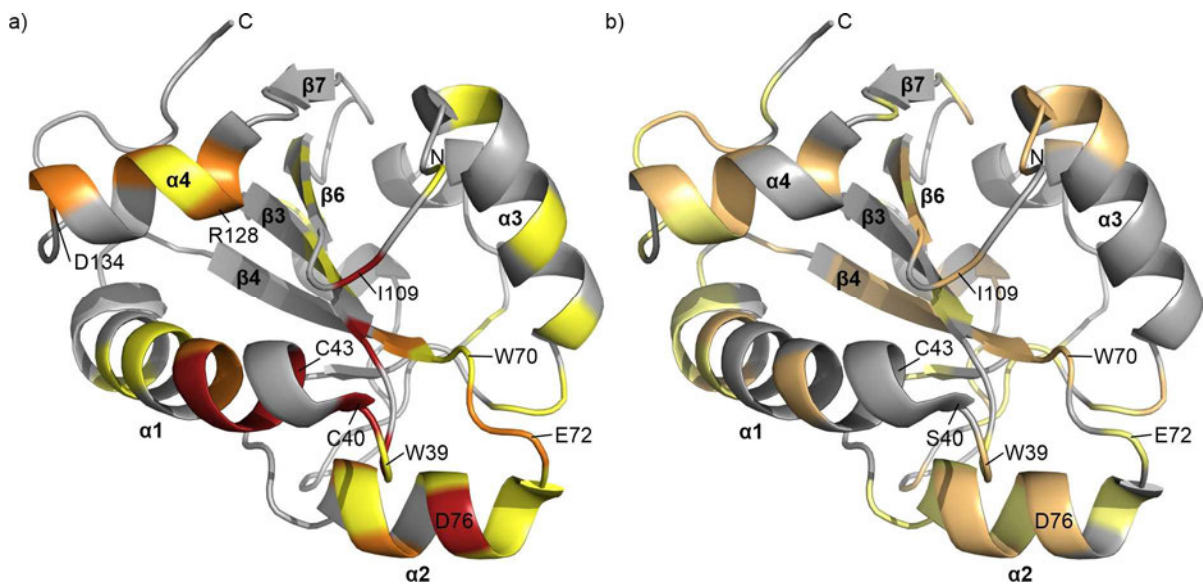


Abbildung 3-8 „Hitzekarte“ der Unterschiede in Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>C40S</sup> in An- und Abwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> in der *T. brucei* Tpx Struktur (PDB 1o73). (a) Unterschiede der chemischen Verschiebungen zwischen dem reduzierten und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand in Tpx<sup>WT</sup> aus Abbildung 3-7. (gelb: Unterschied  $\geq 1\sigma$ ; orange: Unterschied  $\geq 2\sigma$ ; rot: Linienverbreiterung der NH-Resonanz in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub>) (b) Tpx<sup>C40S</sup> kann aufgrund der Mutation des Cysteinrests des aktiven Zentrums keine kovalente Bindung mit T(SH)<sub>2</sub> eingehen. Dargestellt sind Unterschiede der chemischen Verschiebungen zwischen dem apo Zustand und in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> aus Abbildung 3-10. (hellgelb: Unterschied  $\geq 1\sigma$ ; hellorange: Unterschied  $\geq 2\sigma$ )

### 3.1.4 Untersuchung der nicht-kovalenten Interaktion von $\text{Tp}^{\text{C40S}}$ mit $\text{T}(\text{SH})_2$

Wie oben erläutert, bildet  $\text{T}(\text{SH})_2$  ein kovalentes Intermediat mit Cys40 von  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$  während des katalytischen Zyklus der Oxidoreduktase. Existiert vor der Ausbildung der kovalenten Bindung eine nicht-kovalente Anlagerung von  $\text{T}(\text{SH})_2$  an  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$  bzw. gibt es ein Präbindemotiv in  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$  für  $\text{T}(\text{SH})_2$ ? Um dies zu untersuchen, bedarf es einer Unterbindung der Ausbildung des kovalenten Intermediats zwischen  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$  und  $\text{T}(\text{SH})_2$ , etwa durch die Einführung der Punktmutation Cys40Ser im aktiven Zentrum von  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$ . Um die Interaktion von  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$  und  $\text{T}(\text{SH})_2$  NMR-spektroskopisch zu untersuchen, wurde im ersten Schritt eine Zuordnung der Resonanzen von  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$  analog zu  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  in Kapitel 3.1.1 durchgeführt (Anhang Abbildung 6-3). Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Spektren von  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$  zu  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  im reduzierten Zustand diente die Zuordnung der NH-Resonanzen von  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  zu den Aminosäuren als zusätzliche Orientierung. Da  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$  aufgrund der fehlenden intramolekularen Disulfidbrücke nicht den Redox-Zustand verändern kann, wird es in Abwesenheit von Liganden im Folgenden als Protein im apo Zustand bezeichnet.

Es wurden  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HSQC-Spektren von  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$  im apo Zustand und in Anwesenheit von  $\text{T}(\text{SH})_2$  aufgenommen (Anhang Abbildung 6-3). Die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der NH-Resonanzen in  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$  nehmen analog des  $\text{Tp}^{\text{WT}}$  mit steigender  $\text{T}(\text{SH})_2$ -Konzentration im Vergleich zum apo Zustand zu (Abbildung 3-9). Es kommt zu keiner Linienverbreiterung, wie dies für den kovalenten Komplex zu beobachten war. Da es sich bei der  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$ - $\text{T}(\text{SH})_2$ -Interaktion um einen nicht-kovalenten Komplex handelt, war dies zu erwarten. Wie die Auftragung der Unterschiede der chemischen Verschiebung  $\Delta\delta$  gegen das molekulare Verhältnis von  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$  zu  $\text{T}(\text{SH})_2$  zeigt, scheint bei einem Verhältnis 1:4 noch keine Sättigung erreicht zu sein.

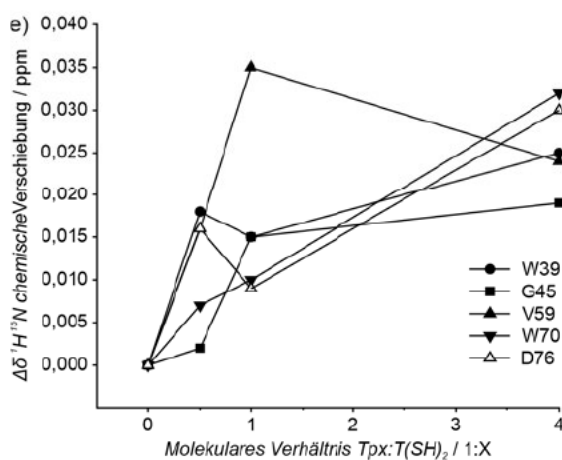
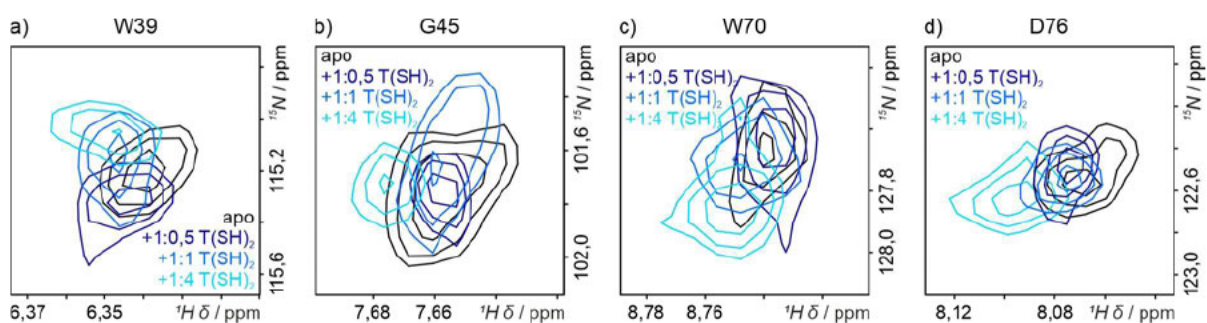


Abbildung 3-9 Konzentrationsabhängige Interaktion von  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$  und  $\text{T}(\text{SH})_2$ . Die Ausschnitte der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren von  $\text{Tp}^{\text{C40S}}$  zeigen die NH-Resonanzen von (a) Trp39, (b) Gly45, (c) Trp70 und (d) Asp76 im apo Zustand (schwarz) und in Anwesenheit von  $\text{T}(\text{SH})_2$  (molare Verhältnisse  $\text{Tp}:\text{T}(\text{SH})_2$  1:0,5, 1:1 und 1:4, Blauschattierungen). Die vollständigen NMR-Spektren sind Anhang Abbildung 6-3 zu entnehmen. (e) Auftragung der Differenz der chemischen Verschiebung  $\Delta\delta$  ausgewählter Aminosäuren zwischen dem apo Zustand und in Anwesenheit von  $\text{T}(\text{SH})_2$  gegen das molekulare Verhältnis zwischen  $\text{Tp}$  und  $\text{T}(\text{SH})_2$ .

Es wurden die Unterschiede  $\Delta\delta$  zwischen den Spektren des apo Zustands und im molaren Verhältnis Tpx:T(SH)<sub>2</sub> 1:4 mit Gleichung 2-1 berechnet (Anhang Tabelle 6-10) und in Abbildung 3-10 gegen die Aminosäurenummerierung aufgetragen.

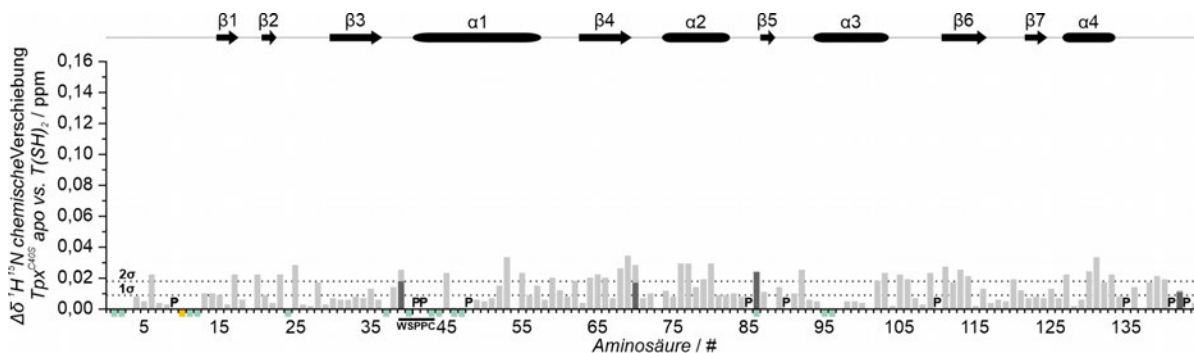


Abbildung 3-10 Unterschied in den chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$  (ppm) der <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC Tpx<sup>C40S</sup> Spektren im apo Zustand und in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub>. Das aktive Zentrum W<sup>39</sup>SPPC<sup>43</sup> ist hervorgehoben. Die gestrichelten Linien stellen die einfache (1 $\sigma$ ) bzw. zweifache (2 $\sigma$ ) Standardabweichung der Unterschiede der chemischen Verschiebungen dar. Die Standardabweichung der Unterschiede der chemischen Verschiebungen in Tpx<sup>C40S</sup> zwischen dem apo Zustand und in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> beträgt 0,009 ppm (1 $\sigma$ ) und die zweifache Standardabweichung beträgt 0,018 ppm (2 $\sigma$ ). Die Standardabweichungen zwischen reduziertem und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenem Zustand in Tpx<sup>WT</sup> sind mehr als dreimal größer als die Standardabweichung der  $\Delta\delta$  Unterschiede zwischen dem apo Zustand und in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> in Tpx<sup>C40S</sup>. Über dem Säulendiagramm ist die Topologie von Tpx dargestellt. Die Differenzen der He-N $\epsilon$ -Resonanzen der Trp-Seitenketten sind als dunkelgraue Balken vor oder hinter dem Balken des Proteinrückgrats gezeigt. (P: Prolinrest; gelb: NH-Resonanz fehlt im apo Zustand; grün: NH-Resonanz fehlt sowohl im apo Zustand als auch in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub>).

Aminosäuren in Tpx<sup>C40S</sup>, deren Resonanzen Unterschiede  $\geq 1\sigma$  aufwiesen, waren Asn13, Leu14, Leu15, Val21, Gly28, Phe35, Ser38, Trp39 (He-N $\epsilon$ -Resonanz), Glu52, Lys56, His57, Ala60, Trp70 (He-N $\epsilon$ -Resonanz), Glu72, Glu74, His78, Tyr81, Gly82, Lys83, Leu87, Leu89, Phe91, Leu112, Asn116, Ala121, Thr125, Ile132, Asp136, Ala138 und Trp142 (Proteinrückgrat und He-N $\epsilon$ -Resonanz). Größere Unterschiede in der chemischen Verschiebung  $\geq 2\sigma$  zeigten die NH-Resonanzen der Aminosäuren Lys6, Lys17, Glu20, Leu23, Ser25, Trp39 (Proteinrückgrat), Gly45, Phe53, Glu55, Val59, Asn62, Glu64, Val65, Val66, Ile68, Ser69, Trp70, Asp76, Phe77, Asp79, Tyr80, Trp86 (He-N $\epsilon$ -Resonanz), Asp92, Lys102, Thr103, Gly105, Val106, Ile109, Thr111, Ile113, Thr114, Gly120, Ala127, Arg130, Val131, Glu133, Asn139 und Phe140. Die Unterschiede treten vermehrt in den Bereichen  $\beta$ 4-Faltblatt,  $\alpha$ 2-Helix, vor und in  $\beta$ 6-Faltblatt sowie in  $\alpha$ 4-Helix auf. Aufgrund der fehlenden NH-Resonanzen von Ala37, Ser40, Cys43, Arg44, Phe46 und Thr57 im apo Zustand sowie in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> kann über diese Reste keine Aussage im Hinblick auf eine Interaktion mit T(SH)<sub>2</sub> getroffen werden. Die Unterschiede  $\geq 1\sigma$  und  $\geq 2\sigma$  der chemischen Verschiebungen zwischen apo Zustand und in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> wurden für eine bessere Visualisierung in der Kristallstruktur von *T. brucei* Tpx (PDB 1o73) eingefärbt (Abbildung 3-8b).

Der Vergleich der „Hitzekarten“ von Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>C40S</sup> zeigt, dass in beiden Experimenten annähernd die gleichen Bereiche in Tpx Veränderungen in der chemischen Umgebung durch T(SH)<sub>2</sub> erfahren, allerdings sind diese Veränderungen im Vergleich zu Tpx<sup>WT</sup> um ein Vielfaches geringer (Abbildung 3-8). Die Veränderungen betreffen das aktive Zentrum und Aminosäuren in dessen unmittelbarer Umgebung, darunter den Bereich N-terminal zu und innerhalb der  $\alpha$ 2-Helix sowie Ile109 und die C-terminale  $\alpha$ 4-Helix.

Die Ergebnisse der NMR-Spektroskopie von Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>C40S</sup> zeigen, auf welche Aminosäuren die Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> einen Einfluss ausübt. Daraus ergibt sich die Frage, ob diese Aminosäuren erforderlich für die Bindung von T(SH)<sub>2</sub> sind. Um dies zu untersuchen, wurden Aminosäuren ausgewählt, welche sowohl Unterschiede zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand (Kapitel 3.1.1) sowie Unterschiede zwischen reduziertem und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenem Zustand aufwiesen, um Einzelpunktmutationen einzuführen. Die Reste Ser38, Trp39, Cys40, Cys43, Arg44, Trp70, Ile109 und Thr129 wurden zu Alanin sowie Tyr81 zu Phenylalanin mutiert. Des Weiteren wurde eine Doppelmutante Tpx<sup>C40/C43S</sup> generiert, welche kein Cystein mehr enthält. Die Analyse der strukturellen Integrität der Tpx-Mutanten mittels Größenausschlusschromatographie (engl. *size exclusion chromatographie*, SEC), Circular dichroismus- (CD-) Spektroskopie und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) zeigte für alle Konstrukte ein annähernd gleiches Verhalten wie für Tpx<sup>WT</sup> (Anhang Abbildung 6-4). Es wurde daher angenommen, dass durch die Einführung der Punktmutanten keine signifikanten Veränderungen der strukturellen Integrität von Tpx entstanden. Für Tpx<sup>R44A</sup> konnte diese Analyse nicht durchgeführt werden, da das Plasmid nach ersten erfolgreichen Expressionen und Aufreinigungen des Proteins vermutlich eine Mutation aufwies und sich das Protein nicht mehr exprimieren ließ. Eine erneute Klonierung steht noch aus. Allerdings konnte aus der erfolgreichen Aufreinigung von Tpx<sup>R44A</sup> zu Beginn der Arbeiten Protein zur Generierung einer 2,2 Å Kristallstruktur (im Komplex mit dem kovalenten Inhibitor CFT) erhalten werden (Anhang Abbildung 6-5), die die Mutation sowie die korrekte dreidimensionale Struktur dieser Mutante bestätigt (RMSD Tpx<sup>R44A</sup> zu *T. brucei* Tpx (PDB 1o73) von 0,48 Å).<sup>[111]</sup> Die Kristallisation und das Lösen der Kristallstruktur wurden von [REDACTED] und Prof. Dr. [REDACTED], Rudolf-Virchow-Zentrum Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt.

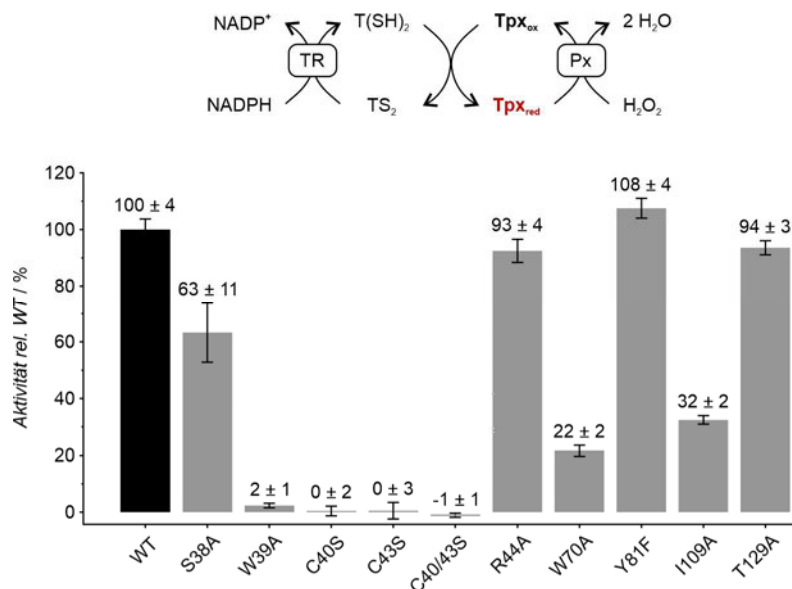
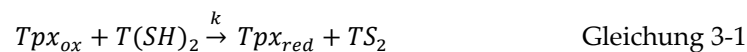


Abbildung 3-11 Aktivitäten ausgewählter Tpx-Mutanten im gekoppelten Px-Assay relativ zu Tpx<sup>WT</sup>. Die Aktivitäten basieren auf dem Verbrauch von NADPH und wurden durch die Abnahme der Absorption bei 340 nm über die Zeit bestimmt. Die Aktivitäten sind in % angegeben und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei Messungen. Oberhalb des Säulendiagramms ist das Schema des Px-Assays angegeben.

Die Aktivitäten der insgesamt zehn Mutanten wurden im gekoppelten Px-Assay bestimmt (Abbildung 3-11). Dieser enthielt alle Bestandteile der Peroxid-Entgiftungs-Kaskade: NADPH, TR, TS<sub>2</sub>, Tpx, PxIII (die Analytik der strukturellen Integrität von PxIII kann Anhang Abbildung 6-2 entnommen werden) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Aktivität wurde über die Abnahme von NADPH, dem Sinken der Absorption bei 340 nm über die Zeit bestimmt. Die Aktivität des Tpx<sup>WT</sup> wurde auf 100% festgesetzt und die Aktivitäten der Mutanten relativ zu der des Tpx<sup>WT</sup> berechnet (Abbildung 3-11, Anhang Tabelle 6-11). Die Mutanten Tpx<sup>W39A</sup>, Tpx<sup>C40S</sup>, Tpx<sup>C43S</sup> und Tpx<sup>C40/43S</sup> zeigten fast keine bzw. keine Aktivität mehr im Px-Assay, die über die der spontanen Reduktion der Peroxid-Entgiftungs-Kaskade hinausgeht. Tpx<sup>W70A</sup> und Tpx<sup>I109A</sup> wiesen eine stark verringerte Aktivität auf. Tpx<sup>S38A</sup> ist leicht herabgesetzt in der Aktivität und die Mutanten Tpx<sup>R44A</sup>, Tpx<sup>Y81F</sup> und Tpx<sup>T129A</sup> sind ähnlich aktiv wie Tpx<sup>WT</sup>.

### 3.1.5 Der isolierte Tpx-Trypanothion-Komplex hat eine Halbwertszeit von ~4,8 Stunden

Die Reaktion:



ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Peroxid-Entgiftungs-Kaskade.<sup>[72]</sup> In früheren Studien von Gommel et al., 1997<sup>[72]</sup> wurde für Tpx aus *C. fasciculata* eine Geschwindigkeitskonstante k von  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und eine Wechselzahl (engl. *turnover number*,  $V_{max}/[E]$ ) von  $392 \text{ min}^{-1}$  für die Reaktion mit T(SH)<sub>2</sub> bestimmt.<sup>[72]</sup> Sowohl die Geschwindigkeitskonstante als auch die Wechselzahl wurden *in vitro* im gekoppelten Px-Assay ermittelt, welcher NADPH, TS<sub>2</sub>, Trypanothion-Reduktase (TR), Tpx, TXNPx und *t*-Butylhydroperoxid enthielt. Aus der Wechselzahl der Reaktion von Tpx mit T(SH)<sub>2</sub> ergibt sich eine Dauer von 0,15 s für die Formation und den Zerfall des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes in Anwesenheit der vollständigen Peroxid-Entgiftungs-Kaskade. In Kapitel 3.1.3 wurde die Interaktion von Tpx<sup>WT</sup> mit T(SH)<sub>2</sub> mittels NMR-Spektroskopie betrachtet. Die NMR-Aufnahmen jedes Titrationsschrittes von Tpx<sup>WT</sup> mit T(SH)<sub>2</sub> dauerten ~20 min (Abbildung 3-5). Da der Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex für die Dauer der NMR-Aufnahmen stabil war wurde vermutet, dass das isolierte Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Intermediat langsamer zerfällt als im gekoppelten Px-Assay. Dies warf die Frage auf: Was ist die Halbwertszeit des isolierten Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex? Hierfür wurde ein <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektrum von Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten Zustand aufgenommen und nachfolgend ein 1,5-facher molarer Überschuss T(SH)<sub>2</sub> zugegeben. Daraufhin wurde eine Serienaufnahme der NMR-Spektren über einen Zeitraum von ~11,5 h durchgeführt, mit einer Aufnahmedauer von 45 min für jedes Spektrum, um den Zerfall des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes zu verfolgen (Anhang Abbildung 6-6). Die NH-Resonanzen von Ala37, Ser38, Cys40 und Cys43 verbreitern sich direkt nach Zugabe von T(SH)<sub>2</sub>, sodass sie zunächst nicht mehr detektiert werden konnten (Abbildung 3-7; Abbildung 3-12). Nach einiger Zeit kehren diese Resonanzen jedoch zurück, was auf den Zerfall des Tpx-T(SH)<sub>2</sub> Komplexes hindeutet und es ermöglicht, die Zeitkonstante des Komplexzerfalls zu bestimmen. Daher wurden die Integrale dieser NH-Resonanzen in den einzelnen Spektren in Topspin bestimmt und gegen die entsprechenden Zeitpunkte nach der T(SH)<sub>2</sub>-Zugabe aufgetragen (Abbildung 3-12a). Außerdem wurden fünf Aminosäuren, Phe46, Thr47, Trp70, Ile109 und Ala127, ausgewählt, deren chemische Verschiebungen sich in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> im Vergleich zum oxidierten Zustand verschieben. Die Unterschiede der chemischen Verschiebungen zwischen dem oxidierten Zustand und den verschiedenen Zeitpunkten nach der T(SH)<sub>2</sub>-Zugabe wurden mit Gleichung 2-1 bestimmt und gegen die Zeitpunkte der NMR-Spektren in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> aufgetragen (Abbildung 3-12d). Die sigmoidalen

Kurven wurden mit GraphPad Prism gefittet und die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes anhand der sich verschiebenden Resonanzen der einzelnen Aminosäuren bestimmt (Tabelle 3-1).

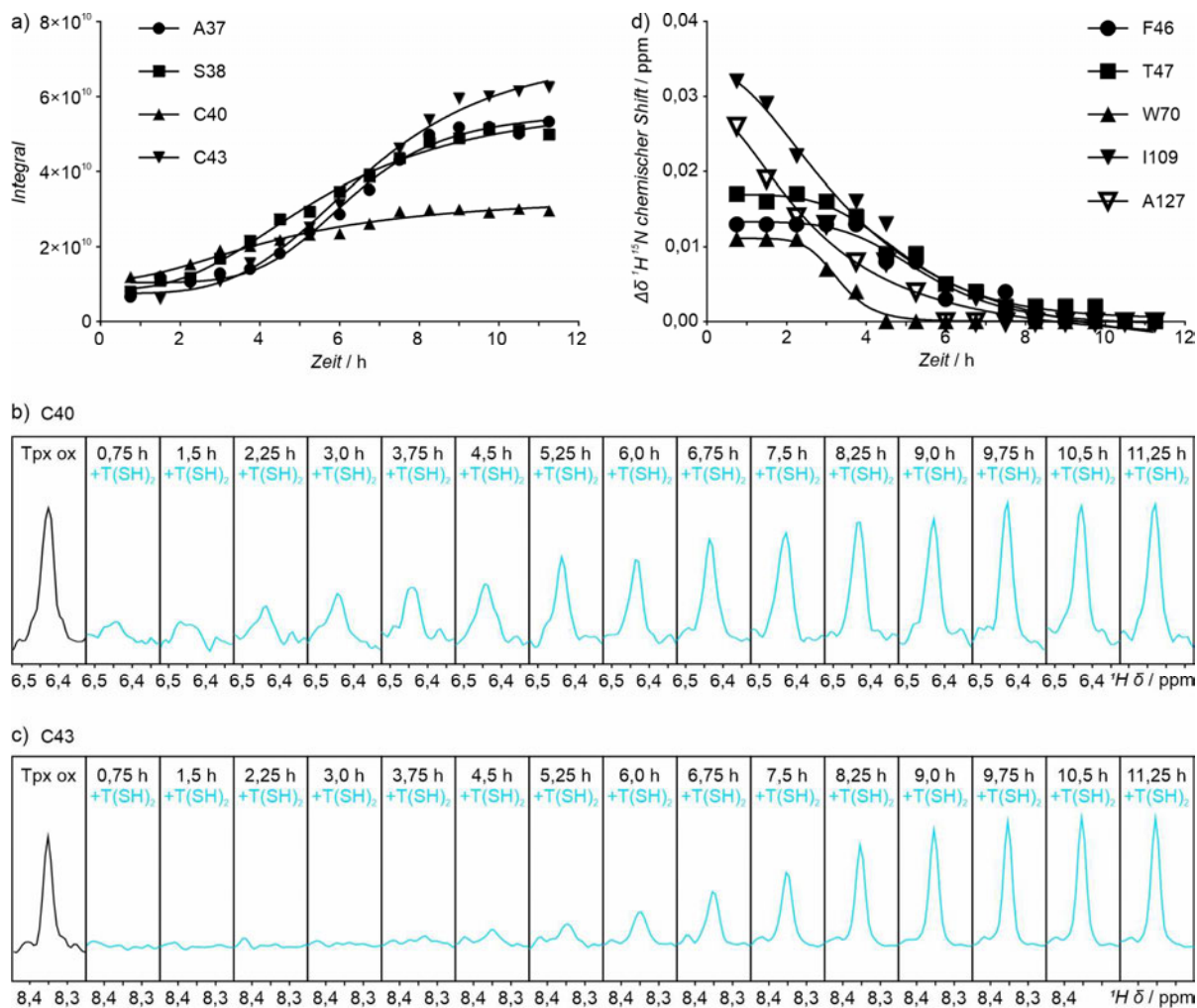


Abbildung 3-12 Bestimmung der Halbwertszeit  $t_{1/2}$  des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes mittels NMR-Spektroskopie. Es wurde ein 1,5-facher Überschuss T(SH)<sub>2</sub> zu oxidiertem <sup>15</sup>N-Tpx<sup>WT</sup> gegeben. Hiernach wurden über einen Zeitraum von 11,25 h <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC-Spektren (45 min pro Spektrum) aufgenommen. Die vollständigen NMR-Spektren sind in Anhang Abbildung 6-6 dargestellt. (a) Auftragung der Integrale der NH-Resonanzen von Ala37, Ser38, Cys40 und Cys43 gegen den Zeitpunkt nach der Zugabe von T(SH)<sub>2</sub>. Die 1D-Projektionen der <sup>1</sup>H-Ebene zeigt die wiederkehrende <sup>1</sup>H-Resonanz von (b) Cys40 und (c) Cys43 über die Zeit nach der Zugabe von T(SH)<sub>2</sub>. (d) Auftragung der Unterschiede der chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$  zwischen dem oxidierten Zustand und in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> in Abhängigkeit zum Zeitpunkt nach der T(SH)<sub>2</sub>-Zugabe.

Tabelle 3-1 NMR-spektroskopisch bestimmte Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex anhand der wiederkehrenden oder sich verschiebender Resonanzen einzelner Aminosäuren in Tpx. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  gibt die Anpassungsgüte des zur Bestimmung der Halbwertszeiten verwendeten Fits an.

Aminosäure	Halbwertszeit $t_{1/2}$ / h	$R^2$
Ala37	6,3	0,989
Ser38	5,7	0,993
Cys40	4,6	0,977
Cys43	6,7	0,995
Phe46	5,5	0,964
Thr47	5,0	0,986
Trp70	3,3	0,989
Ile109	3,7	0,983
Ala127	2,7	0,974
Mittelwert	4,8 h $\pm$ 1,3 h	

Es wurden für die einzelnen Aminosäuren Halbwertszeiten zwischen 2,7 h und 6,7 h für den Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex ermittelt. Daraus ergab sich ein Mittelwert von 4,8 h  $\pm$  1,3 h.

Abbildung 3-13 veranschaulicht noch einmal durch die spektralen Unterschiede des oxidierten, reduzierten und T(SH)<sub>2</sub>-gebundene Zustands von Tpx anhand der NH-chemischen Verschiebungen der Resonanzen der Aminosäuren Ile109 und Ala127, dass sich die drei Zustände unterscheiden. Außerdem zeigen die NH-Resonanzen 0,75 h und 5,25 h nach der Zugabe von T(SH)<sub>2</sub>, dass sich die chemische Umgebung der entsprechenden Aminosäuren wieder dem oxidierten Zustand annähert, aber überraschenderweise zu keinem Zeitpunkt dem reduzierten Zustand entspricht.

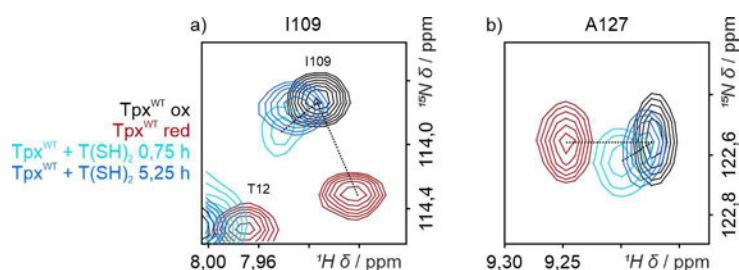


Abbildung 3-13 Visualisierung der Migration der NH-Resonanzen von Ile109 und Ala127 0,75 h und 5,25 h nach der Zugabe von T(SH)<sub>2</sub> im Vergleich zum oxidierten und reduzierten Zustand im 2D HSQC-Spektrum. Die <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC-Spektren vom Tpx<sup>WT</sup> wurden im oxidierten (schwarz) und reduzierten (2 mM TCEP, rot) Zustand aufgenommen. Des Weiteren sind die NMR-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> im T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand 0,75 h und 5,25 h nach der Zugabe von T(SH)<sub>2</sub> im molaren Verhältnis Tpx:T(SH)<sub>2</sub> 1:1,5 gezeigt. Es wurden als repräsentative Ausschnitte die NH-Resonanzen von (a) Ile109 und (b) Ala127 gewählt.

### 3.1.6 Untersuchung des Einflusses der konservierten Tpx-Tryptophanreste auf die Struktur der Oxidoreduktase und seiner Interaktion mit T(SH)<sub>2</sub>

Wie in den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.3 gezeigt, verändert sich die chemische Umgebung des Proteinrückgrats und der Seitenkette der Aminosäuren Trp39 und Trp70 in Tpx<sup>WT</sup> durch die Zugabe von T(SH)<sub>2</sub> (Abbildung 3-7). Des Weiteren ändert sich die chemische Verschiebung der NH-Resonanz der Seitenkette von Trp86 in Tpx<sup>WT</sup>, während die NH-Resonanz des Proteinrückgrats von Trp86 im reduzierten und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand nicht detektiert werden konnte (Abbildung 3-1; Abbildung 3-7). Zudem weisen die Einzelmutanten von Trp39 und Trp70, Tpx<sup>W39A</sup> und Tpx<sup>W70A</sup>, eine reduzierte Aktivität im gekoppelten Px-Assay (Abbildung 3-11) auf. Dies deutet an, dass die Tryptophanreste eine wichtige Rolle bei der Aktivität und dem Einnehmen verschiedener Redox-Zustände von Tpx haben könnten.

<i>Cf_Tpx</i>	MYHTLLYDFRDSVPHMSGLKFFPYSTNVLKGAAADIALPSLAGKTVFFYFSSASWCPPCR	60
<i>Tb_Tpx</i>	-----MSGGLAKYLPGATNLLSK-SGEVSLGSLVGKTVFLYFSSASWCPPCR	44
<i>Lm_Tpx</i>	-----MSGVAKHLGELKLRKQ-ADTADMDSLKGKTVFFYFSSASWCPPCR	44
<i>Hs_Trx</i>	-----MVKQIESKTAFAQEALDAAGDKLVVDFSATWCGPCCK	36
<i>Hs_Grx</i>	-----MAQEFVNCKIQPGKVVVFVFKPTCPYCR	27
	: . . . * * * :	
<i>Cf_Tpx</i>	AFTPQLIDFYKAHAEKKNFEVMLISWDESAEDFKDYAKMP---WLLALPFEDRKGMEFLT	117
<i>Tb_Tpx</i>	GFTPVLAEFYKHHVAKNFEVVLISWDENESDFHDYYGKMP---WLLALPFDQRSTVSELG	101
<i>Lm_Tpx</i>	GFTPQLVEFYKHHDSKNFEIILASWDEEEDDFNAYYAKMP---WLSIPFANRNIVEALT	101
<i>Hs_Trx</i>	MIKPFHSLSEKYSNVIFLEVDVDDCQDVASEC--EVKCMF---TFQFFKKGQKVGFEFSG	91
<i>Hs_Grx</i>	RAQEILSQLPIKQGLLEFVDITATNHT---NEIQDYLQQLTGARTVPRVFIGKDCI---G	81
	: .: . .: . : : . : :	
<i>Cf_Tpx</i>	TGFDVKSIPITLVGVEADSGNIITQARTMVVKDPEAKDFPWPVNEAKK	165
<i>Tb_Tpx</i>	KTFGVESIPITLITINADTGAIIGTQARTRVIEDPDGANFPWPN-----	144
<i>Lm_Tpx</i>	KKYSVESIPITLIGLNADTGDTVTTRARHALTQDPMGEQFPWRDE-----	145
<i>Hs_Trx</i>	A-----NKEKLEATINELV-----	105
<i>Hs_Grx</i>	G-----CSDLVSLQ-QSGELLTRLKQIGALQ-----	106
	: : . :	

Abbildung 3-14 Sequenzalignment von Tryparedoxinen (Tpx) aus verschiedenen Trypanosomatidenspezies, humanem Thioredoxin (Trx) und humanem Glutaredoxin (Grx) durchgeführt mit Clustal Omega. Verwendete Sequenzen: *Cf\_Tpx*: *C. fasciculata* TryparedoxinII (TpxII) (UniProt: O77093); *Tb\_Tpx*: *T. brucei* Tryparedoxin (UniProt: O77404); *Lm\_Tpx*: *L. major* Tryparedoxin1 (Tpx1) (UniProt: E9ADX4); *Hs\_Trx*: *Homo sapiens* Thioredoxin1 (TXN1) (UniProt: P10599); *Hs\_Grx*: *Homo sapiens* Glutaredoxin1 (GLRX1) (UniProt: P35754); Stern: über alle Alignments konservierte Aminosäure; Doppelpunkt: Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften; Punkt: Aminosäuren mit schwach ähnlichen Eigenschaften. (rot: Cysteinrest des aktiven Zentrums; gelb: Tryptophanrest)

Die Aminosäuresequenz von *TbTpx* beinhaltet vier hochkonservierte Tryptophanreste, Trp39, Trp70, Trp86 und Trp142, welche über Tryparedoxin-Proteine verschiedener Trypanosomatidenspezies konserviert sind (Abbildung 3-14). In diesem Punkt unterscheidet Tpx sich von den verwandten Oxidoreduktasen Thioredoxin (Trx) und Glutaredoxin (Grx). Die Sequenz von Trx beinhaltet nur einen einzigen Tryptophanrest, welcher sich N-terminal zum hoch konservierten, klassischen Sequenzmotiv des aktiven Zentrums (W)CGPC<sup>[136]</sup> befindet, aber üblicherweise nicht zum aktiven Zentrum gezählt wird. An der homologen Position im humanen Grx1 (UniProt P35754) befindet sich ebenfalls eine aromatische Aminosäure, ein Tyrosin. Im Gegensatz zu Trx und Grx, welche jeweils durch Thioredoxin-Reduktase und Glutathion im reduzierten Zustand gehalten werden, wird Tpx hauptsächlich durch T(SH)<sub>2</sub> reduziert. Interessanterweise sind Trp70 und Trp86 in Tpx Teil einer

sauren  $\alpha$ -Helix, der  $\alpha 2$ -Helix, die in der Struktur von Trx und Grx nicht vorkommt. Dies lässt vermuten, dass diese  $\alpha$ -Helix eine Rolle bei der Interaktion mit Trypanothion spielen könnte (Kapitel 3.1.3, 3.1.4 und 4.1.3). Zunächst wurde der Einfluss der Tryptophanreste auf die Struktur von Tpx und die Interaktion mit T(SH)<sub>2</sub> im Folgenden näher untersucht. Hierfür wurden die Tryptophanreste einzeln zu Alanin mutiert. Die Tpx<sup>W86A</sup>-Mutante ist unlöslich und konnte daher nicht für weitere Studien genutzt werden (Anhang Abbildung 6-7). Die drei anderen Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten, Tpx<sup>W39A</sup>, Tpx<sup>W70A</sup> und Tpx<sup>W142A</sup> konnten dagegen erfolgreich aufgereinigt werden (siehe SDS-PAGE Anhang Abbildung 6-4a).

Im ersten Schritt wurde die strukturelle Integrität der Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten analysiert (Abbildung 3-15). Alle drei Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten weisen eine leicht niedrigere Schmelztemperatur als Tpx<sup>WT</sup> auf (Tpx<sup>WT</sup>:  $71,0 \pm 0,6$  °C; Tpx<sup>W39A</sup>:  $68,1 \pm 0,9$  °C; Tpx<sup>W70A</sup>:  $66,2 \pm 0,1$  °C; Tpx<sup>W142A</sup>:  $67,6 \pm 1,2$  °C; Abbildung 3-15c). Die CD-Spektren von Tpx<sup>W39A</sup> und Tpx<sup>W70A</sup> (Abbildung 3-15a) und die darauf basierenden Sekundärstruktur-Vorhersagen (Abbildung 3-15b) sowie die Chromatogramme der analytischen Größenausschlusschromatographie (engl. *size exclusion chromatography*, SEC; Abbildung 3-15d) zeigen ein ähnliches Verhalten wie von Tpx<sup>WT</sup>. Mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (engl. *Small-Angle X-ray Scattering*, SAXS; eingehender in Kapiteln 3.2.3 und 3.2.4 behandelt) wurden die Gyrationradien von Tpx<sup>WT</sup>, Tpx<sup>W39A</sup> und Tpx<sup>W70A</sup> im oxidierten Zustand bestimmt (Abbildung 3-15e; Abbildung 3-33; Anhang Tabelle 6-18). Die Gyrationradien von Tpx<sup>W39A</sup> und Tpx<sup>W70A</sup> entsprechen dem Gyrationradius des Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten Zustand. Daher ist das leicht veränderte Laufverhalten zu einem geringeren Elutionsvolumen in der SEC von Tpx<sup>W39A</sup> nicht auf eine Störung in der strukturellen Integrität zurückzuführen. Allerdings weist Tpx<sup>W39A</sup> nur eine marginale Aktivität von  $2,3\% \pm 0,8\%$  und Tpx<sup>W70A</sup> eine beeinträchtigte Aktivität von  $21,6\% \pm 1,9\%$  im gekoppelten Px-Assay auf (Abbildung 3-15f). Die Dispersionen der <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektren von Tpx<sup>W39A</sup> und Tpx<sup>W70A</sup> sind ähnlich der des Tpx<sup>WT</sup> (Abbildung 3-15g). Die strukturelle Integrität von Tpx<sup>W39A</sup> und Tpx<sup>W70A</sup> scheint somit nicht durch die Punktmutation beeinflusst zu sein. Ein deutlich anderes Verhalten zeigt Tpx<sup>W142A</sup>. So weist das CD-Spektrum von Tpx<sup>W142A</sup> Unterschiede zu Tpx<sup>WT</sup> auf (Abbildung 3-15a), allerdings ist dieser Unterschied nur marginal in der Sekundärstruktur-Vorhersage ausgeprägt (Abbildung 3-15b). Des Weiteren eluiert Tpx<sup>W142A</sup> deutlich früher in der SEC als Tpx<sup>WT</sup> (Abbildung 3-15d). Das <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektrum von Tpx<sup>W142A</sup> weist zwar eine ähnliche Dispersion wie Tpx<sup>WT</sup> auf, allerdings ist ein Cluster aus NH-Resonanzen in der Mitte des NMR-Spektrums zu erkennen, was für einen ungefalteten Strukturanteil in Tpx<sup>W142A</sup> spricht (Abbildung 3-15g). Außerdem weisen einzelne NH-Resonanzen im HSQC-Spektrum von Tpx<sup>W142A</sup> Linienverbreiterungen auf, die auf eine Zunahme der lokalen Dynamik hindeuten. Trotz der beobachteten Veränderungen im SEC-Laufverhalten sowie den CD- und NMR-Spektren zeigt die Tpx<sup>W142A</sup>-Mutante im gekoppelten Px-Assay mit  $35,2\% \pm 2,5\%$  Restaktivität relativ zu Tpx<sup>WT</sup> eine geringere Einbuße bei der Aktivität als Tpx<sup>W70A</sup> und Tpx<sup>W39A</sup> (Abbildung 3-15f).

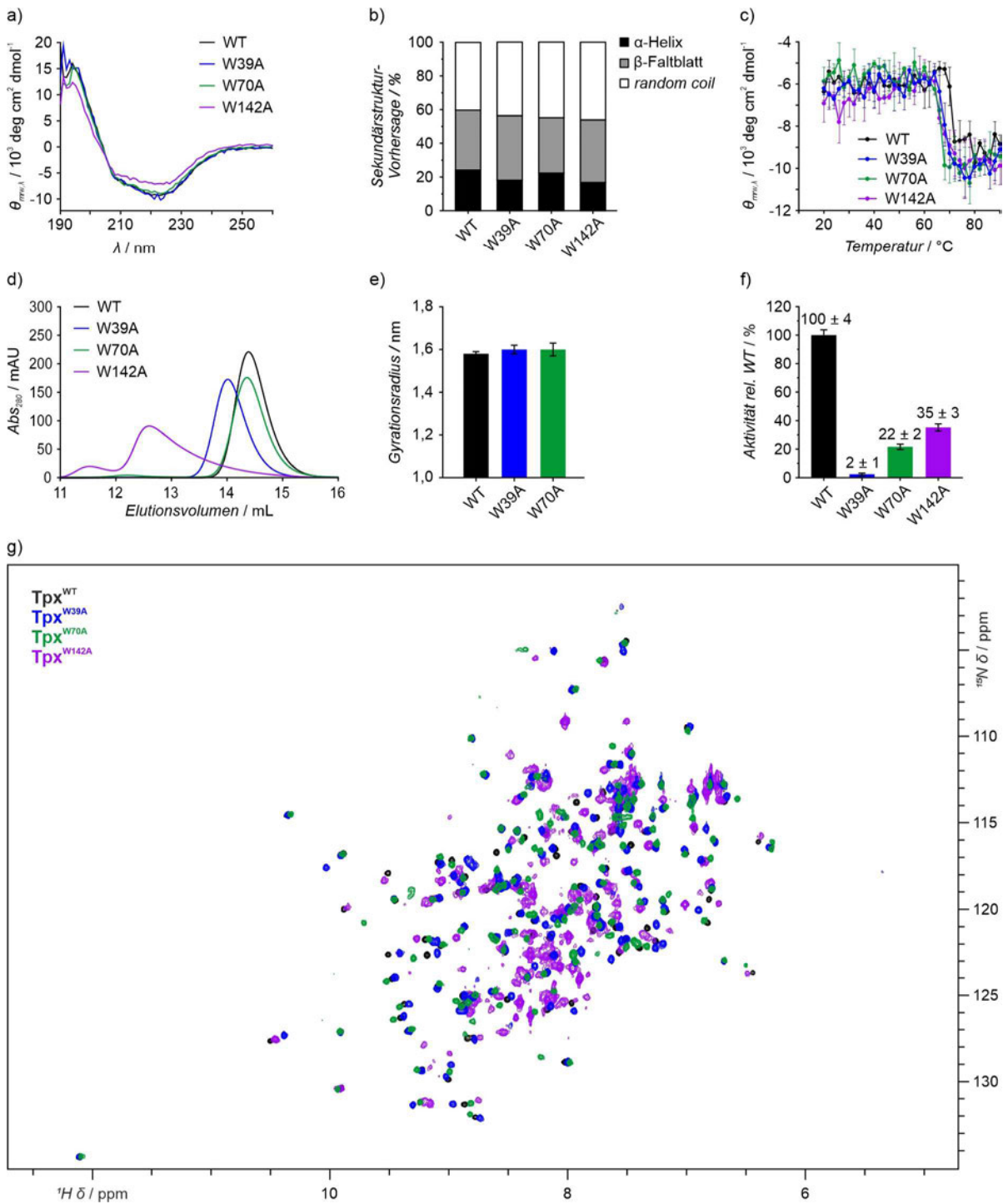


Abbildung 3-15 Strukturelle Integrität der Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten im Vergleich zu Tpx<sup>WT</sup>. (a) Circular Dichroismus-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten (mit 10 μM Protein). (b) Vorhersage der Sekundärstruktur mittels BeStSel basierend auf den CD-Spektren in (a). (c) CD-spektroskopische Untersuchung der Schmelztemperatur bei 208 nm (10 μM). (d) SEC-Läufe von Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten (200 μL 100 μM). Die unterschiedliche Intensität der Absorption der Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten im Vergleich zum Tpx<sup>WT</sup> kommt durch den veränderten Extinktionskoeffizienten der Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten zustande. (e) Gyrationradien von Tpx<sup>WT</sup>, Tpx<sup>W39A</sup> und Tpx<sup>W70A</sup> im oxidierten Zustand basierend auf SAXS Messungen. (f) Relative Aktivitäten von Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten im Vergleich zu Tpx<sup>WT</sup>. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei Messungen. (g) <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> (schwarz), Tpx<sup>W39A</sup> (blau), Tpx<sup>W70A</sup> (grün) und Tpx<sup>W142A</sup> (violett) im oxidierten Zustand.

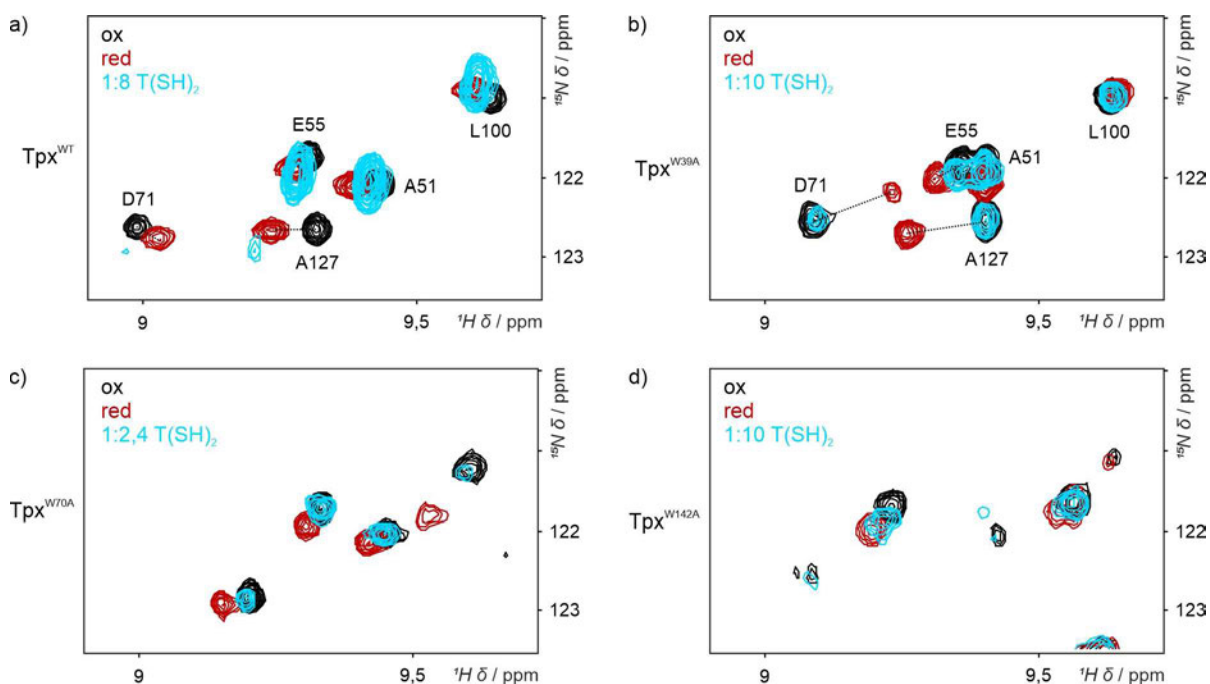


Abbildung 3-16 Ausschnitte der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HSQC-Spektren von  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$ ,  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$ ,  $\text{Tpx}^{\text{W70A}}$  und  $\text{Tpx}^{\text{W142A}}$  im oxidierten und reduzierten Zustand sowie in Anwesenheit von  $\text{T}(\text{SH})_2$ . (a)  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  im oxidierten, reduzierten Zustand und in Anwesenheit von 1:8  $\text{T}(\text{SH})_2$ . (b)  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$  im oxidierten, reduzierten Zustand und in Anwesenheit von 1:10  $\text{T}(\text{SH})_2$ . (c)  $\text{Tpx}^{\text{W70A}}$  im oxidierten, reduzierten Zustand und in Anwesenheit von 1:2,4  $\text{T}(\text{SH})_2$ . (d)  $\text{Tpx}^{\text{W142A}}$  im oxidierten, reduzierten Zustand und in Anwesenheit von 1:10  $\text{T}(\text{SH})_2$ . Für alle  $\text{Tpx}$ -Proteine ist das HSQC-Spektrum mit der höchsten eingesetzten  $\text{T}(\text{SH})_2$ -Konzentration gezeigt. Die vollständigen NMR-Spektren sind Anhang Abbildung 6-9, Abbildung 6-10, Abbildung 6-11 und Abbildung 6-12 zu entnehmen. (schwarz: oxidiertes Zustand; rot: reduzierter Zustand; hellblau: in Anwesenheit von  $\text{T}(\text{SH})_2$ )

Basierend auf den verminderten Restaktivitäten der  $\text{Tpx}^{\text{W/A}}$ -Mutanten im gekoppelten Px-Assay kann nur die Aussage getroffen werden, dass die Punktmutationen die Aktivität von  $\text{Tpx}$  herabsetzen, jedoch können keine Rückschlüsse auf die genauen Gründe gezogen werden. Im Folgenden wurde daher die Fähigkeit der  $\text{Tpx}^{\text{W/A}}$ -Mutanten untersucht, den Redox-Zustand zu wechseln und  $\text{T}(\text{SH})_2$  zu binden. Es wurden zusätzlich zu den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HSQC-Spektren im oxidierten Zustand von jeder  $\text{Tpx}^{\text{W/A}}$ -Mutante auch NMR-Spektren in Anwesenheit von Reduktionsmittel (2 mM TCEP) und  $\text{T}(\text{SH})_2$  aufgenommen (Abbildung 3-16; Anhang Abbildung 6-9; Abbildung 6-10; Abbildung 6-11; Abbildung 6-12). Die Position der Resonanzen von  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$  verändert sich vom oxidierten zum reduzierten Zustand allerdings sind keine Unterschiede zwischen dem oxidierten Zustand und in Anwesenheit von  $\text{T}(\text{SH})_2$  zu erkennen (Abbildung 3-16b). Es scheint somit keine Interaktion zwischen  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$  und  $\text{T}(\text{SH})_2$  stattzufinden. Die chemische Umgebung der NH-Resonanzen in  $\text{Tpx}^{\text{W70A}}$  verändert sich zwischen allen drei Zuständen (Abbildung 3-16c). Jedoch sind die Unterschiede zwischen oxidiertem und  $\text{T}(\text{SH})_2$ -gebundenem Zustand gering. Die NH-Resonanzen in  $\text{Tpx}^{\text{W142A}}$  weisen ein ähnliches Verhalten wie in  $\text{Tpx}^{\text{W70A}}$  auf (Abbildung 3-16d). Wie in Kapitel 3.1.3 gezeigt und in Kapitel 4.1.4 diskutiert, besteht die Komplexbildung von  $\text{Tpx}$  und  $\text{T}(\text{SH})_2$  möglicherweise aus einem kovalenten und nicht-kovalenten Bindeereignis, wobei das nicht-kovalente Bindeereignis vermutlich konzentrationsabhängig ist. Die Veränderungen der NH-Resonanzen in  $\text{Tpx}^{\text{W142A}}$  in Anwesenheit von  $\text{T}(\text{SH})_2$  erscheinen zwar größer als in  $\text{Tpx}^{\text{W70A}}$ , allerdings wurde hier auch ein höheres  $\text{Tpx}:\text{T}(\text{SH})_2$ -Verhältnis verwendet. Aufgrund der fehlenden Zuordnungen der NH-Resonanzen von  $\text{Tpx}^{\text{W70A}}$  und  $\text{Tpx}^{\text{W142A}}$  kann keine Aussage getroffen werden, welche Aminosäuren in den beiden  $\text{Tpx}^{\text{W/A}}$ -Mutanten durch den Wechsel des Redox-Zustands oder die Zugabe von  $\text{T}(\text{SH})_2$  Veränderungen in der

chemischen Umgebung erfahren. Dennoch lassen die Beobachtungen vermuten, dass alle Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten vom oxidierten in den reduzierten Zustand wechseln können, allerdings zeigen nur Tpx<sup>W70A</sup> und Tpx<sup>W142A</sup> eine Interaktion mit T(SH)<sub>2</sub> und dies möglicherweise in geminderter Form.

Die fehlende Interaktion von Tpx<sup>W39A</sup> mit T(SH)<sub>2</sub> führte zu der Frage, ob ausschließlich das Fehlen der Indol-Seitenkette in Tpx<sup>W39A</sup> verantwortlich für die gestörte T(SH)<sub>2</sub>-Interaktion ist oder ob es durch die Mutation doch zu strukturellen Veränderungen in Tpx<sup>W39A</sup> kommt? Die Mutation von Trp39 könnte einen Einfluss auf einzelne Aminosäuren oder Abschnitte haben, ohne jedoch die generelle Sekundärstruktur von Tpx zu beeinflussen. Wie in Abbildung 3-15g gezeigt, ist die Dispersion der NH-Resonanzen im NMR-Spektrum von Tpx<sup>W39A</sup> ähnlich der des Tpx<sup>WT</sup>, allerdings sind Unterschiede in den Positionen einzelner NH-Resonanzen zu erkennen. Um die chemischen Verschiebungen von Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>W39A</sup> vergleichen zu können, wurden die Aminosäuren den NH-Resonanzen von einheitlich markiertem <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N Tpx<sup>W39A</sup> im oxidierten und reduzierten Zustand mit Hilfe von Standard-Triple-Resonanzpulssequenzen zugeordnet (Anhang Abbildung 6-13). Die NH-Resonanz von Gly1, Ser2, Gly24, Cys40 und Ser95 in Tpx<sup>W39A</sup> konnten im oxidierten Zustand und die Resonanzen Ala37, Arg44, Trp86 und Ser95 im reduzierten Zustand nicht zugeordnet werden. Die Unterschiede der chemischen Verschiebungen zwischen Tpx<sup>W39A</sup> und Tpx<sup>WT</sup> wurden mittels Gleichung 2-1 jeweils im oxidierten oder reduzierten Zustand berechnet (Abbildung 3-17a und b; Anhang Tabelle 6-12 und Tabelle 6-13). Für die Berechnung der Standardabweichungen wurden alle Unterschiede  $\Delta\delta$  verwendet, ausgenommen Prolinreste und nicht zugeordnete Resonanzen sowie Ala39.<sup>[134]</sup> Die Amidresonanzen der Aminosäuren Ser36, Cys43, Arg44, Val49, Leu50, Ser69, Trp70 (H $\epsilon$ -N $\epsilon$ -Resonanz), Asn73, Asp76, Tyr81, Gly82, Ile109 und Thr111 wiesen geringe Unterschiede  $\geq 1\sigma$  zwischen Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>W39A</sup> im oxidierten Zustand auf. Unterschiede  $\Delta\delta \geq 2\sigma$  zwischen Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>W39A</sup> im oxidierten Zustand zeigten die NH-Resonanzen der Aminosäuren Ala37, Ser38, Thr47, Trp70 (Proteinrückgrat), Glu72, Phe77 und Asp79. Geringere Unterschiede  $\geq 1\sigma$  zwischen Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>W39A</sup> im reduzierten Zustand konnten für die Aminosäuren Phe46, Asp79, Gly82 und Gln126 beobachtet werden. Die NH-Resonanzen von Ser36, Ser38, Cys40, Trp70 (Proteinrückgrat), Asp71, Glu72, Asn76 und Phe77 wiesen Unterschiede  $\geq 2\sigma$  zwischen Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>W39A</sup> im reduzierten Zustand auf. Für einen besseren Bezug zur Struktur von Tpx wurden die Unterschiede in der Kristallstruktur von *T. brucei* Tpx (PDB 1o73) eingefärbt (Abbildung 3-17c und d). Die größten Unterschiede zwischen Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>W39A</sup> lassen sich somit sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand um die Punktmutation selbst herum sowie N-terminal zu und innerhalb von  $\alpha$ 2-Helix finden.

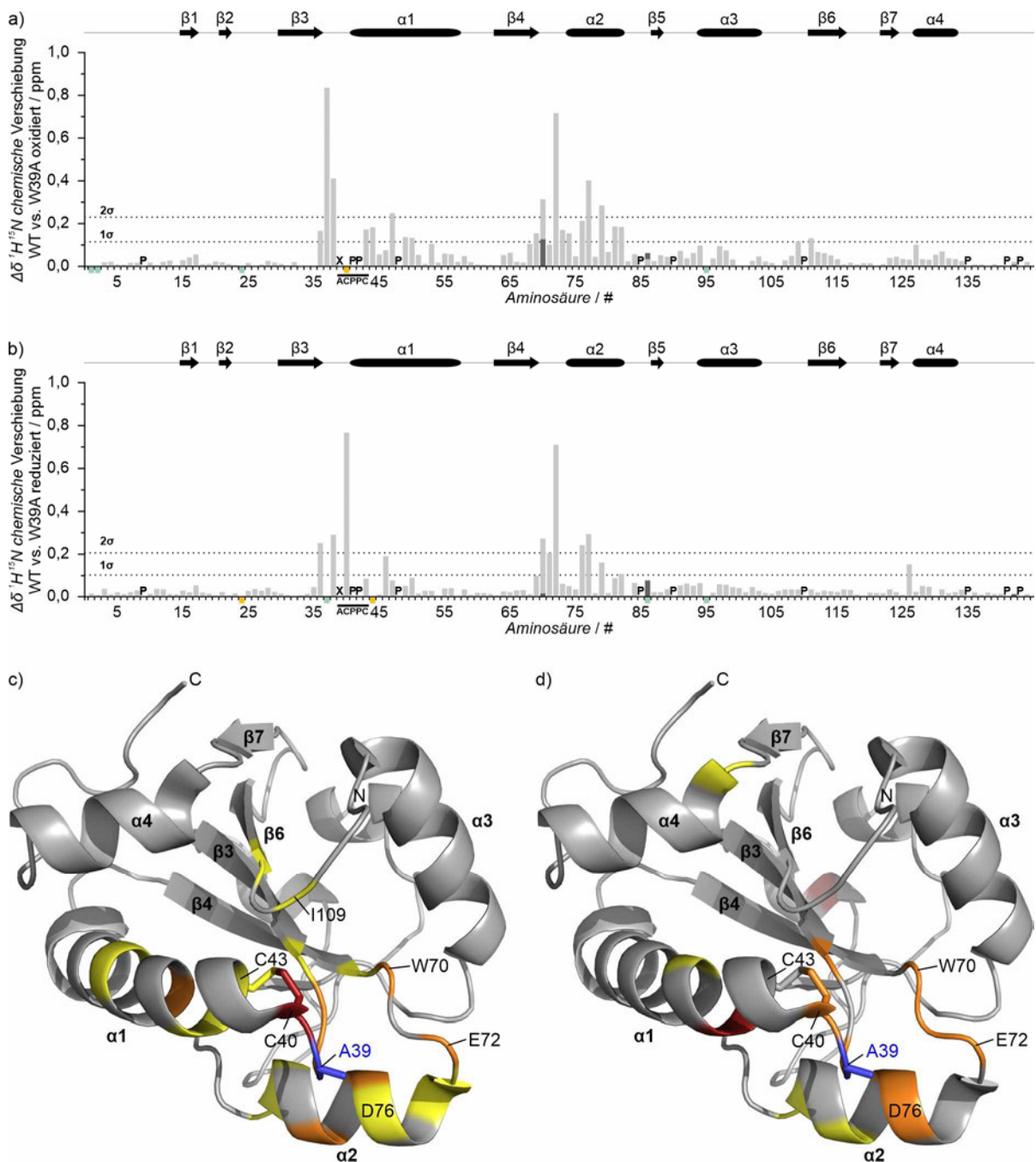


Abbildung 3-17 Unterschiede  $\Delta\delta$  der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebung im 2D HSQC NMR-Spektrum zwischen  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  und  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$ . Säulendiagramme der Unterschiede der chemischen Verschiebungen zwischen  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  und  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$ , beide im (a) oxidierten oder (b) im reduzierten Zustand, aufgetragen gegen die Aminosäurenummerierung. Das aktive Zentrum  $\text{A}^{39}\text{C}^{\text{PPPC}}\text{C}^{43}$  von  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$  ist hervorgehoben. Die gestrichelten Linien repräsentieren die einfache ( $1\sigma$ ) und zweifache ( $2\sigma$ ) Standardabweichung. Die einfache Standardabweichung ( $1\sigma$ ) beträgt für den Vergleich von  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  und  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$  beide im oxidierten Zustand 0,115 ppm und die zweifache Standardabweichung ( $2\sigma$ ) 0,230 ppm sowie 0,103 ppm ( $1\sigma$ ) und 0,206 ppm ( $2\sigma$ ) für die Unterschiede zwischen  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  und  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$  im reduzierten Zustand. Die Standardabweichungen entsprechen in etwa der Standardabweichung zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand in  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  (0,103 ppm). Über dem Säulendiagramm ist die Topologie von Tpx dargestellt. (X: Punktmutation; P: Prolinrest; gelb: Resonanz fehlt im NMR-Spektrum von  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$ ; grün: NH-Resonanz fehlt sowohl im NMR-Spektrum von  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  als auch im NMR-Spektrum von  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$ ). Kartierung der Unterschiede der chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$  zwischen  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  und  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$ , beide im (c) oxidierten oder (d) reduzierten Zustand, auf die Kristallstruktur von *T. brucei* Tpx (PDB:1o73). Es sind die Sekundärstrukturelemente gekennzeichnet. (blau: Punktmutante W39A; gelb: Unterschied  $\geq 1\sigma$ ; orange: Unterschied  $\geq 2\sigma$ ; rot: fehlende Resonanz in  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$ )

## 3.2 Untersuchung der Interaktion von Tpx mit einem kovalenten Inhibitor

### 3.2.1 Die kovalente Bindung von CFT an Tpx ist essenziell für die inhibitorische Wirkung

Füller et al. fanden 2012 im Rahmen einer Testung von fast 80.000 Molekülen gegen die *T. brucei* Peroxid-Entgiftungs-Kaskade zwölf zeitabhängige Inhibitoren gegen Tpx.<sup>[21]</sup> 2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on (CFT; Abbildung 3-19a) und vier weitere Inhibitoren binden unter der Eliminierung von Hydrogenchlorid HCl an Cys40 im aktiven Zentrum von Tpx. Mit seinem hohen Selektivitätsindex von

>83 zwischen den EC<sub>50</sub>-Werten in Blutstrom *T. brucei*- (72 h: 0,6 ± 0,1 µM) und HeLa-Zellen (72 h: >50 µM) hebt sich CFT von den anderen identifizierten Inhibitoren als besonders vielversprechende Leitstruktur ab.<sup>[21]</sup> Aufgrund der guten inhibitorischen Wirkung von CFT auf Tpx war die weiterführende Frage: Wie interagiert CFT mit Tpx auf molekularer Ebene? Als ersten Schritt für die Aufklärung der Tpx-CFT-Interaktion wurde die Rolle der kovalenten Bindung untersucht. Hierfür synthetisierte [REDACTED], Doktorand im Arbeitskreis von Prof. Dr. [REDACTED] an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, neben CFT auch ein Derivat ohne die Chlor-Abgangsgruppe, 2-methyl-5-(4-fluorphenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-on (MFT; Abbildung 3-19b).<sup>[111]</sup> Ohne die Chlorid-Abgangsgruppe kann es zu keiner nucleophilen Substitution des Chlorids durch den Schwefel des Cys40 in Tpx und folglich zu keiner kovalenten Bindung kommen.

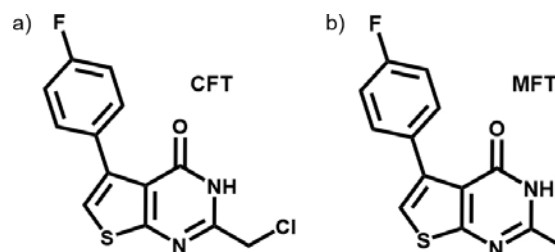


Abbildung 3-19 Molekülstruktur von (a) CFT und (b) MFT.<sup>[21,111]</sup>

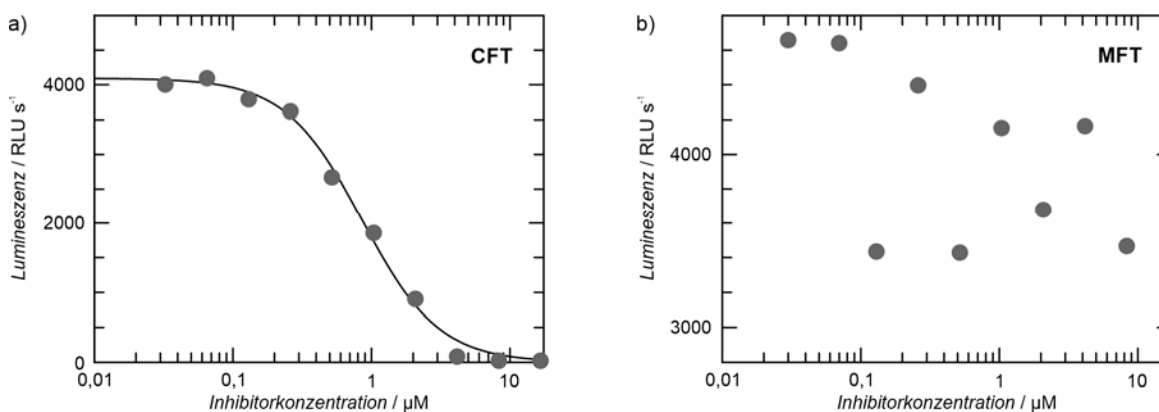


Abbildung 3-18 Antitrypanosomale Aktivität von (a) CFT und (b) MFT gegen BSF *T. brucei*-Zellen. Der Anteil lebendiger Zellen wurde mittels ATPlite Assay<sup>[136]</sup> gemäß dem Protokoll von Füller et al.<sup>[21]</sup> bestimmt. Gezeigt ist die Auftragung der Lumineszenz (RLU s<sup>-1</sup> = relative light unit pro s) in Abhängigkeit zur Inhibitorkonzentration (32,5 nM bis 16,7 µM) einer repräsentativen Messung nach 24 h Inkubationszeit.

Für die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von CFT und MFT wurde analog zu Füller et al., 2012<sup>[21]</sup> die antitrypanosomale Aktivität beider Substanzen bestimmt. Hierfür wurden *T. b. brucei*-Blutstromzellen 24 h, 48 h und 72 h in Anwesenheit von CFT oder MFT kultiviert und der sogenannte ATPlite Assay durchgeführt.<sup>[137]</sup> ATP ist ein Marker für die Lebensfähigkeit von Zellen.<sup>[138]</sup> Durch den Zelltod bzw. die Zerstörung der Zellmembran wird die Produktion von ATP unterbunden und im Zytoplasma lokalisierte ATPasen verbrauchen das vorhandene ATP-Reservoir in kurzer Zeit. Der

Assay basiert auf der ATP-abhängigen Reaktion von D-Luciferin zu Oxyluciferin, katalysiert von *Firefly* Luciferase in Anwesenheit von Magnesium. Die Reaktion resultiert in der angeregten Ketoform von Oxyluciferin, welche Licht emittiert. Mit abnehmender ATP-Konzentration (weniger überlebenden Zellen) sinkt das detektierte Biolumineszenzsignal, welches zusammen mit der eingesetzten Inhibitorkonzentration genutzt werden kann, einen  $EC_{50}$ -Wert zu bestimmen (Abbildung 3-18). Die so erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven lieferten für CFT folgende  $EC_{50}$ -Werte:  $1,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$  (24 h;  $3,0 \pm 0,9 \mu\text{M}$  (48 h);  $6,3 \pm 2,0 \mu\text{M}$  (72 h) (Abbildung 3-18a).<sup>[111]</sup> Die Messwerte des ATPlite-Assays für MFT ergaben keine ersichtliche Abnahme der Biolumineszenz bei steigender MFT-Konzentration und es konnte kein  $EC_{50}$ -Wert bestimmt werden (Abbildung 3-18b). Die höchste eingesetzte MFT-Konzentration entsprach  $16,7 \mu\text{M}$ . Es könnte eine antitrypanosomale Aktivität über  $16,7 \mu\text{M}$  vorliegen, allerdings konnten keine Messungen mit höheren Konzentrationen durchgeführt werden, aufgrund der Unlöslichkeit von MFT in wässrigem Medium.

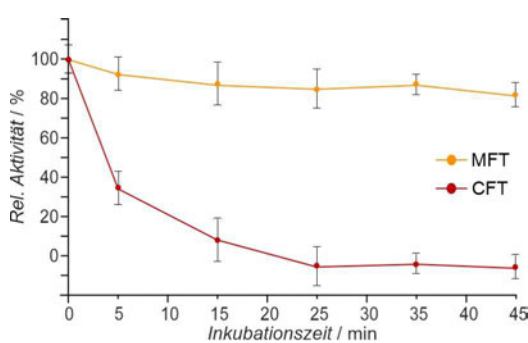


Abbildung 3-20 Zeitabhängige Inhibition der Px-Kaskade durch CFT oder MFT bei einem 1:1 Tpx:Inhibitor Verhältnis (jeweils  $5 \mu\text{M}$ ). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen dar (drei biologische Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten). Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

Des Weiteren wurde die inhibitorische Wirkung von CFT und MFT *in vitro* im gekoppelten Px-Assay bestimmt. Die Komponenten der Kaskade, ausgenommen  $\text{H}_2\text{O}_2$ , welches zum Starten der Aktivitätsmessung verwendet wurde, wurden für 5, 15, 25, 35 und 45 min mit einem 1:1 molaren Verhältnis von CFT oder MFT zu Tpx inkubiert. Die relative Tpx-Aktivität wurde aus der Abnahme der Absorption von NADPH abgeleitet. Nach ~25 min Inkubation mit CFT, kommt die messbare Enzymaktivität der Kaskade vollständig zum Erliegen, was durch die vollständige Sättigung von Tpx durch den kovalenten Inhibitor erklärt werden könnte (Abbildung 3-20). MFT zeigt innerhalb einer Inkubationszeit von 45 min keinerlei Inhibitionsfähigkeit der Kaskade. Somit weist MFT sowohl *in vivo* als auch *in vitro* keine inhibitorische Wirkung auf.

Neben der Betrachtung der inhibitorischen Wirkung von CFT und MFT wurde auch die Interaktion mit Tpx auf molekularer Ebene untersucht. Hierfür wurden  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D NMR-Spektren von  $^{15}\text{N}$  Tpx<sup>WT</sup> in Ab- und Anwesenheit von CFT oder MFT aufgenommen (Anhang Abbildung 6-14; Abbildung 6-15). Es wurde hierzu durch 2 mM TCEP reduziertes Tpx<sup>WT</sup> verwendet, da in Füller et al., 2012<sup>[21]</sup> gezeigt werden konnte, dass CFT nur an Cys40 binden kann, wenn die Cystein-Seitenkette als freie Thiolgruppe vorliegt. Als Kontrolle wurde ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HSQC-Spektrum in Anwesenheit von 1% DMSO aufgenommen, da CFT und MFT in DMSO gelöst waren (Anhang Abbildung 6-16). Es sind keine Unterschiede zwischen den HSQC-Spektren in Ab- und Anwesenheit von DMSO zu erkennen. Der Ausschnitt der NMR-Spektren im reduzierten und CFT-gebundenen Zustand von Tpx<sup>WT</sup> zeigt jedoch deutliche Unterschiede der chemischen Verschiebung und Intensitäten der beobachteten Resonanzen zwischen den Spektren, was auf eine Interaktion zwischen Tpx und CFT hinweist (Abbildung 3-21a). Die NH-Resonanzen der Spektren mit und ohne MFT wiederum liegen exakt aufeinander und zeigen keinerlei Veränderung der Position oder der Intensität (Abbildung 3-21b).

Wie in den Kapiteln 3.1.5 und 4.1.5 eingehender dargelegt, sind aufgrund der jeweiligen Konzentrationen und Reaktivitäten die in der Parasitenzelle vorliegenden Tpx-Zustände vermutlich hauptsächlich die oxidierte oder die T(SH)<sub>2</sub>-gebundene Form. Ausgehend von dieser Annahme und der Tatsache, dass CFT *in vivo* eine gute Inhibition aufweist und Füller et al gezeigt haben, dass der kovalente Tpx-CFT-Komplex auch in der Zelle gebildet wird,<sup>[21]</sup> muss eine Verdrängung des T(SH)<sub>2</sub> durch CFT stattfinden, um eine kovalente Bindung zwischen CFT und Tpx in der Zelle auszubilden. Um diesen Mechanismus für CFT und MFT zu untersuchen, wurde im ersten Schritt zu oxidiertem Tpx<sup>WT</sup> T(SH)<sub>2</sub> im molaren Verhältnis 1:2,4 zugegeben. Wie in Kapitel 3.1.3 ausführlich dargestellt, bildet Tpx unter diesen Bedingungen mit T(SH)<sub>2</sub> einen stabilen Komplex (Abbildung 3-5). Im zweiten Schritt wurden dann CFT oder MFT in einem molaren Verhältnis von 1:1,2 (Tpx:Inhibitor) hinzugegeben (Anhang Abbildung 6-17; Abbildung 6-18). Nach Zugabe von T(SH)<sub>2</sub> kommt es zu den erwarteten Veränderungen der Positionen der NH-Resonanzen. Die Zugabe von CFT führt zu einer weiteren Verschiebung, die weder dem oxidierten noch dem T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand entsprechen (Abbildung 3-21c). Somit scheint CFT die Bindung zwischen Tpx und T(SH)<sub>2</sub> unterbrechen zu können und der Tpx-CFT-Komplex ausgebildet zu werden. Dies ist jedoch nicht ohne die Chlor-Abgangsgruppe möglich. Die Anwesenheit von MFT unterbricht die Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Bindung nicht (Abbildung 3-21d).

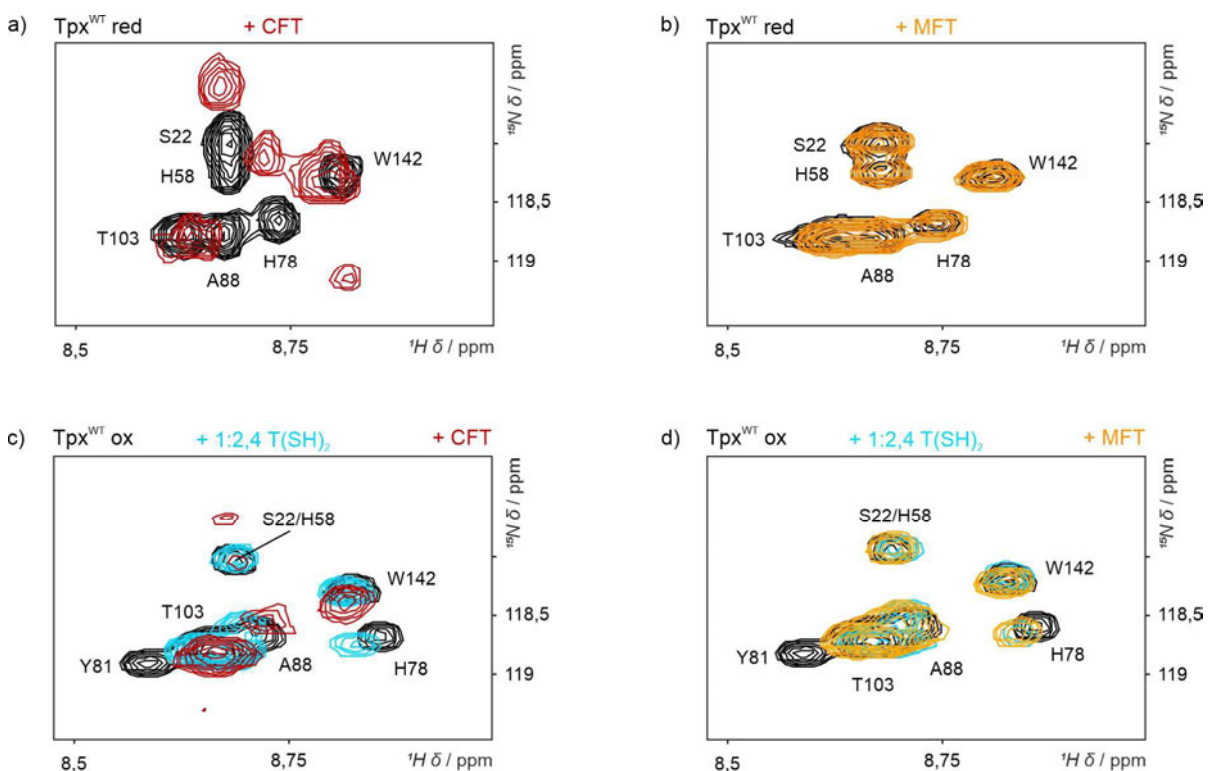
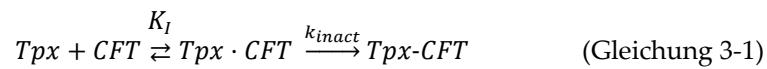


Abbildung 3-21 Ausschnitte der <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D NMR-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> in Anwesenheit von CFT oder MFT unter verschiedenen Bedingungen. (a) HSQC-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> im reduzierten Zustand (2 mM TCEP, schwarz), welchem im molaren Verhältnis 1:1,5 CFT hinzugefügt wurde (rot). (b) Best-Trosy-HSQC-Spektren von reduziertem Tpx<sup>WT</sup> (2 mM TCEP; schwarz), zu welchem im Verhältnis 1:1,5 MFT hinzugefügt wurde (orange). (c) Best-Trosy-HSQC-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten Zustand (schwarz), welchen im ersten Schritt im molaren Verhältnis 1:2,4 T(SH)<sub>2</sub> (hellblau) und im zweiten Schritt 1:1,2 CFT zugegeben wurde. (d) Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten Zustand (schwarz), wurde im ersten Schritt mit 1:2,4 T(SH)<sub>2</sub> (hellblau) versetzt und im zweiten Schritt 1:1,2 MFT (orange) hinzugefügt. Die vollständigen NMR-Spektren sind im Anhang in Abbildung 6-14, Abbildung 6-15, Abbildung 6-17, und Abbildung 6-18 dargestellt.

Eine weitere Art die Interaktion zwischen einem Protein und einem Inhibitor zu beschreiben, ist die Analyse der Kinetik der Inhibition. Die Bildung der kovalenten Bindung zwischen Tpx und CFT verläuft in zwei Schritten und lässt sich durch die nachfolgende Gleichung beschreiben:



Der Quotient  $k_{inact}/K_I$  ist eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung ( $k_{2nd}$ ). Er beschreibt die Effizienz der Gesamtreaktion von freiem Enzym zum kovalenten Enzym-Inhibitor Komplex und ist somit ein Maß für die Inhibitionsstärke eines irreversiblen Inhibitors. Diese resultiert aus der Potenz der initialen reversiblen Komplexbildung ( $K_I$ ) und der maximalen potentiellen Geschwindigkeit der Inaktivierung ( $k_{inact}$ ):<sup>[139]</sup>



mit:

$$k_{2nd} = \frac{k_{inact}}{K_I} \quad (\text{Gleichung 3-3})$$

Für die Betrachtung dieser Größen wurde die zeitabhängige Inhibition der Peroxid-Entgiftungs-Kaskade im gekoppelten Px-Assay bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen und konstanter Tpx-Konzentration bestimmt (Abbildung 3-22a). Die inhibitorkonzentrationsabhängigen Inhibitionskurven von Tpx wurden gegen die Zeit aufgetragen und mit GraFit gefittet, um  $k_{obs}$  (engl. *observed rate of inactivation*) zu erhalten:<sup>[139,140]</sup>

$$Inhibition (\%) = 100 (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (\text{Gleichung 3-4})$$

Wird  $k_{obs}$ , welche die beobachtete Inhibitionsgeschwindigkeit darstellt, gegen die entsprechende Inhibitorkonzentration geplottet und linear gefittet, ergibt sich aus der Steigung des linearen Fits  $k_{2nd}$ . Es wurden hohe Inhibitorkonzentrationen verwendet, um die Annahme zu erfüllen, dass die Inhibitorkonzentration sich während der Messung nicht verändert. Die Steigung des linearen Fits der Auftragung von  $k_{obs}$  gegen die Inhibitorkonzentration liefert einen  $k_{2nd}$ -Wert von  $0,104 \pm 0,097 * 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (Abbildung 3-22b). In Folge einer doppelt reziproken Auftragung von  $1/k_{obs}$  gegen  $1/[I]$  ergeben sich  $K_I$  und  $k_{inact}$  (Abbildung 3-22b Einsatz).

$$k_{obs} = \frac{k_{inact} [I]}{K_I + [I]} \quad (\text{Gleichung 3-5})$$

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{K_I}{k_{inact}} \frac{1}{[I]} + \frac{1}{k_{inact}} \quad (\text{Gleichung 3-6})$$

Aus dem doppelt-reziproken Plot ergab sich ein ähnlicher Wert für  $k_{2nd}$  von  $0,234 \pm 0,064 * 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Der Schnittpunkt des linearen Fits mit der y-Achse entspricht  $k_{inact}$  ( $4,6 \pm 1,4 \text{ min}^{-1}$ ). Ausgehend von  $k_{2nd}$  und  $k_{inact}$  konnte nun  $K_I = 22,16 \pm 9,95 \text{ } \mu\text{M}$  ermittelt werden.<sup>[111]</sup>

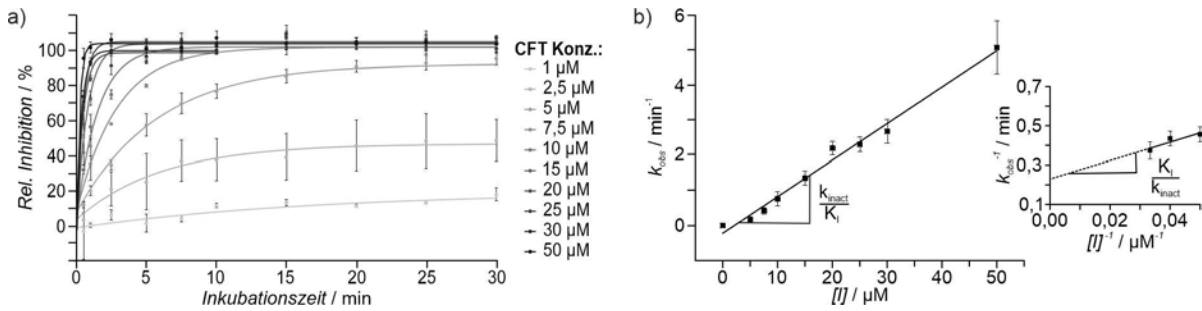


Abbildung 3-22 Analyse der Inhibitionskinetik von Tpx durch CFT. (a) Zeitabhängige Inhibitionskurven der im gekoppelten Px-Assay rekonstituierten Peroxid-Entgiftungs-Kaskade bei verschiedenen CFT-Konzentrationen (Tpx: 5 µM und CFT: 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 30; 50 µM). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei Messungen. (b) Auftragung der beobachteten Rate der Enzyminaktivierung ( $k_{\text{obs}}$ ), erhalten aus (a), gegen die Inhibitorkonzentration. Das eingezeichnete Steigungsdreieck verdeutlicht, dass die Steigung des linearen Fits dem Quotient aus  $k_{\text{inact}}$  und  $K_i$  entspricht. Der Einsatz zeigt die doppelt-reziproke Auftragung von  $k_{\text{obs}}$  gegen die Inhibitorkonzentration. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

### 3.2.2 Die Kristallstruktur des Tpx-CFT-Komplexes zeigt die Bildung eines Inhibitor-induzierten Homodimers

Eine anerkannte Methode zur Betrachtung der dreidimensionalen Strukturen von Molekülen, Proteinen und Proteinkomplexen ist die Röntgenstrukturanalyse (engl. *X-ray crystallography*). Für diese Analyseform wurde Tpx<sup>WT</sup> in Anwesenheit von CFT kristallisiert und Streuungsdaten im Teilchenbeschleuniger der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in Grenoble (Beamlines ID29 und ID23-1) gesammelt.<sup>[111]</sup> Dies sowie das Lösen der Kristallstruktur wurden von [REDACTED] und Prof. Dr. [REDACTED] an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg verwirklicht. Es gelang zwei Kristallstrukturen mit Auflösungen von 1,6 Å (PDB 6gxg) und 1,8 Å (PDB 6gxy) von Tpx in Komplex mit CFT zu erhalten (Abbildung 3-23).

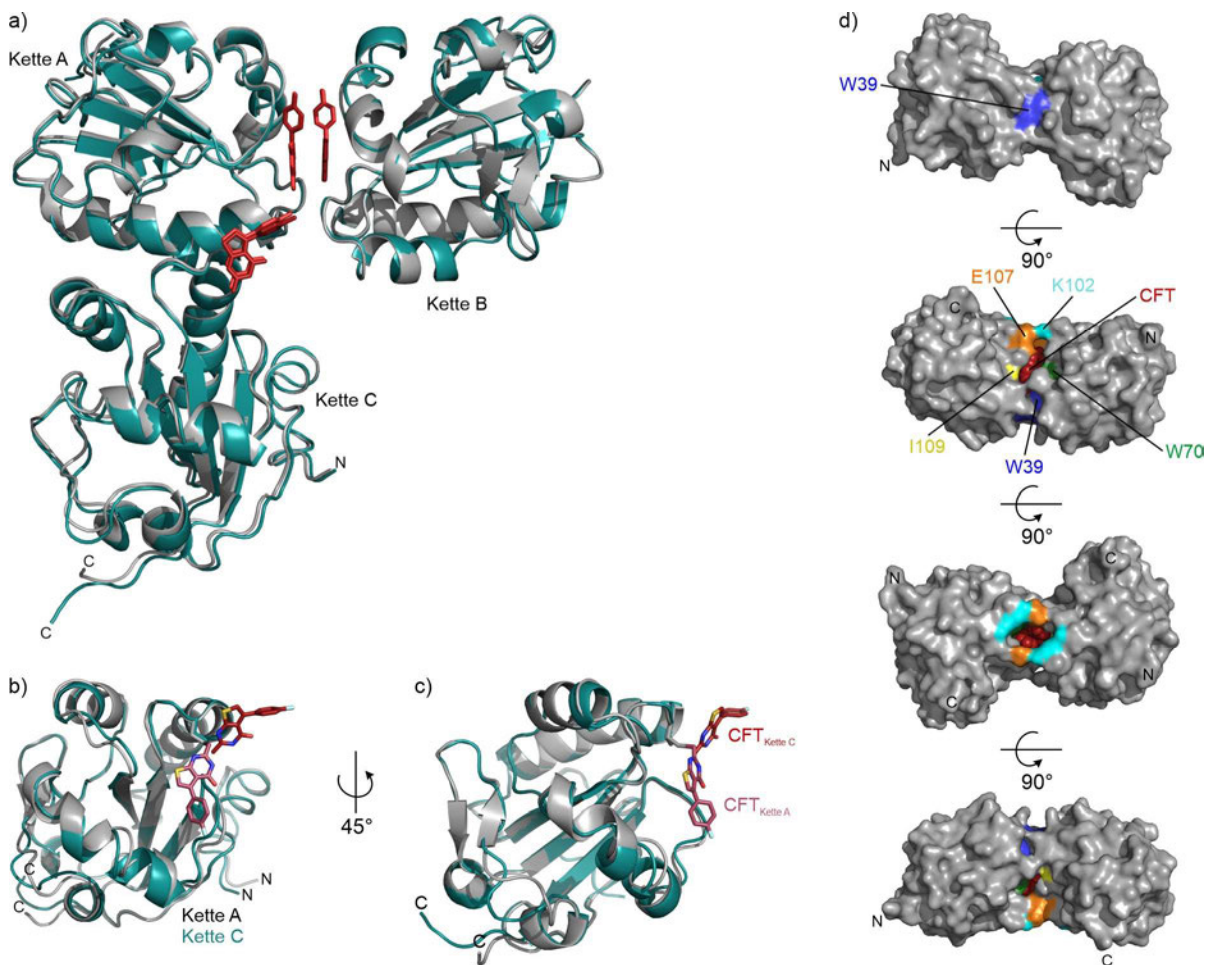


Abbildung 3-23 1,6 Å und 1,8 Å Kristallstrukturen von Tpx im Komplex mit CFT. (a) Überlagerung der drei Tpx-CFT-Komplexe (Ketten A, B, C) in der Einzelzelle der Kristallstrukturen mit 1,6 Å (petrol) und 1,8 Å (grau) Auflösung. CFT-Moleküle sind als Stäbchen in Rottönen dargestellt und weisen unterschiedliche Orientierungen in Kette A und B im Vergleich zu Kette C auf. (b) und (c) zeigen die beiden erhaltenen Orientierungen des CFT, Tpx zugewandt (CFT aus Kette A, hellrot) und umgeben von Lösungsmittel (CFT aus Kette C, rot) in einer Überlagerung der Ketten A (grau) und C (petrol) der 1,8 Å Kristallstruktur. (d) Die Oberflächenansicht des Tpx-CFT-Dimerkomplexes, der 1,8 Å Kristallstruktur zeigt, dass die Inhibitoren im aus Kette A und B gebildeten Dimer nahezu vom Lösungsmittel abgeschirmt sind. Eingefärbt sind die Aminosäuren Trp39 (blau), Trp70 (grün), Lys102 (cyan), Ile109 (gelb) und Glu107 (orange), welche zusammen mit CFT (rot) die Dimer-Berührungsfläche bilden. Farbcodierung der Nicht-Kohlenstoff-Atome: blau: Stickstoff; rot: Sauerstoff; gelb: Schwefel; türkis: Fluor. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

Die  $P2_1$  Einzelzellen beider Kristallstrukturen enthalten drei Ketten (Ketten A, B und C) eines Tpx-CFT-Komplexes. Aufgrund der Sensitivität der kovalenten Bindung zwischen Cys40 und CFT gegenüber der Strahlung im Teilchenbeschleuniger konnten in der 1,6 Å Struktur keine kovalenten Bindungen erhalten werden. Des Weiteren führten die Strahlungsschäden in der 1,8 Å Kristallstruktur zu einem kovalenten und einem nicht-kovalenten Komplex in den Ketten A und B und einem nicht-kovalenten Komplex in Kette C. Die Ketten A und B sind in beiden Kristallstrukturen sehr ähnlich zueinander, sowohl innerhalb einer Kristallstruktur als auch kristallstrukturübergreifend (Abbildung 3-23a). Ebenfalls stimmt die Orientierung von CFT in allen vier Ketten A und B beider Datensätze überein. Die Orientierung des Inhibitors unterscheidet sich in der Kette C beider Datensätze von den Ketten A und B und weist außer der kovalenten Bindung zu Cys40 keine Interaktion mit Tpx auf (Abbildung 3-23b und c). Die veränderte Orientierung von CFT in Kette C führt zu konformationellen Veränderungen der Reste 70-75 sowie 91-109.<sup>[111]</sup>

Erstaunlicherweise bilden die Ketten A und B ein  $C_2$ -symmetrisches Homodimer. Die beiden CFT-Moleküle sind fast vollständig (zu 90 respektive 89% der Gesamtoberfläche) vom Proteindimer umschlossen (Abbildung 3-23d).<sup>[111]</sup> In der Berührungsfläche des Dimers sind 563/573 Å<sup>2</sup> der Oberfläche der Tpx-Monomere bzw. 368/364 Å<sup>2</sup> der Oberfläche der CFT-Moleküle verborgen. Diese Flächen ergeben zusammen 1870 Å<sup>2</sup> und entsprechen somit 12,5% des gesamten Oberflächenbereiches.

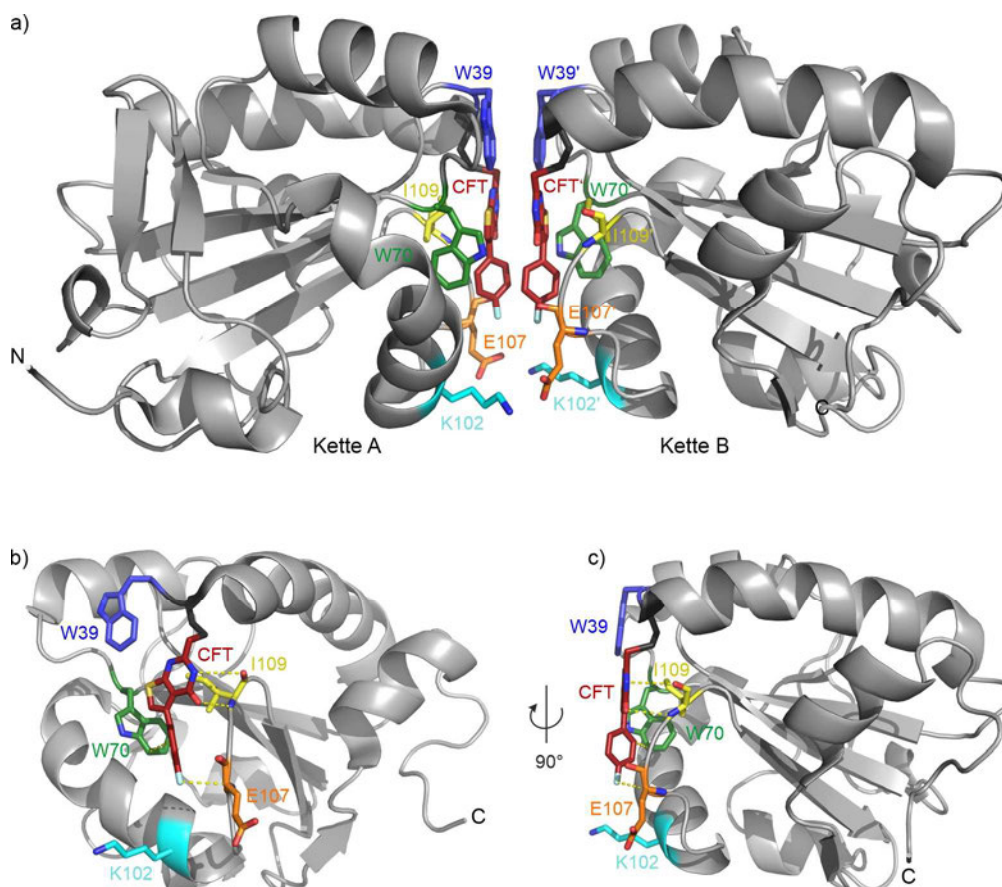


Abbildung 3-24 Visualisierung der intra- und intermolekularen Interaktionspunkte des Tpx-CFT-Dimerkomplexes (PDB 6gxy). (a) Die intermolekularen Interaktionen zwischen Kette A und B werden durch Trp39 (blau), Lys102 (cyan), Glu107 (orange) und CFT (rot) vermittelt. (b) Die Aminosäuren Trp70 (grün), Glu107 (orange) und Ile109 (gelb) gehen intramolekulare Wechselwirkungen mit CFT (rot) ein. Farbcodierung der Nicht-Kohlenstoff-Atome: gelb: Schwefel; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff; türkis: Fluor. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

Der Inhibitor ist innerhalb der Monomereinheit in eine Tasche, welche durch die Seitenketten von Trp39, Trp70 und Ile109 gebildet wird, eingebettet (Abbildung 3-24). Eine intramolekulare Interaktion wird von der hydrophoben Seitenkette von Ile109 zum Thienopyrimidon des CFT gebildet. Des Weiteren formen das Amid des Proteinrückgrats von Ile109 und der Carbonylsauerstoff von CFT eine schwache Wasserstoffbrückenbindung mit einem Abstand von 3,4 Å in der Kristallstruktur.

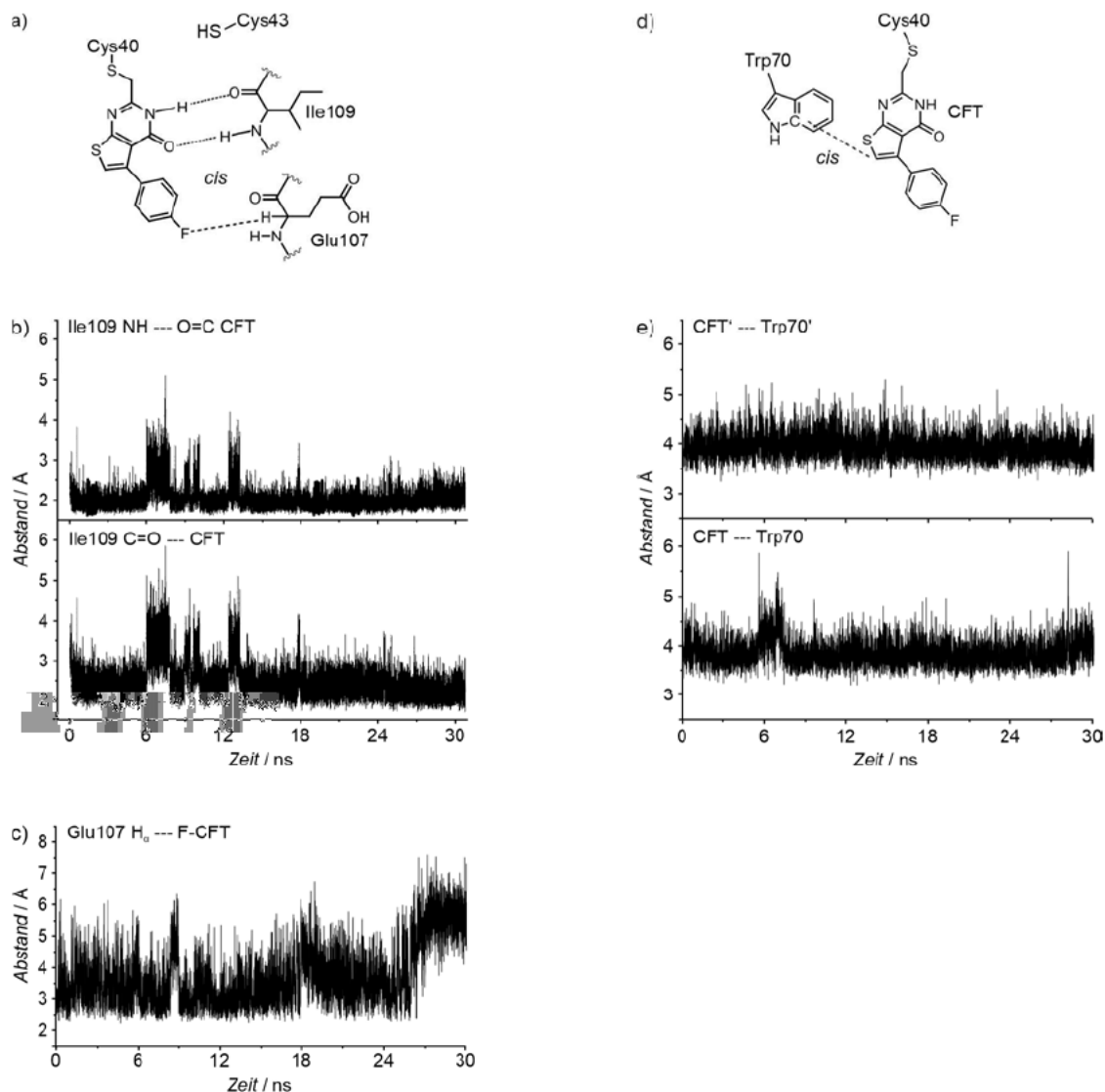


Abbildung 3-25 MD-Simulationen der intramolekularen Protein-Inhibitor-Wechselwirkungen des Tpx-CFT-Monomers. (a) Es sind die Interaktionspunkte zwischen CFT, gebunden an Cys40, und den Aminosäuren Ile109 und Glu107 als gestrichelte Linien zwischen den Molekülstrukturen gezeigt. (b) Die MD-Simulationen über eine Dauer von 30 ns lassen eine stabile Interaktion zwischen Ile109 und CFT erkennen. (c) Dargestellt ist die Veränderung der Länge der Wasserstoffbrückenbindung zwischen H<sub>α</sub> von Glu107 und dem Fluor von CFT über einen Zeitraum von 30 ns. (d) CFT, gebunden an Cys40, und die Indol-Seitenkette von Trp70 bilden hydrophobe Wechselwirkungen aus, hier dargestellt als gestrichelte Linien. (e) Diagramm der Variation der Abstände zwischen CFT und Trp70 aus Kette A und Kette B innerhalb von 30 ns resultierend aus den Simulationen der Moleküldynamik. MD-Simulationen wurden durchgeführt von Dr. [REDACTED], AG Prof. Dr. [REDACTED], Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

Basierend auf der Kristallstruktur wurde der Tpx-CFT-Komplex von Dr. [REDACTED] (Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED], Julius-Maximilians-Universität Würzburg) mittels Molekulardynamik- (MD-) Simulation untersucht. In der MD-Simulation werden die Bewegungen von Atomen und Molekülen zueinander nach den Gesetzen der klassischen Mechanik über die Zeit berechnet.<sup>[141]</sup> Die im Kristall beobachteten Wechselwirkungen, z.B. zwischen Aminosäure Ile109 und CFT, spiegeln sich auch in den Berechnungen der MD-Simulationen wider. So ergaben sich Abstände von  $2,1 \pm 0,4 \text{ \AA}$  und  $2,6 \pm 0,6 \text{ \AA}$  zwischen dem Amid von Ile109 und dem Carbonylsauerstoff des Pyrimidonrings sowie zwischen dem Carbonylsauerstoff der Seitenkette von Ile109 und dem Amid des Pyrimidonrings von CFT (Abbildung 3-25a und b). Die Indol-Seitenkette von Trp70 interagiert mit dem Ringsystem des Inhibitors durch ein T-förmiges  $\pi$ -Stacking<sup>[142]</sup> (Abbildung 3-25d). Das *Stacking* zwischen CFT und Trp70 wird durch die in den MD-Simulationen errechneten Abstände von  $3,9 \pm 0,3 \text{ \AA}$  sowie  $4,0 \pm 0,3 \text{ \AA}$  zwischen Trp70' und CFT' bestätigt (Abbildung 3-25e). Außerdem kommt es zu einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem  $H_{\alpha}$  von Glu107, einem schwachen Wasserstoffbrücken-Donor, und dem Fluor von CFT, einem starken Wasserstoffbrücken-Akzeptor (Abbildung 3-25a). Der Abstand von  $3,7 \pm 1,0 \text{ \AA}$  zwischen dem Fluor und  $H_{\alpha}$  von Glu107, ermittelt durch MD-Simulationen, bekräftigen diese Beobachtung (Abbildung 3-25c).<sup>[111]</sup>

Die Wechselwirkung von Trp39 und CFT ist vor allem intermolekularer Art. Die Kristallstruktur zeigt ein *Stacking* von Trp39 mit der Methylgruppe des intermolekular-gebundenen CFT' (Abbildung 3-26a). Die MD-Simulationen dieser Interaktion ergaben einen Abstand von  $3,9 \pm 0,3 \text{ \AA}$  (Abbildung 3-26b). Eine weitere *trans* Interaktion ist das  $\pi$ - $\pi$ -Stacking zwischen den Thienopyrimidon-Ringsystemen von CFT und CFT' sowie *lone pair*- $\pi$  Interaktionen<sup>[143]</sup> zwischen dem Schwefelatom des jeweiligen Thiophens und dem gegenüberliegenden Pyrimidonring (Abbildung 3-26d). Die zuletzt genannten Interaktionen lieferten Abstände von  $3,9 \pm 0,4 \text{ \AA}$  und  $3,9 \pm 0,3 \text{ \AA}$  in den Simulationen der Moleküldynamik (Abbildung 3-26e). Diese Werte sind in Einklang mit den typischen Abständen für *lone pair*- $\pi$  Interaktionen.<sup>[111,144]</sup>

Die beobachtete Salzbrücke zwischen Lys102 und Glu107' sowie Lys102' und Glu107 scheint die Dimer-Berührungsfläche an dieser Seite zu „verschließen“. Die gemittelten Abstände der MD-Simulationen in Anwesenheit von CFT zwischen dem Carboxylsauerstoff der Glu107-Seitenkette und dem Amid der Seitenkette von Lys102' und umgekehrt betragen  $7,6 \pm 2,7 \text{ \AA}$  und  $5,9 \pm 2,9 \text{ \AA}$ . In Abwesenheit von CFT nehmen diese Abstände Werte von  $8,2 \pm 5,2 \text{ \AA}$  und  $7,1 \pm 4,5 \text{ \AA}$  an (Abbildung 3-26c). Die hohen Werte in Anwesenheit von CFT deuten darauf hin, dass die Brücke nur transient ausgebildet wird und die Protein-Protein-Interaktion eine nachgeordnete Wechselwirkung in Bezug auf die Dimerisierung ist.

Es wurde eine weitere MD-Simulation durchgeführt, welche die gesamten Ketten A und B einschließt und die Abstände der beiden Ketten zueinander beschreibt. Die Anfangsposition der Ketten entsprach den Positionen der Ketten A und B in der Tpx<sub>2</sub>-CFT<sub>2</sub>-Kristallstruktur und es wurden die Änderungen der Abstände zwischen den Ketten in An- und Abwesenheit von CFT berechnet. In Anwesenheit von CFT betragen die Abstände  $1,8 \pm 0,2 \text{ \AA}$  und  $1,9 \pm 0,2 \text{ \AA}$ . In Abwesenheit von CFT nahmen die Abstände zu,  $2,8 \pm 0,9 \text{ \AA}$  und  $3,1 \pm 1,0 \text{ \AA}$  (Abbildung 3-26f). Dies demonstriert, dass CFT das Tpx-Dimer stabilisiert.

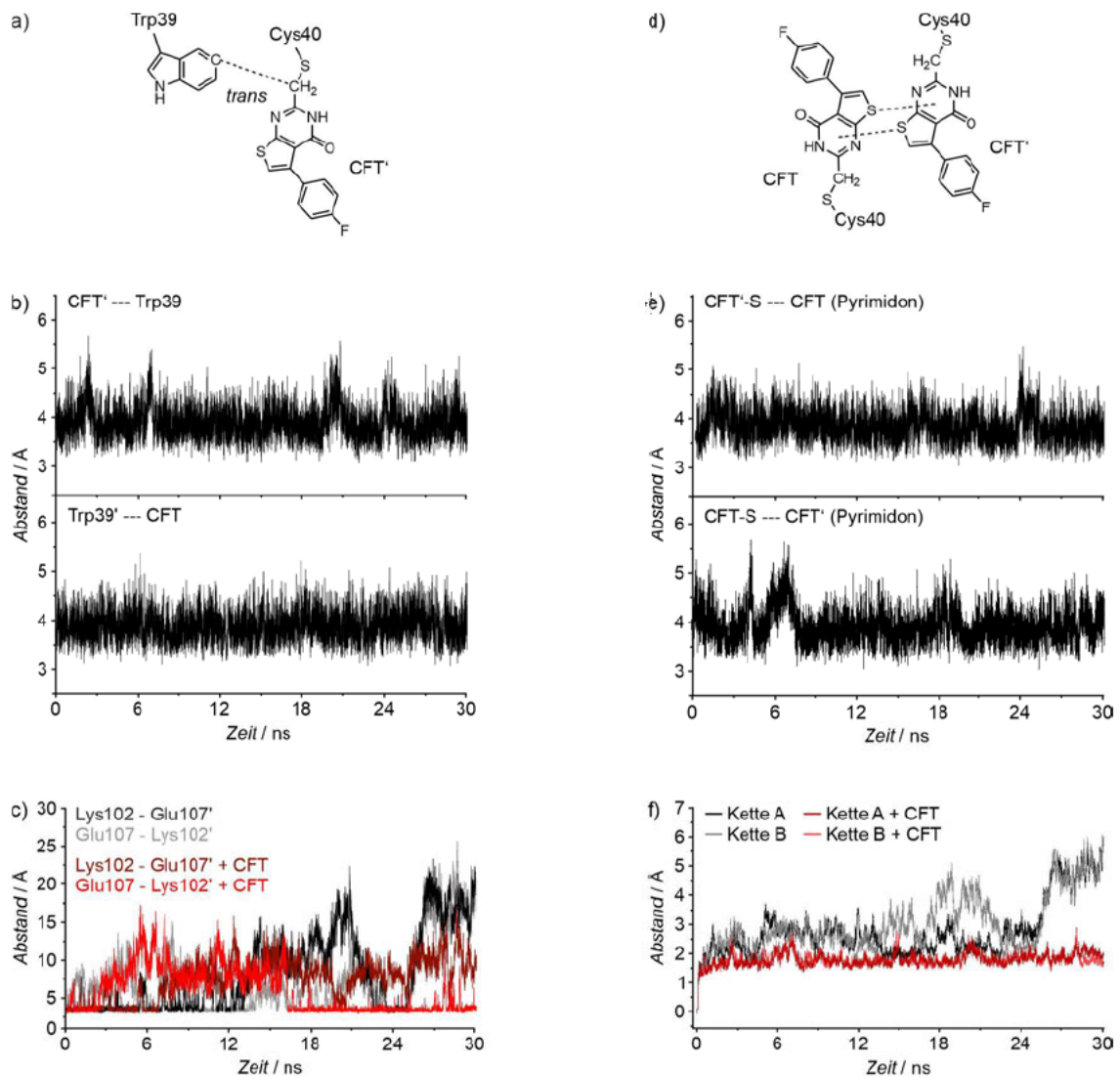


Abbildung 3-26 MD-Simulationen der intermolekularen Interaktionen des Tpx<sub>2</sub>-CFT<sub>2</sub>-Komplexes. (a) Darstellung der in (b) mittels MD-Simulation errechneten Variationen der Abstände zwischen CFT' und Trp39 sowie Trp39' und CFT. (c) Veränderungen der Abstände zwischen dem Amid von Lys102 und dem Carboxylsauerstoff von Glu107' sowie Lys102' und Glu107 in An- und Abwesenheit von CFT. (d). Veranschaulichung der in (e) betrachteten Änderungen der Abstände zwischen dem Schwefel des CFT und dem Pyrimidon-Ring von CFT' und umgekehrt über eine Zeitspanne von 30 ns. (f) Über einen Zeitraum von 30 ns errechnete Abweichungen der Ketten A und B relativ zur Ausgangsposition mit und ohne CFT. MD-Simulationen wurden durchgeführt von Dr. [REDACTED], AG Prof. Dr. [REDACTED], Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

### 3.2.3 Der Tpx-CFT-Komplex dimerisiert in Lösung

Die Kristallstruktur eines Proteinkomplexes bildet diesen als starre Einheit in einem energetisch günstigen Zustand ab. Dabei kann es zu sogenannten Kristallpackungsartefakten kommen, welche zwar eine für die Kristallisation bevorzugte Interaktion darstellt, jedoch in Lösung nicht vorkommt. Um festzustellen, ob die im Kristall beobachtete Dimerisierung des Tpx-CFT-Komplexes auch in Lösung erfolgt, wurde eine Größenausschlusschromatographie (engl. *size exclusion chromatography*, SEC) von Tpx<sup>WT</sup> bei verschiedenen CFT-Konzentrationen durchgeführt (Abbildung 3-27a).

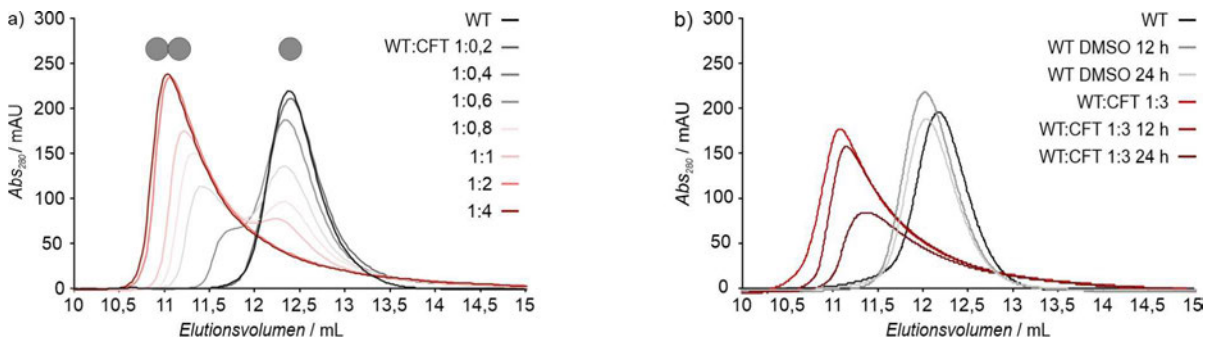


Abbildung 3-27 Analytische SEC-Läufe von Tpx<sup>WT</sup> in Anwesenheit von CFT. Tpx<sup>WT</sup> wurde zunächst vor allen Messungen mit 4 mM TCEP reduziert. (a) Tpx<sup>WT</sup> wurde dann mit steigenden CFT-Konzentrationen (molare Verhältnisse Tpx:CFT 1:0,2; 1:0,4; 1:0,6; 1:0,8; 1:1; 1:2; 1:4) für 30 min bei 25 °C inkubiert. Es sind die Chromatogramme der SEC-Läufe der Tpx-CFT-Komplexe (200  $\mu$ L 100  $\mu$ M Tpx) gezeigt. Die Kugeln über den Elutionsmaxima sollen die monomere und dimere Zuordnung verdeutlichen. (b) Das CFT-induzierte Tpx-Dimer ist stabil. Gezeigt sind die SEC-Läufe von Tpx<sup>WT</sup>, welches für 30 min, 12 h und 24 h in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit CFT inkubiert wurde. Als Kontrollen sind die SEC-Läufe von Tpx<sup>WT</sup> mit DMSO (0,75%) nach 12 h und 24 h Inkubationszeit zu sehen sowie Tpx<sup>WT</sup> ohne DMSO oder CFT. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

Die SEC-Läufe in Anwesenheit von CFT zeigen schon bei substöchiometrischen Tpx:CFT Verhältnissen das Auftreten einer zweiten Population mit einem niedrigeren Elutionsvolumen im Vergleich zu Tpx<sup>WT</sup> ohne CFT (Abbildung 3-27a). Mit steigender CFT-Konzentration nimmt die Absorption bei 280 nm ( $Abs_{280}$ ) dieser Population zu und die  $Abs_{280}$  bei 12,4 mL Elutionsvolumen ab. Da die Elutionsvolumina sich um 1,4 mL, auf einer Chromatographiesäule mit einem Säulenvolumen von 24 mL, unterscheiden ist davon auszugehen, dass die in Anwesenheit von CFT auftretende Population dem Dimer zugeordnet werden kann und die Population in Abwesenheit von CFT dem Monomer. Neben der Inkubationszeit von 30 min wurde Tpx<sup>WT</sup> auch für 12 h und 24 h in einem Verhältnis von 1:3 mit CFT inkubiert, um die Lebensdauer des Dimerkomplexes zu untersuchen. Die SEC-Läufe nach diesen drei Inkubationszeiten weisen die gleichen Elutionsvolumina auf (Abbildung 3-27b). Zur Kontrolle wurde dieses Experiment analog nur mit DMSO, dem Lösemittel für CFT durchgeführt. Das Elutionsvolumen von Tpx<sup>WT</sup> in Anwesenheit von DMSO entspricht dem Elutionsvolumen ohne DMSO (Abbildung 3-27b). DMSO hat somit keinen Effekt auf die Dimerisierung von Tpx.

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Dimensionen von Proteinen und Proteinkomplexen ist die Röntgenkleinwinkelstreuung (engl. *Small-Angle X-ray Scattering*, SAXS). Hier werden ähnlich der Röntgenkristallographie die zu untersuchenden Partikel mit Röntgenstrahlen bestrahlt und die Streuung nach dem Auftreffen der Strahlen auf die Partikel aufgenommen. Der Vorteil gegenüber der Kristallographie ist, dass das Protein in Lösung vorliegt. Allerdings ist die Auflösung durch SAXS geringer als für die Kristallographie. Tpx<sup>WT</sup> wurde im oxidierten, reduzierten und CFT-gebundenen Zustand mittels SAXS betrachtet (Abbildung 3-28). Die Daten wurden an der ESRF Beamline BM29 gesammelt und von Dr. [REDACTED], Synchrotron Kristallographie Team am EMBL Grenoble, analysiert.<sup>[111]</sup>

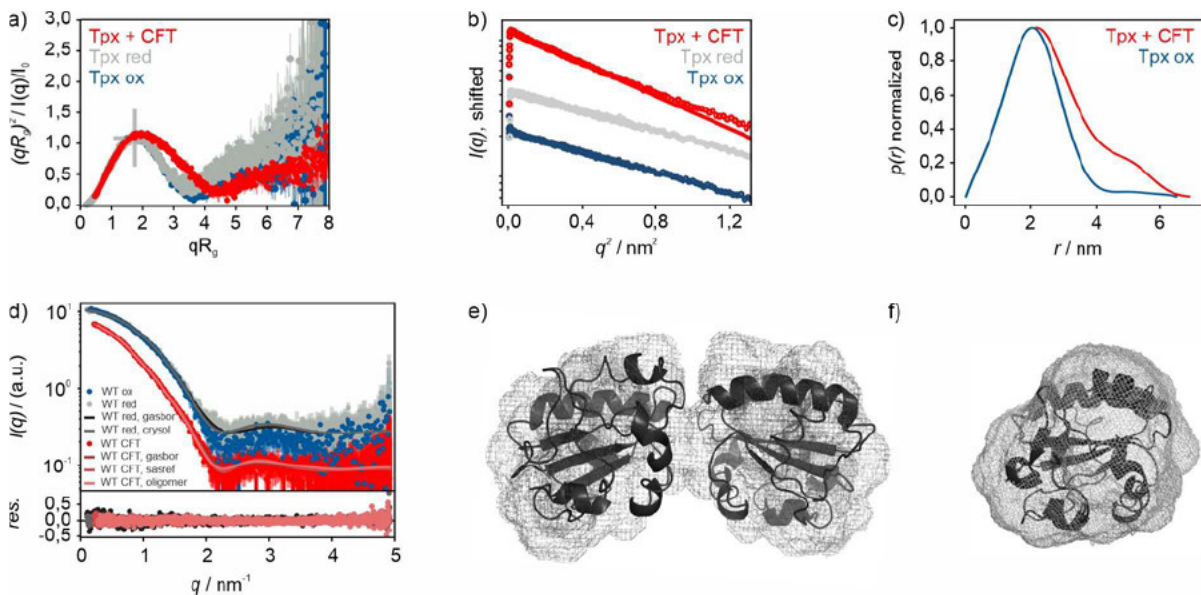


Abbildung 3-28 SAXS-Studien an Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten, reduzierten und CFT-gebundenen Zustand. (a) Normalisierter Kratky-Plot von oxidiertem (blau), reduziertem (grau) und CFT-gebundenem (rot) Tpx<sup>WT</sup>. (b) Guinier-Plot von Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten (blau), reduzierten (grau) und CFT-gebundenen Zustand (rot). Die für den Fit verwendeten Datenpunkte sind durch gefüllte Kreise markiert. (c) Abstandsverteilungsfunktionen im oxidierten (blau) und CFT-gebundenen Zustand (rot) von Tpx<sup>WT</sup>. (d) GASBOR-, SASREF- und OLIGOMER-Fit von Tpx<sup>WT</sup>-CFT (rot) sowie GASBOR- und CRY SOL-Fit des reduzierten Zustands der SAXS-Daten. (e) und (f) Modelle der Hülle des Dimers und Monomers basierend auf den Fits in (d). Analyse der SAXS-Daten wurde von Dr. [REDACTED], Synchrotron Kristallographie Team am EMBL Grenoble, durchgeführt. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

Die Guinier-Näherungen der Streuungsdaten des Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten und reduzierten Zustand lieferten Gyrationradien von  $1,61 \pm 0,12$  nm und  $1,58 \pm 0,01$  nm. In Anwesenheit von CFT konnte ein Gyrationradius von  $2,03 \pm 0,03$  nm ermittelt werden (Abbildung 3-28). Basierend auf den SAXS-Daten wurde ein *ab initio* Modelling mittels GASBOR- und CRY SOL-Fit für den reduzierten Zustand und GASBOR-, SASREF- und OLIGOMER-Fit für das Dimer durchgeführt (Abbildung 3-28d).<sup>[145-148]</sup> Diese lieferten die in Abbildung 3-28e und f dargestellten Oberflächen-Modelle. Sie veranschaulichen, dass Tpx<sup>WT</sup> in Lösung im reduzierten Zustand als Monomer und im CFT-gebundenen Zustand hauptsächlich als Dimer vorliegt.

Es konnte somit durch SAXS und SEC gezeigt werden, dass es sich bei der Dimerisierung in der Tpx-CFT-Kristallstruktur nicht um ein Kristallisationsartefakt, sondern um ein auch in Lösung auftretendes Ereignis handelt.

### 3.2.4 Die CFT-induzierte Dimerisierung von Tpx ist von intermolekularen Protein-Inhibitor- und Protein-Protein-Interaktionen abhängig

In Kapitel 3.2.3 konnte mittels SEC und SAXS gezeigt werden, dass die in der Kristallstruktur von Tpx im Komplex mit CFT beobachtete Dimerisierung kein Artefakt der Kristallisationspackung ist, sondern auch in Lösung erfolgt. Es sollte nun weiterführend untersucht werden, welche Rolle die in der Kristallstruktur und mittels MD-Simulation identifizierte, intermolekulare Interaktionen für die Tpx-CFT-Dimerformation spielen.

An erster Stelle wurde die Inhibitor-Inhibitor-Wechselwirkung untersucht. Hierzu wurden die Kristallpackungen von CFT im Kontext des Tpx Dimers (PDB 6gxy) sowie in Abwesenheit von Tpx (CCDC 1862408) betrachtet (Abbildung 3-29). Im Komplex mit Tpx, kovalent an Cys40 gebunden, kommt es zu einer parallelen Ausrichtung der CFT-Moleküle in der Dimer-Berührungsfläche. Es zeigt sich, dass es auch ohne das Protein zu einem *Stacking* der Ringsysteme kommt, diese allerdings in einer antiparallelen Orientierung zueinander vorliegen (Abbildung 3-29c und d). Somit ist die parallele Orientierung, welche im Tpx<sub>2</sub>-CFT<sub>2</sub>-Komplex beobachtet wird, nicht die intrinsisch günstigste Konstellation der CFT-Packung und das *Stacking* des Inhibitors scheinbar nicht allein die treibende Kraft der Dimerisierung.

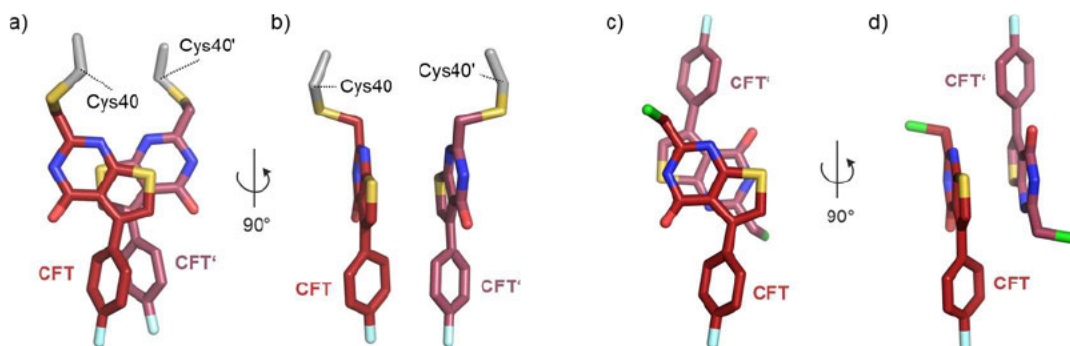
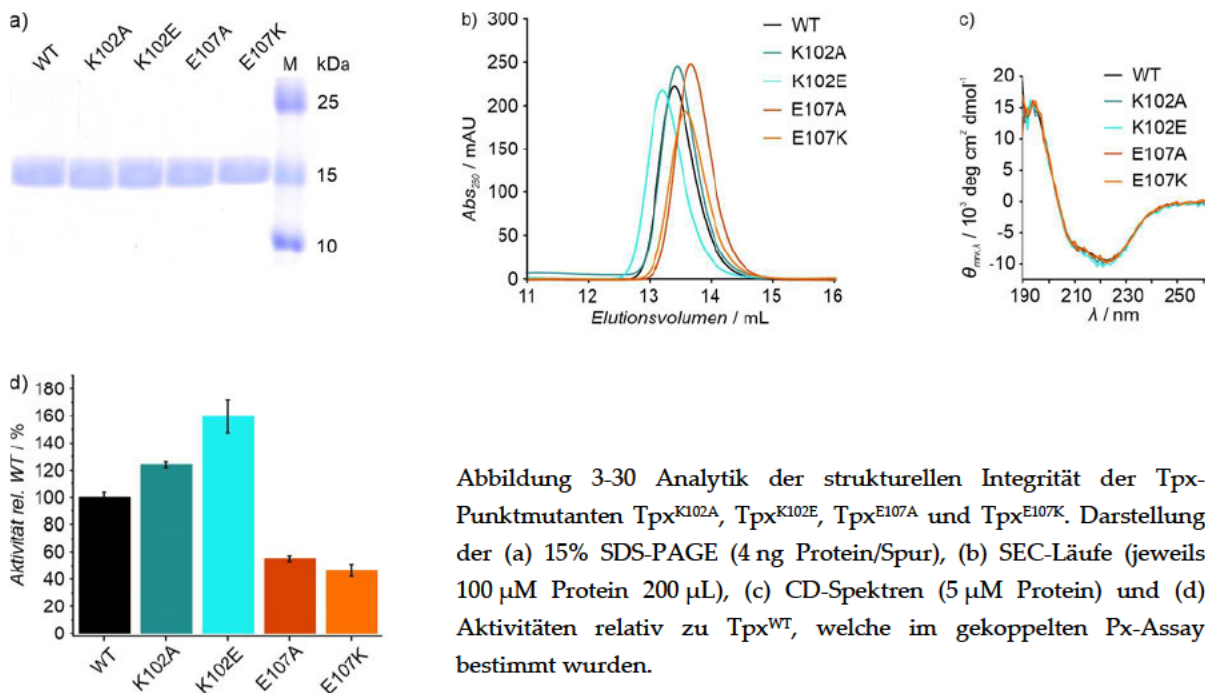


Abbildung 3-29 Darstellung der Orientierung der CFT-Moleküle zueinander, im Komplex mit Tpx und ohne Tpx. (a) und (b) zeigen die parallelen CFT (rot) und CFT' (hellrot) Moleküle in der Dimer-Berührungsfläche von Tpx, welche über Cys40 (grau) an das Protein gebunden sind (PDB 6gxy). (c) und (d) zeigen die antiparallele Kristallpackung von CFT (rot) und CFT' (hellrot) in Abwesenheit von Tpx (CCDC 1862408). Farbcodierung der Nicht-Kohlenstoff-Atome: gelb: Schwefel; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff; türkis: Fluor. Kristallographie von freiem CFT wurde von Dr. [REDACTED], Johannes Gutenberg-Universität Mainz, durchgeführt. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

Da das *Stacking* des Inhibitors zwar notwendig, aber vermutlich nicht ausreichend für die Tpx-Dimerformation ist, wurden nachfolgend die einzelnen Protein-Inhibitor- und Protein-Protein-Interaktionspunkte des Tpx<sub>2</sub>-CFT<sub>2</sub>-Dimers untersucht. Hierfür wurden Aminosäuren, die mit CFT wechselwirken, Trp39, Cys40, Cys43, Trp70 und Ile109, in Einzelmutanten zu Serin oder Alanin mutiert und die strukturelle Integrität der Tpx-Mutanten mittels CD-Spektroskopie, SEC und SDS-PAGE bestätigt (Anhang Abbildung 6-4). Um die Rolle, die die beiden Salzbrücken zwischen den Resten Lys102 und Glu107' sowie Lys102' und Glu107 bei der Dimerbildung spielen zu untersuchen, wurde Lys102 in Einzelmutanten zu Alanin und Glutamat mutiert sowie Glu107 in Einzelmutanten zu Alanin und Lysin. Die Analyse der strukturellen Integrität der Punktmutanten Tpx<sup>K102A</sup>, Tpx<sup>K102E</sup>, Tpx<sup>E107A</sup> und Tpx<sup>E107K</sup> mittels CD-Spektroskopie, SEC und SDS-PAGE zeigten, dass sich alle Mutanten ähnlich wie Tpx<sup>WT</sup> verhielten (Abbildung 3-30a-c). Große Unterschiede ergaben sich bei den Aktivitäten der Mutanten im gekoppelten Px-Assay im Vergleich zum Tpx<sup>WT</sup>. Hier ergaben sich relative Aktivitäten von 124,0% ± 2,2% für Tpx<sup>K102A</sup>, 159,6% ± 12,2% für Tpx<sup>K102E</sup>, 55,1% ± 2,1 für Tpx<sup>E107A</sup>

und  $46,5\% \pm 4,6\%$  für  $\text{Tpx}^{\text{E107K}}$  (Abbildung 3-30d). Aufgrund der reduzierten Aktivitäten der Glu107-Punktmutanten wurde für die weiteren Untersuchungen die Punktmutante  $\text{Tpx}^{\text{K102E}}$  ausgewählt.



$\text{Tpx}^{\text{WT}}$  und  $\text{Tpx}$ -Mutanten wurden in einem *Gelshift*-Assay zur Detektion freier Thiolgruppen mittels Maleimid-Polyethylenglykol (mal-PEG) auf ihr CFT-Bindevermögen untersucht. Das Maleimid des mal-PEGs bindet in einer Additionsreaktion an freie Thiole. In reduziertem Tpx können beide Cysteinreste des aktiven Zentrums der Oxidoreduktase durch mal-PEG modifiziert werden. Das Molekulargewicht der PEG-Kette, hier  $\sim 5$  kDa, steigert das Molekulargewicht von Tpx pro Modifizierung entsprechend. Diese Massenzunahme kann im SDS-PAGE mittels *Gelshift*-Assay beobachtet werden und wurde erfolgreich von Füller et al., 2012<sup>[21]</sup> verwendet, um herauszufinden, welcher Cysteinrest in Tpx mit CFT interagiert. Bindet das sehr kleine CFT-Molekül an einen Cysteinrest in Tpx, kommt es nur zu einer geringfügigen Erhöhung des Molekulargewichts von Tpx, jedoch zu einer Blockierung des entsprechenden Restes und damit nur zu einer einfachen PEGylierung von Tpx. Füller et al. zeigten, dass  $\text{Tpx}^{\text{C43S}}$  nur noch einfach-PEGyliert vorlag. In Anwesenheit von CFT erfolgte keine Modifikation mehr durch mal-PEG, so wurde demonstriert, dass CFT an Cys40 bindet.<sup>[21]</sup> In der hier vorliegenden Studie wurden daher die Mutanten  $\text{Tpx}^{\text{C40S}}$  und  $\text{Tpx}^{\text{C43S}}$  ebenfalls als Kontrollen verwendet. Die reduzierten Tpx-Proteine (4 mM TCEP) wurden sowohl mit als auch ohne CFT für 30 min inkubiert und anschließend mal-PEG hinzugefügt. Der Pegylierungsgrad kann per SDS-PAGE nachgewiesen werden. Die SDS-PAGE der Tpx-Varianten (Abbildung 3-31a) zeigt, dass  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$ ,  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$ ,  $\text{Tpx}^{\text{W70A}}$ ,  $\text{Tpx}^{\text{K102E}}$  und  $\text{Tpx}^{\text{I109A}}$  in Abwesenheit von CFT doppelt, und in Gegenwart von CFT einfach-PEGyliert vorliegen. Allerdings wird  $\text{Tpx}^{\text{K102E}}$  in Abwesenheit von CFT auch einfach PEGyliert und in Gegenwart von CFT nicht PEGyliert.  $\text{Tpx}^{\text{C43S}}$  liegt ohne CFT einfach-PEGyliert vor und mit CFT nicht-PEGyliert.  $\text{Tpx}^{\text{C40S}}$  hingegen ist in An- und Abwesenheit von CFT nicht-PEGyliert. Das Fehlen der Cystein-Seitenkette an der Aminosäureposition 40 führt möglicherweise auch zu einer stark reduzierten Nukleophilie von Cys43 und es kommt zu keiner Reaktion mit mal-PEG. Somit interagieren alle Tpx-Proteine, ausgenommen  $\text{Tpx}^{\text{C40S}}$ , mit CFT und es konnte bestätigt werden, dass CFT kovalent an Cys40 bindet. Der interessante Effekt der Lys102Glu-Mutation auf die Aktivität der Reste des aktiven Zentrums muss in künftigen Studien untersucht werden.

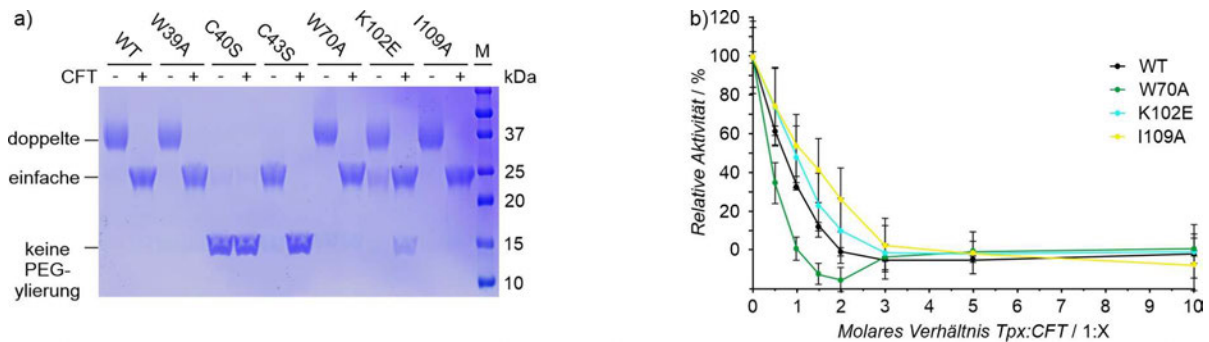


Abbildung 3-31 Bindung und Inhibition von/durch CFT an Tpx<sup>WT</sup> und Tpx-Mutanten. (a) SDS-Gel des *Gelshift*-Assays zur Analyse von freien Thiolgruppen mittels mal-PEG in An- und Abwesenheit von CFT (molares Protein:CFT Verhältnis 1:3; 4,0 ng Protein/Spur). (b) Inhibition von Tpx<sup>WT</sup> und Tpx-Mutanten durch CFT bei verschiedenen Tpx:CFT Verhältnissen im gekoppelten Px-Assay. Es ist die Aktivität der Tpx-Variante relativ zur entsprechenden DMSO-Kontrolle gegen das eingesetzte Tpx:CFT Verhältnis aufgetragen. Tpx wurde in verschiedenen Verhältnissen mit CFT für 5 min inkubiert und die Restaktivität durch die Abnahme der Absorption von NADPH über 60 s bestimmt. Die Tpx-Konzentration entsprach in jeder Messung 5  $\mu$ M. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

Neben der Untersuchung der Fähigkeit der Tpx-Mutanten CFT zu binden, wurde auch untersucht, ob die Tpx-Mutanten durch CFT ähnlich wie Tpx<sup>WT</sup> inhibiert werden. Da die Aktivität von Tpx<sup>W39A</sup> relativ zu Tpx<sup>WT</sup> nur  $2,3 \pm 0,8\%$  beträgt, konnte keine Untersuchung der Inhibition von Tpx<sup>W39A</sup> durch CFT durchgeführt werden. Tpx<sup>WT</sup>, Tpx<sup>W70A</sup>, Tpx<sup>K102E</sup> und Tpx<sup>I109A</sup> wurden im gekoppelten Px-Assay mit verschiedenen CFT-Konzentrationen für 5 min inkubiert und die Abnahme der NADPH-Konzentration bei einer Absorption von 340 nm im Photometer verfolgt (Abbildung 3-31b). Die relative Aktivität wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle der jeweiligen Tpx-Variante berechnet. Ab einem Verhältnis von 1:2 Tpx<sup>WT</sup>:CFT war Tpx<sup>WT</sup> vollständig inhibiert und es konnte keine Restaktivität, die über die spontane Reduktion der Kaskade hinausgeht, gemessen werden. Tpx<sup>K102E</sup> und Tpx<sup>I109A</sup> zeigen ähnliche Inhibitionskurven wie Tpx<sup>WT</sup>. Eine schnellere Inhibition erfolgte bei Tpx<sup>W70A</sup>; hier findet eine vollständige Inhibition schon in einem molaren Verhältnis von 1:1 statt. Somit sind bei diesem Verhältnis schon nach 5 min  $\sim 100\%$  Tpx<sup>W70A</sup> blockiert.

Es konnte gezeigt werden, dass alle Tpx-Mutanten CFT binden können und ähnlich wie Tpx<sup>WT</sup> von CFT im gekoppelten Px-Assay inhibiert werden. Führt CFT auch zu einer Dimerisierung der Tpx-Mutanten? Um dies herauszufinden wurden dieselben Methoden verwendet, mit denen die CFT-induzierte Dimerisierung von Tpx<sup>WT</sup> nachgewiesen wurde (Kapitel 3.2.3).

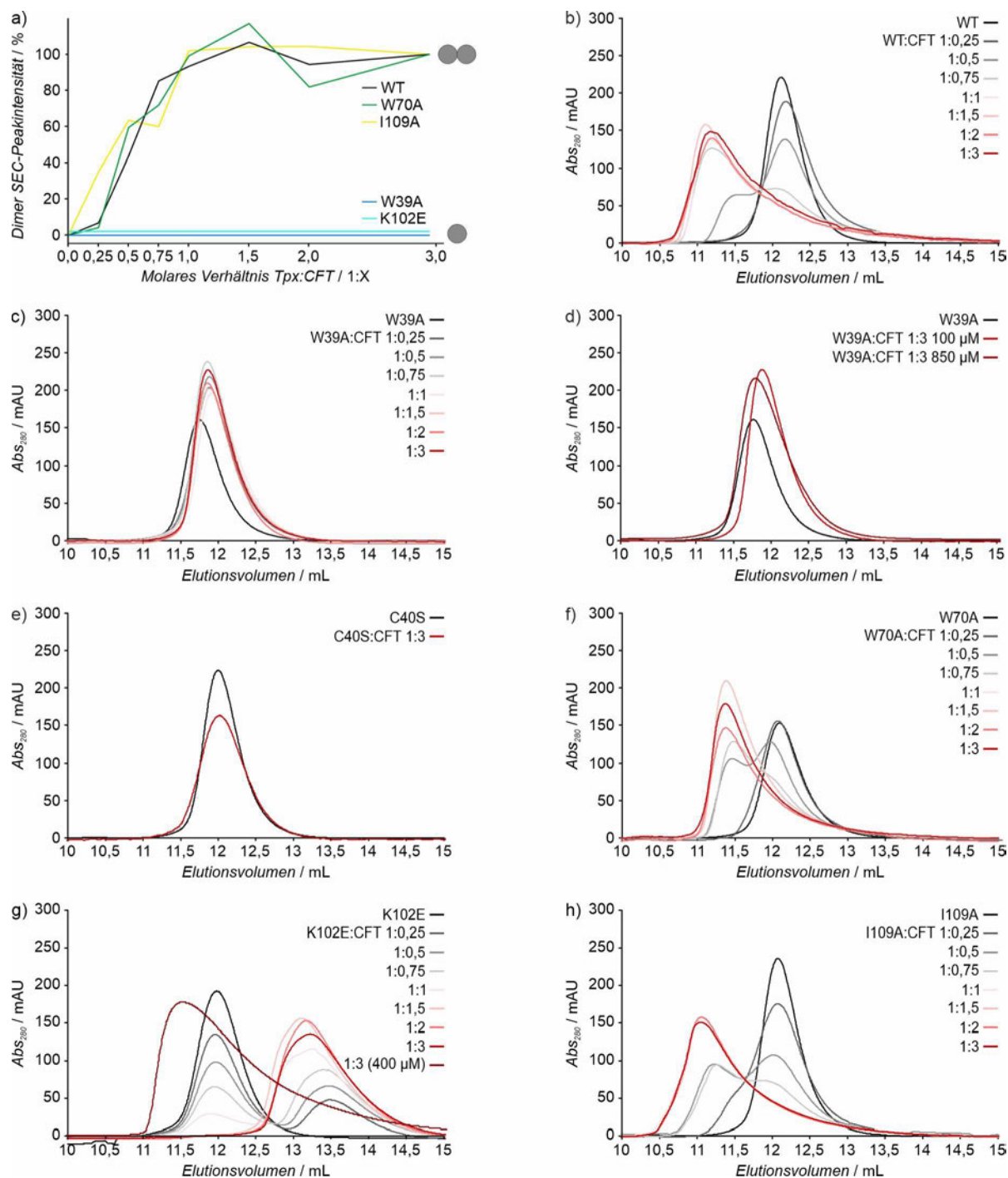


Abbildung 3-32 Analytische SEC-Läufe von Tpx<sup>WT</sup> und Tpx-Mutanten mit CFT. Alle Läufe wurden mit 100  $\mu\text{M}$  reduziertem Tpx (sofern nicht anders angegeben), in 200  $\mu\text{L}$  nach einer Inkubation für 30 min bei 25  $^{\circ}\text{C}$  mit CFT oder DMSO durchgeführt. (a) Auftragung der Intensitäten der Dimerpopulation der SEC-Läufe der Tpx-Varianten gegen das molare Verhältnis von Tpx:CFT. Für diese Kalkulationen wurden die SEC-Läufe mit einer finalen Tpx-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  verwendet. (b) Gezeigt sind die SEC-Läufe von Tpx<sup>WT</sup> nach der Inkubation mit steigenden CFT-Konzentrationen. (c) Tpx<sup>W39A</sup> wurde mit zunehmenden CFT-Anteilen inkubiert und nachfolgend in SEC-Läufen nach dem hydrodynamischen Radius aufgetrennt. Da keine Veränderungen des Elutionsvolumens beobachtet wurden, wurde in (d) der SEC-Lauf mit einer Konzentration von 850  $\mu\text{M}$  Tpx<sup>W39A</sup> in einem 1:3 Tpx:CFT Verhältnis wiederholt. Aufgrund der hohen Intensität der Abs<sub>280</sub> wurde der Lauf bei 850  $\mu\text{M}$  Tpx<sup>W39A</sup> mit 0,6 multipliziert. (e) Tpx<sup>C40S</sup> ist nicht fähig CFT zu binden; eine Inkubation mit CFT im molaren Verhältnis 1:3 führt zu keiner Veränderung des Elutionsvolumens. (f-h) zeigen die SEC-Läufe von Tpx<sup>W70A</sup>, Tpx<sup>K102E</sup> und Tpx<sup>I109A</sup> nach der Inkubation mit steigenden CFT-Konzentrationen analog zu Tpx<sup>WT</sup> in (b). Aufgrund der steigenden Abs<sub>280</sub> von Tpx<sup>K102E</sup> bei höheren Elutionsvolumina mit zunehmendem CFT-Anteil wurde bei einem molaren Tpx:CFT Verhältnis von 1:3 zusätzlich eine Protein-Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  verwendet. Hier wurden die Absorptionen bei 295 nm mit 0,6 multipliziert. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

Es wurden SEC-Läufe von Tpx<sup>WT</sup>, Tpx<sup>W39A</sup>, Tpx<sup>W70A</sup>, Tpx<sup>K102E</sup> und Tpx<sup>I109A</sup> nach Inkubation mit steigenden CFT-Konzentrationen durchgeführt (Abbildung 3-32). Tpx<sup>W70A</sup> und Tpx<sup>I109A</sup> zeigen analog zu Tpx<sup>WT</sup> eine neue Population mit geringerem Elutionsvolumen in Anwesenheit von CFT (Abbildung 3-32f und h). Ferner nehmen die Intensitäten der Dimerpopulation mit steigendem CFT-Anteil zu. Das Elutionsvolumen von Tpx<sup>W39A</sup> in An- und Abwesenheit von CFT verändert sich nicht (Abbildung 3-32c). Selbst bei einer höheren Proteinkonzentration von 850  $\mu\text{M}$  Tpx<sup>W39A</sup> bei einem molaren Verhältnis von 1:3 zu CFT findet keine Veränderung des Elutionsvolumens statt (Abbildung 3-32d). Eine unerwartete Veränderung des Elutionsvolumens zeigen die Chromatogramme der Tpx<sup>K102E</sup>-Mutante in Anwesenheit von CFT (Abbildung 3-32g). Hier nimmt die Intensität der Abs<sub>280</sub> einer zweiten Population mit höherem Elutionsvolumen bei steigender CFT-Konzentration zu. Allerdings nimmt das Elutionsvolumen bei einer Tpx<sup>K102E</sup>-Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  und einem 1:3 molaren Verhältnis zu CFT im Vergleich zu Tpx<sup>K102E</sup> ohne CFT ab. Tpx<sup>K102E</sup> zeigt somit in den SEC-Läufen bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  keine Dimerisierung, bei 400  $\mu\text{M}$  Proteinkonzentration scheint eine Dimerisierung zu erfolgen. Als Kontrolle wurde Tpx<sup>C40S</sup> mit CFT inkubiert und ein SEC-Lauf durchgeführt. Es konnte keine Veränderung der Elutionsvolumina mit und ohne CFT festgestellt werden.

Das Dimerisierungsverhalten der Tpx-Mutanten wurde auch mit Hilfe von SAXS analysiert (Abbildung 3-33). Alle Tpx-Mutanten wiesen im oxidierten und reduzierten Zustand einen ähnlichen Gyrationradius wie Tpx<sup>WT</sup> auf (Abbildung 3-33d; Anhang Tabelle 6-18). Der Gyrationradius der CFT-gebundenen Proteine Tpx<sup>W70A</sup> und Tpx<sup>I109A</sup> vergrößert sich analog zum Radius von Tpx<sup>WT</sup>-CFT, welcher annähernd dem erwarteten Gyrationradius des Dimerkomplexes entspricht. Der Vergleich im Säulendiagramm präsentiert anschaulich, dass der Gyrationradius von Tpx<sup>W39A</sup> im CFT-gebundenen Zustand dem Radius im reduzierten Zustand entspricht. Es ist somit auch den SAXS-Daten kein Anzeichen einer Dimerisierung des Tpx<sup>W39A</sup>-CFT-Komplexes zu entnehmen. Der Gyrationradius von Tpx<sup>K102E</sup>-CFT liegt zwischen den Radien von Tpx<sup>WT</sup>-CFT und Tpx<sup>W39A</sup>-CFT.

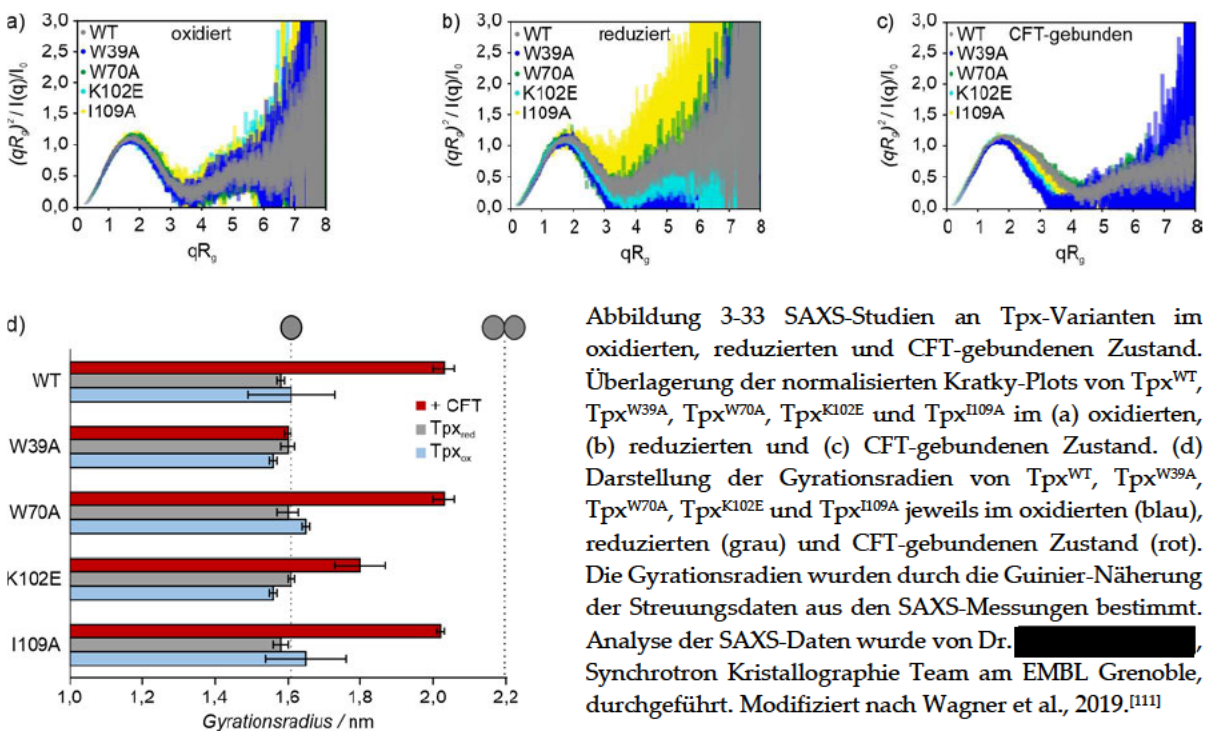


Abbildung 3-33 SAXS-Studien an Tpx-Varianten im oxidierten, reduzierten und CFT-gebundenen Zustand. Überlagerung der normalisierten Kratky-Plots von Tpx<sup>WT</sup>, Tpx<sup>W39A</sup>, Tpx<sup>W70A</sup>, Tpx<sup>K102E</sup> und Tpx<sup>I109A</sup> im (a) oxidierten, (b) reduzierten und (c) CFT-gebundenen Zustand. (d) Darstellung der Gyrationradien von Tpx<sup>WT</sup>, Tpx<sup>W39A</sup>, Tpx<sup>W70A</sup>, Tpx<sup>K102E</sup> und Tpx<sup>I109A</sup> jeweils im oxidierten (blau), reduzierten (grau) und CFT-gebundenen Zustand (rot). Die Gyrationradien wurden durch die Guinier-Näherung der Streuungsdaten aus den SAXS-Messungen bestimmt. Analyse der SAXS-Daten wurde von Dr. [REDACTED], Synchrotron Kristallographie Team am EMBL Grenoble, durchgeführt. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

Das veränderte Dimerisierungsverhalten von  $\text{Tp}x^{\text{W}39\text{A}}$  und  $\text{Tp}x^{\text{K}102\text{E}}$  im Vergleich zum  $\text{Tp}x^{\text{WT}}$  wurde auch durch SEC-MALS (engl. *size exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering*), eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von Protein-Dimensionen in Lösung, beobachtet. Diese Methode verbindet die Auftrennung der Proteine nach dem hydrodynamischen Radius mittels Größenausschlusschromatographie mit der Weitwinkel-Lichtstreuung. Die Lichtstreuung eines Laserstrahls nach dem Auftreffen auf die Probe wird detektiert und erlaubt so die Bestimmung des Molekulargewichts. Diese Messungen wurden von [REDACTED] und Prof. Dr. [REDACTED], Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt.<sup>[111]</sup> Das gemessene Molekulargewicht des  $\text{Tp}x^{\text{WT}}$  steigt drastisch vom oxidierten und reduzierten Zustand zum CFT-gebundenen Zustand an (Abbildung 3-34). Hingegen entspricht der erhaltene Wert für die molare Masse von  $\text{Tp}x^{\text{W}39\text{A}}$ -CFT dem des  $\text{Tp}x^{\text{WT}}$  im oxidierten und reduzierten Zustand. Das beobachtete Molekulargewicht von  $\text{Tp}x^{\text{K}102\text{E}}$  liegt zwischen diesen beiden Massen.

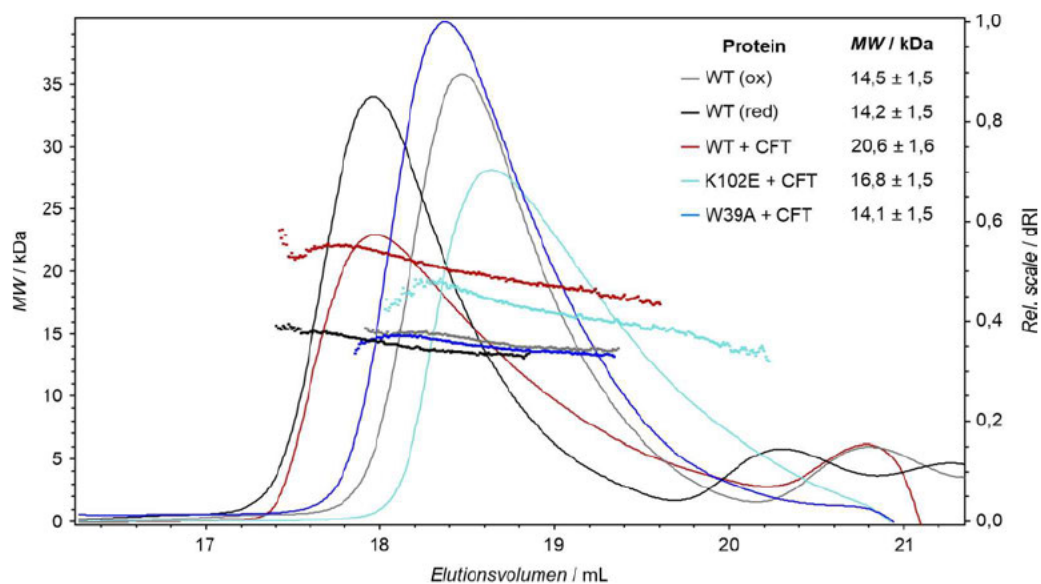


Abbildung 3-34 SEC-MALS von  $\text{Tp}x^{\text{WT}}$ ,  $\text{Tp}x^{\text{W}39\text{A}}$ ,  $\text{Tp}x^{\text{K}102\text{E}}$  im Komplex mit CFT. Gezeigt ist das Chromatogramm des SEC-Laufs von  $\text{Tp}x^{\text{WT}}$  im oxidierten (grau), reduzierten (schwarz) und CFT-gebundenen Zustand (rot) sowie  $\text{Tp}x^{\text{W}39\text{A}}$  (blau) und  $\text{Tp}x^{\text{K}102\text{E}}$  (cyan) im CFT-gebundenen Zustand. Relevant für die Bestimmung des Molekulargewichts sind die gepunkteten Linien und der zugehörige Y-Achsenabschnitt. Die daraus resultierenden Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Durchgeführt von [REDACTED] und Prof. Dr. [REDACTED], Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

Einen weiteren Beleg, dass der  $\text{Tp}x^{\text{W}39\text{A}}$ -CFT-Komplex nicht dimerisiert, liefert die NMR-Spektroskopie. Das NMR-Spektrum von  $\text{Tp}x^{\text{WT}}$  zeigt in Anwesenheit von CFT eine ausgeprägte Linienverbreiterung der Resonanzen (Abbildung 3-35a; Anhang Abbildung 6-14). Es verändern sich somit nicht nur die chemischen Verschiebungen der NH-Resonanzen in Anwesenheit von CFT, sondern auch die Linienbreiten vieler Resonanzen nehmen zu. Linienverbreiterungen in NMR-Spektren können zum einen auf die Zunahme der Proteindynamik oder des Molekulargewichts zurückgeführt werden. Die Dimerisierung von  $\text{Tp}x^{\text{WT}}$  führt zu einer Erhöhung des Molekulargewichts von ~16 kDa auf ~32 kDa. Für  $\text{Tp}x^{\text{W}39\text{A}}$  wurden analog zu  $^{15}\text{N}$ -markiertem  $\text{Tp}x^{\text{WT}}$  (Abbildung 3-21a)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HSQC-Spektren von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Protein im reduzierten Zustand in An- und Abwesenheit von CFT aufgenommen (Abbildung 3-35b). Der Ausschnitt der HSQC-Spektren von  $\text{Tp}x^{\text{W}39\text{A}}$  weist Unterschiede in den Positionen der NH-Resonanzen auf, allerdings verändern sich die Intensitäten

der Resonanzen nicht. Da der  $\text{Tp}x^{\text{W39A}}$ -CFT-Komplex ein Monomer ist, kommt es zu keiner Veränderung des Molekulargewichts und eine Linienverbreiterung bleibt aus.

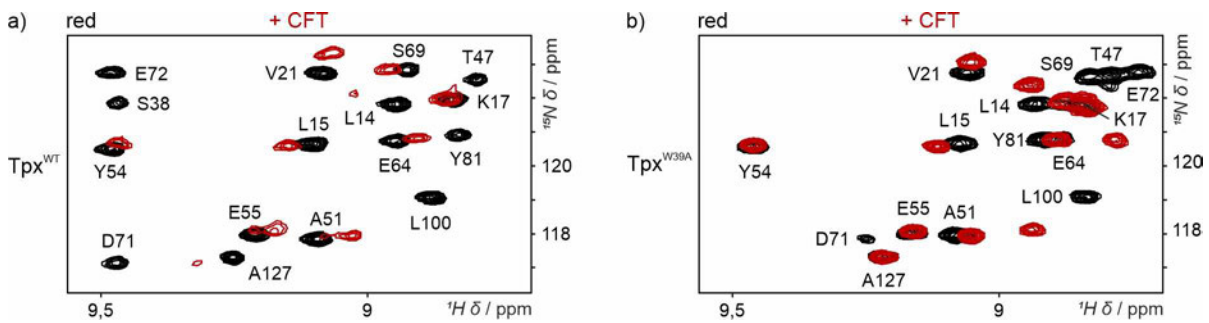


Abbildung 3-35 Ausschnitte der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HSQC-Spektren von (a)  $^{15}\text{N}$ - $\text{Tp}x^{\text{WT}}$  und (b)  $^{15}\text{N}$ - $\text{Tp}x^{\text{W39A}}$  im reduzierten (schwarz) und CFT-gebundenen (rot) Zustand (molares Verhältnis  $\text{Tp}x:\text{CFT}$  1:1,5). Die vollständigen NMR-Spektren sind Abbildung 6-14 und Abbildung 6-19 zu entnehmen. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

Es kann an dieser Stelle somit davon ausgegangen werden, dass  $\text{Tp}x^{\text{W39A}}$  im Komplex mit CFT nicht dimerisiert und  $\text{Tp}x^{\text{K102E}}$  im Vergleich zu  $\text{Tp}x^{\text{WT}}$  ein verändertes Dimerisierungsverhalten aufweist. Um ein Maß für die Dimeraffinität zu erhalten, wurde isotherme Titratorkalorimetrie (ITC) verwendet. Die Messvorrichtung für die ITC besteht aus zwei Kammern, einer Messkammer und einer Referenzkammer, welche mit einem Rückkopplungsmechanismus miteinander verbunden sind. Für die Bestimmung der Dimeraffinität wurde eine Verdünnungs-ITC durchgeführt. In der Messkammer wurde Puffer vorgelegt und der  $\text{Tp}x$ -CFT-Komplex in die Messkammer titriert. Handelt es sich bei dem  $\text{Tp}x$ -CFT-Komplex um ein Dimer, dissoziiert dieser durch die Verdünnung in der Messkammer. Dieser Prozess benötigt oder gibt Energie in Form von Wärme ab und verändert die Temperatur der Messkammer. Die Referenzkammer passt ihre Temperatur der Messkammer an, die so verbrauchte Energie wird detektiert und als Ausschlag im Thermogramm sichtbar (oberer Teil Abbildung 3-36). Das Integral der Fläche unter dem Ausschlag entspricht der Enthalpie  $\Delta H$ . Der Fit der Auftragung der Enthalpie  $\Delta H$  gegen das in der Kammer vorliegende molare Verhältnis liefert die Dissoziationskonstante  $K_D$  des titrierten Komplexes (unterer Teil Abbildung 3-36).

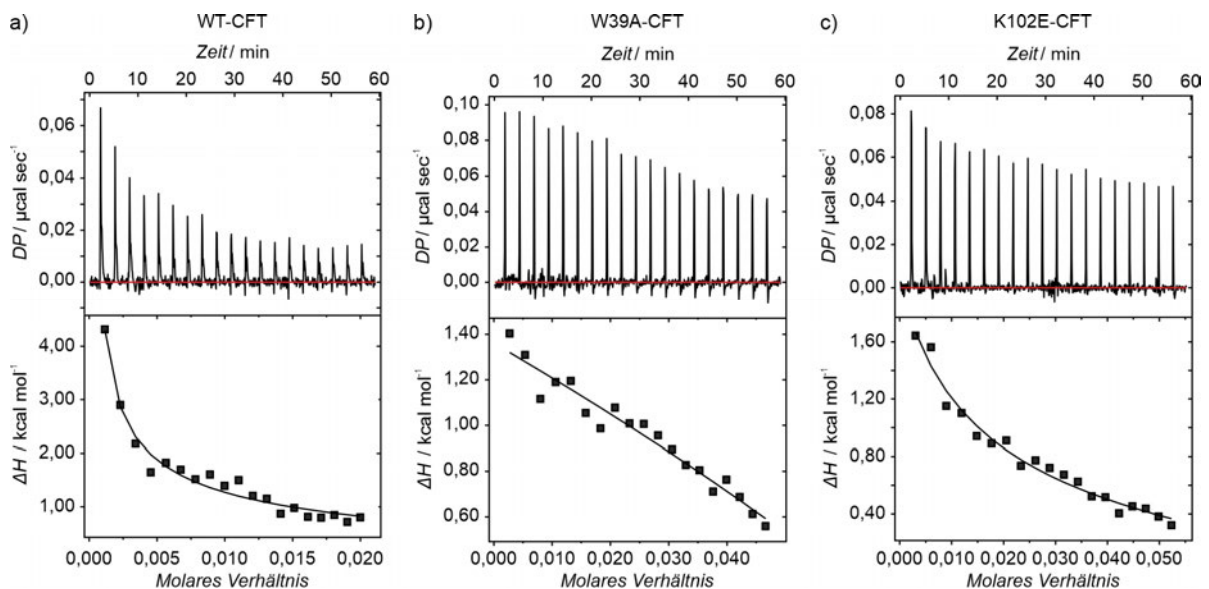


Abbildung 3-36 Verdünnungs-ITC-Messungen von (a)  $\text{Tp}x^{\text{WT}}$ , (b)  $\text{Tp}x^{\text{W39A}}$  und (c)  $\text{Tp}x^{\text{K102E}}$  im Komplex mit CFT. Der obere Abschnitt des Thermogramms zeigt die Rohdaten der Titrationen und der untere Teil präsentiert die integrierten Hitzesignaturen und den Fit der Kurve. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

So wurde die Dissoziationskonstante von  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$ ,  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$  und  $\text{Tpx}^{\text{K102E}}$  bestimmt. Des Weiteren wurde  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  in Abwesenheit von CFT in Puffer titriert und der  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$ -CFT-Dimerkomplex in  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$ -CFT-Dimerkomplex, welcher in der Messkammer vorgelegt war. Beide Kontrollexperimente lieferten keine Veränderungen in den Thermogrammen (Anhang Abbildung 6-20). Es konnte so ein  $K_D$  für  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  von  $5,7 \pm 1,4 \mu\text{M}$  und für  $\text{Tpx}^{\text{K102E}}$  ein 15-fach höheres  $K_D$  von  $83,1 \pm 32,2 \mu\text{M}$  ermittelt werden. Wie aus den vorherigen Experimenten zu erwarten war, konnte keine Dissoziation eines  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$ -CFT-Komplexes beobachtet werden, da keine Dimerisierung vorlag. Basierend auf der Dissoziationskonstante  $K_D$  und der Enthalpie  $\Delta H$  konnten die Gibbs'sche Enthalpie  $\Delta G$  und die Entropie  $\Delta S$  der Dissoziation bestimmt werden (Tabelle 3-2). Die treibende Kraft hinter der Dissoziation des Dimerkomplexes ist demnach die Entropie.

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Gleichung 3-2})$$

Tabelle 3-2 Thermodynamische Parameter der ITC-Verdünnungstitrationen von  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$ -CFT,  $\text{Tpx}^{\text{W39A}}$ -CFT und  $\text{Tpx}^{\text{K102E}}$ -CFT. (n.a. = nicht verfügbar)

	$K_D / \mu\text{M}$	$\Delta H / \text{cal mol}^{-1}$	$\Delta G / \text{cal mol}^{-1}$	$\Delta S / \text{cal mol}^{-1} \text{deg}^{-1}$
$\text{Tpx}^{\text{WT}}$ -CFT	$5,7 \pm 1,4$	$12523 \pm 2065,1$	$7167,9 \pm 158,4$	$18,0 \pm 7,0$
$\text{Tpx}^{\text{W39A}}$ -CFT	Keine Dissoziation	n.a.	n.a.	n.a.
$\text{Tpx}^{\text{K102E}}$ -CFT	$83,1 \pm 32,2$	$3891 \pm 332,6$	$5612,5 \pm 249,9$	$-5,8 \pm 1,6$

### 3.2.5 $^{19}\text{F}$ NMR-spektroskopische Untersuchungen von freiem CFT und Tpx-gebundenem CFT

$^{19}\text{F}$  besitzt einen zu 100% natürlich vorkommenden  $-1/2$  Spin. Aufgrund seines hohen gyromagnetischen Verhältnisses ist der  $^{19}\text{F}$ -Nukleus hochempfindlich gegenüber seiner chemischen Umgebung.<sup>[149,150]</sup> Der Phenylring des CFT trägt in *para*-Position ein Fluoratom (Abbildung 3-19). Wie in Kapitel 3.2.3 und 3.2.4 gezeigt, bildet der Tpx<sup>WT</sup>-CFT-Komplex ein Dimer, der Tpx<sup>K102E</sup>-CFT-Komplex dimerisiert ebenfalls, jedoch mit einer 15-fach geringeren Affinität und Tpx<sup>W39A</sup>-CFT liegt als Monomer vor. CFT, als Teil der Dimer-Berührungsfläche, befindet sich in jedem dieser Tpx-Komplexe in unterschiedlichen Umgebungen, welche sich auch von freiem CFT in Lösung unterscheiden. Durch die unterschiedlichen Umgebungen sollte also auch eine jeweilige unterschiedliche chemische Verschiebung der  $^{19}\text{F}$ -Resonanz des CFT resultieren.

Es wurden  $^{19}\text{F}$  1D-Spektren von freiem CFT und MFT in Lösung sowie CFT gebunden an Tpx<sup>WT</sup>, Tpx<sup>W39A</sup> und Tpx<sup>K102E</sup> aufgenommen. Die Resonanzen von freiem CFT und MFT in den  $^{19}\text{F}$ -Spektren haben schmale Linienbreiten und sehr ähnliche chemische Verschiebungen ( $-114,79$  ppm für CFT und  $-114,77$  ppm für MFT; Abbildung 3-37a). In Komplex mit Tpx<sup>WT</sup> weist die  $^{19}\text{F}$ -Resonanz von CFT sowohl eine Veränderung der Verschiebung ( $-114,47$  ppm) als auch eine deutliche Linienverbreiterung im Vergleich zum freien Inhibitor auf (Abbildung 3-37a). Eine schrittweise Verdünnung dieses Komplexes (von  $750\ \mu\text{M}$  bis  $50\ \mu\text{M}$  Proteinkonzentration) führt zu keiner Veränderung der chemischen Verschiebung (Abbildung 3-37b).

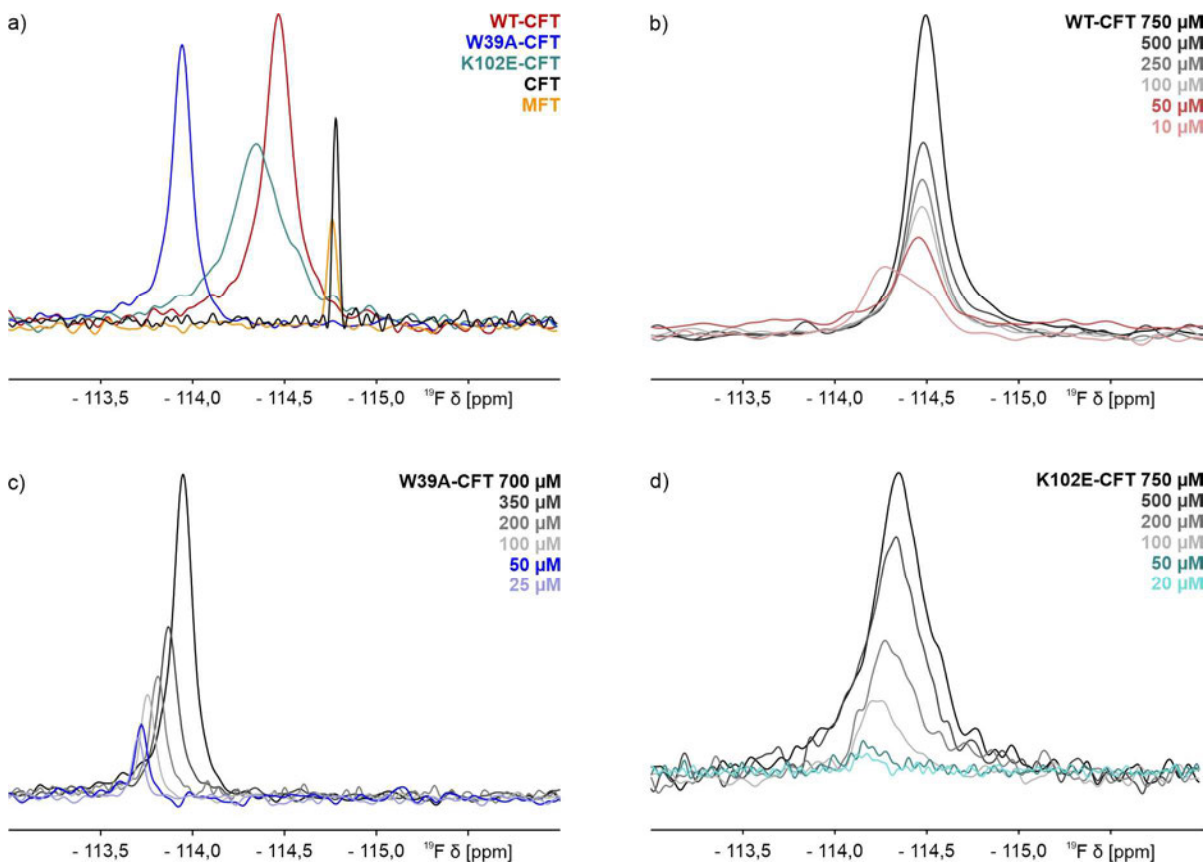


Abbildung 3-37  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von CFT und MFT sowie CFT an Tpx-Varianten gebunden. (a)  $^{19}\text{F}$  1D NMR-Spektren von CFT (schwarz) und MFT (orange) in Lösung sowie CFT im Komplex mit Tpx<sup>WT</sup> (rot;  $750\ \mu\text{M}$ ), Tpx<sup>W39A</sup> (blau;  $750\ \mu\text{M}$ ) und Tpx<sup>K102E</sup> (cyan;  $700\ \mu\text{M}$ ). (b), (c) und (d) zeigen jeweils die  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektren der Verdünnungsreihen von Tpx<sup>WT</sup>-CFT, Tpx<sup>W39A</sup>-CFT und Tpx<sup>K102E</sup>-CFT. Modifiziert nach Dietschreit et al., 2020.<sup>[118]</sup>

Das Auftreten einer zweiten Population ist bei einer Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$   $\text{TpX}^{\text{WT}}\text{-CFT}$  zu beobachten. Da das Signal unter  $10\ \mu\text{M}$  im Rauschen unterging, war eine Titration des  $\text{TpX}^{\text{WT}}\text{-CFT}$ -Komplexes weit unter den  $K_{\text{D}}$  ( $\ll 5\ \mu\text{M}$ ) jedoch nicht möglich. Die  $^{19}\text{F}$ -Resonanz des CFT Moleküls in Komplex mit  $\text{TpX}^{\text{W39A}}$  ist im Vergleich zu  $\text{TpX}^{\text{WT}}\text{-CFT}$  um  $0,8\ \text{ppm}$  tieffeldverschoben ( $-113,7\ \text{ppm}$  bei  $700\ \mu\text{M}$  Proteinkonzentration; Abbildung 3-37c). Diese Resonanz hat eine geringere Linienbreite als die von CFT im Komplex mit  $\text{TpX}^{\text{WT}}$  und es ist eine stetige Tieffeld-Veränderung der Verschiebung bei geringeren Konzentrationen zu beobachten. Das 1D  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum von  $\text{TpX}^{\text{K102E}}\text{-CFT}$  ( $750\ \mu\text{M}$  Proteinkonzentration;  $-114,36\ \text{ppm}$ ; Abbildung 3-37d) zeigt eine deutliche Linienverbreiterung und eine chemische Verschiebung, die zwischen der von  $\text{TpX}^{\text{WT}}\text{-CFT}$  und  $\text{TpX}^{\text{W39A}}\text{-CFT}$  liegt. In der Verdünnungsreihe von  $\text{TpX}^{\text{K102E}}\text{-CFT}$  im Bereich von  $750\ \mu\text{M}$  bis  $20\ \mu\text{M}$  bleibt die Linienverbreiterung kontinuierlich bestehen. Es kommt zu einer leichten Tieffeldverschiebung, aber es entsteht keine zweite Signalpopulation im Konzentrationsbereich des  $K_{\text{D}}$  des  $\text{TpX}^{\text{K102E}}\text{-CFT}$ -Dimerkomplexes ( $83,1\ \mu\text{M}$ ).

Die gleichzeitige Verfügbarkeit einer Röntgenkristallstruktur und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Daten für das  $\text{TpX}$ -Inhibitorsystem boten die Möglichkeit einer systematischen QM/MM-basierten Simulation (engl. *quantum-mechanical/molecular-mechanical*) der chemischen Verschiebungen des Fluors von CFT.<sup>[118]</sup> Im Gegensatz zu kleinen organischen Molekülen besitzen Biomoleküle in Lösung typischerweise nicht ein tiefes Energieminimum, sondern eine Vielzahl energetisch ähnlicher Konformationen, die bei physiologischen Temperaturen thermodynamisch zugänglich sind. In NMR-Experimenten resultiert dies in einer gemittelten chemischen Verschiebung. Daher müssen viele verschiedene Konfigurationen des Systems berücksichtigt werden, um die beobachtete chemische Verschiebung zu berechnen.<sup>[151]</sup> Des Weiteren stellt die Vorhersage des Bindemodus eines fluorinierten Liganden ausgehend von der chemischen Verschiebung aufgrund der hohen Elektronendichte des Fluoratoms eine Herausforderung dar.<sup>[152,153]</sup> Basierend auf den Kristallstrukturen des  $\text{TpX}$ -CFT-Komplexes und den MD-Simulationen (durchgeführt von Dr. ██████████, AG Prof. Dr. ██████████, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, siehe auch Kapitel 3.2.2), wurden QM/MM-Simulationen durchgeführt, um die  $^{19}\text{F}$  chemische Verschiebung von MFT, CFT und CFT in Komplex mit  $\text{TpX}^{\text{WT}}$  (Dimer) und  $\text{TpX}^{\text{W39A}}$  (Monomer) vorherzusagen. Diese wurden von ██████████, Doktorand im Arbeitskreis von Prof. Dr. ██████████ an der Ludwig-Maximilians-Universität München, vorgenommen. Weiterhin wurde berücksichtigt, dass in den drei Ketten in der Einheitszelle der Kristallstruktur zwei Posen von CFT beobachtet wurden (Abbildung 3-23).

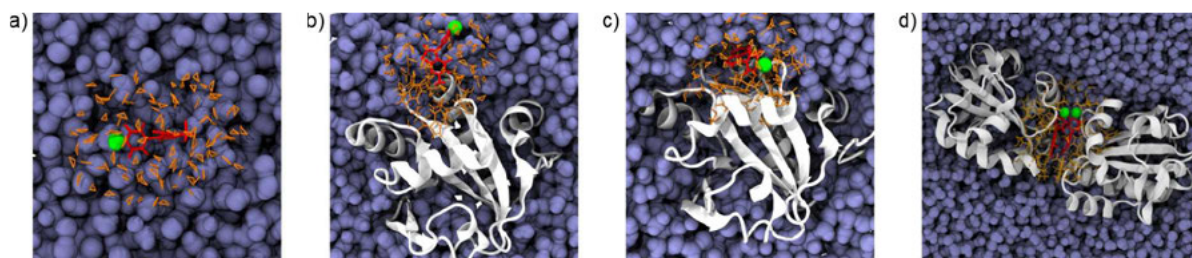


Abbildung 3-38 Darstellung der für die QM/MM-Simulationen verwendeten QM-Regionen und der MM-Einbettung. Gezeigt ist (a) CFT in Lösung, (b)  $\text{TpX}$ -CFT-Monomer in Pose 2, (c)  $\text{TpX}$ -CFT-Monomer in Pose 1 und (d) der  $\text{TpX}$ -CFT-Dimerkomplex. Blau: Wassermoleküle; rot: CFT; weiß:  $\text{TpX}$ -Kristallstruktur (PDB 6gxy); orange: Atome in der QM-Region; grün: Fluor. QM/MM-Simulationen wurden von ██████████, AG Prof. Dr. ██████████ an der Ludwig-Maximilians-Universität München, durchgeführt. Modifiziert nach Dietschreit et al., 2020.<sup>[118]</sup>

Für die Simulationen wurde von verschiedenen Szenarien ausgegangen (Abbildung 3-38):<sup>[118]</sup> i) CFT (oder MFT) in Lösung ohne Protein; ii) Der Tpx-CFT-Komplex ist ein Monomer, CFT ist vom Lösungsmittel umgeben und bildet, außer der kovalenten Bindung mit Cys40, keine Interaktionen mit dem Protein aus. Dies ist in der Kristallstruktur in Kette C zu beobachten (Pose 2) (Abbildung 3-23). ii) Der Protein-Inhibitor-Komplex ist ein Monomer, jedoch interagiert CFT wie in den Ketten A und B in der Kristallstruktur mit Tpx (Pose 1). iii) Tpx bildet in Komplex mit CFT ein Dimer. Die CFT-Moleküle bilden die Dimer-Berührungsfläche.

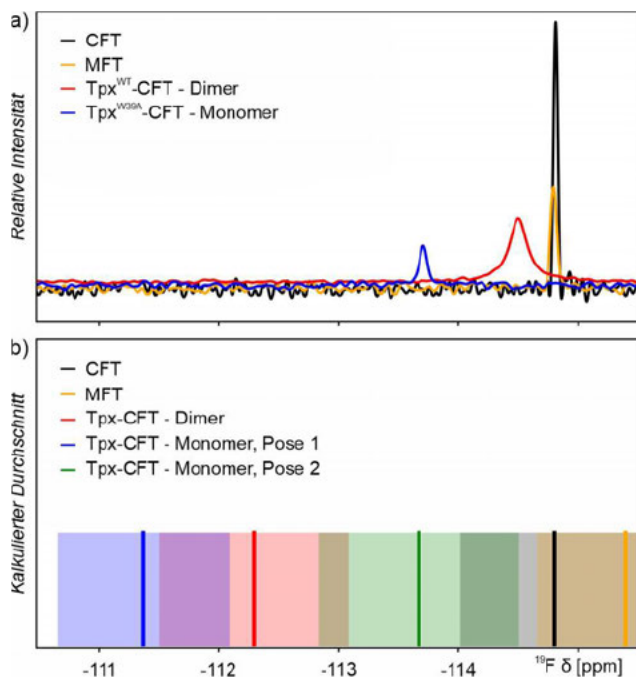


Abbildung 3-39 Vergleich der gemessenen und berechneten <sup>19</sup>F-Verschiebungen des Fluoratoms in CFT und MFT sowie CFT in Komplex mit Tpx-Varianten (a) <sup>19</sup>F-NMR-Spektren von CFT (schwarz) und MFT (gelb) in Lösung sowie dem dimerisierten Tpx<sup>WT</sup>-CFT-Komplex (rot), und dem Tpx<sup>W39A</sup>-CFT-Komplex (blau), welcher als Monomer vorliegt. (b) Die berechneten Mittelwerte der <sup>19</sup>F chemischen Verschiebungen sind als vertikale Linien und die Standardabweichung als schattierter Bereich dargestellt. Die <sup>19</sup>F-Verschiebungen von CFT, MFT, Tpx-CFT-Dimer und Tpx-CFT-Monomer in den Posen 1 und 2 wurden mittels QM/MM-Simulationen von [REDACTED], AG Prof. Dr. [REDACTED] an der Ludwig-Maximilians-Universität München, berechnet. Modifiziert nach Dietschreit et al., 2020.<sup>[118]</sup>

Die QM/MM-Simulationen sollten genutzt werden, um zu überprüfen, welche dieser Inhibitorposen in Lösung vorkommen, indem die berechneten chemischen Verschiebungen mit den gemessenen verglichen wurden. Weiterhin eröffnet der Vergleich simulierter und gemessener Daten die Möglichkeit, die Genauigkeit der berechneten Verschiebungen in Abhängigkeit von der Zahl der einbezogenen Atome in der Simulation zu eruieren. So wurde festgestellt, dass eine 7 Å QM-Pufferregion notwendig ist, um größenkonvergente Verschiebungen zu erhalten. Für das Tpx<sup>WT</sup>-CFT-Dimer umfasst dieser Bereich mehr als 1000 Atome (Abbildung 3-38d).<sup>[118]</sup> Für den Vergleich der experimentellen und berechneten <sup>19</sup>F-Verschiebungen wurde der gemessene Wert für CFT in Lösung (-114,77 ppm) als Referenz für die kalkulierten Werte verwendet. Die gemessenen Fluor-Verschiebungen für MFT und Protein-gebundenes CFT entsprechen nicht exakt den errechneten Werten, allerdings lassen sich die relativen Anordnungen der Resonanzen zueinander übertragen (Abbildung 3-39). So liegen zwischen den gemessenen Resonanzmaxima von CFT und MFT 0,02 ppm, die errechneten Werte unterscheiden sich um 0,58 ppm (QM/MM-Simulation: MFT 115,35 ppm). Die relative Anordnung der Resonanzen

zueinander, aber auch die überschätzten Unterschiede zwischen den chemischen Verschiebungen der unterschiedlichen Zustände durch die Simulation, setzt sich fort: die gemessenen chemischen Verschiebungen für CFT in Lösung und Tpx-CFT Dimer unterscheiden sich um 0,32 ppm, die errechneten Werte zueinander um 2,48 ppm (QM/MM-Simulation: Tpx-CFT-Dimer -112,29 ppm). Die Position der <sup>19</sup>F-Resonanz von Tpx<sup>W39A</sup>-CFT im Vergleich zur Position des Dimers von Tpx<sup>WT</sup>-CFT entspricht der Resonanz des Monomers in Pose 1 (QM/MM-Simulation: Tpx-CFT-Monomer Pose 1 - 111,39 ppm). Die errechnete chemische Verschiebung der Pose 2 von CFT im Tpx-CFT-Monomer liegt

zwischen dem Dimer und CFT in Lösung (QM/MM-Simulation: -113,65 ppm), konnte in den  $^{19}\text{F}$  NMR-Messungen jedoch nicht beobachtet werden.<sup>[118]</sup> Der Vergleich der Messdaten mit den Simulationen zeigt, dass die relativen  $^{19}\text{F}$ -Verschiebungen der QM/MM-Simulation qualitativ zu den gemessenen chemischen Verschiebungen von CFT in den verschiedenen Zuständen passen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Strukturelle Untersuchung von Tpx im oxidierten, reduzierten und Trypanothion-gebundenen Zustand

#### 4.1.1 Änderungen des Redoxzustands von Tpx werden über das aktive Zentrum hinaus wahrgenommen

Tryparedoxin (Tpx) ist ein Thioredoxin-ähnliches Protein<sup>[65]</sup> und kommt in allen Trypanosomatiden vor. Es übernimmt in dem Trypanothion/Trypanothion-Reduktase-System der Trypanosomen Funktionen, die denen von Thioredoxin und Glutaredoxin in den Thioredoxin- und Glutaredoxin-Systemen eukaryotischer Zellen entsprechen. Diese Systeme sind verantwortlich für die Entgiftung von Peroxiden und der Aufrechterhaltung des Thiol-Redox-Haushalt. Tpx reduziert Tryparedoxin-abhängige Peroxidasen<sup>[65,77]</sup> sowie die Ribonukleotid-<sup>[154]</sup> und Methionin-Sulfoxid-Reduktase<sup>[80]</sup>. Um seine Funktion erfüllen zu können, wechselt Tpx zwischen vier physiologischen Zuständen (Abbildung 1-7): i) oxidiertes Zustand, die Cysteinreste 40 und 43 des aktiven Zentrums bilden eine intramolekulare Disulfidbrücke; ii) Trypanothion bindet an Cys40 in Tpx; iii) reduzierter Zustand, Cys40 und Cys43 mit freien Thiolgruppen; iv) Cys40 in Tpx bildet eine intermolekulare Disulfidbindung mit einem Zielprotein aus. Für eine strukturelle Aufklärung der Zustände von Tpx wurde mit der Betrachtung des Proteinrückgrats im oxidierten und reduzierten Zustand mit Hilfe der NMR-Spektroskopie begonnen.

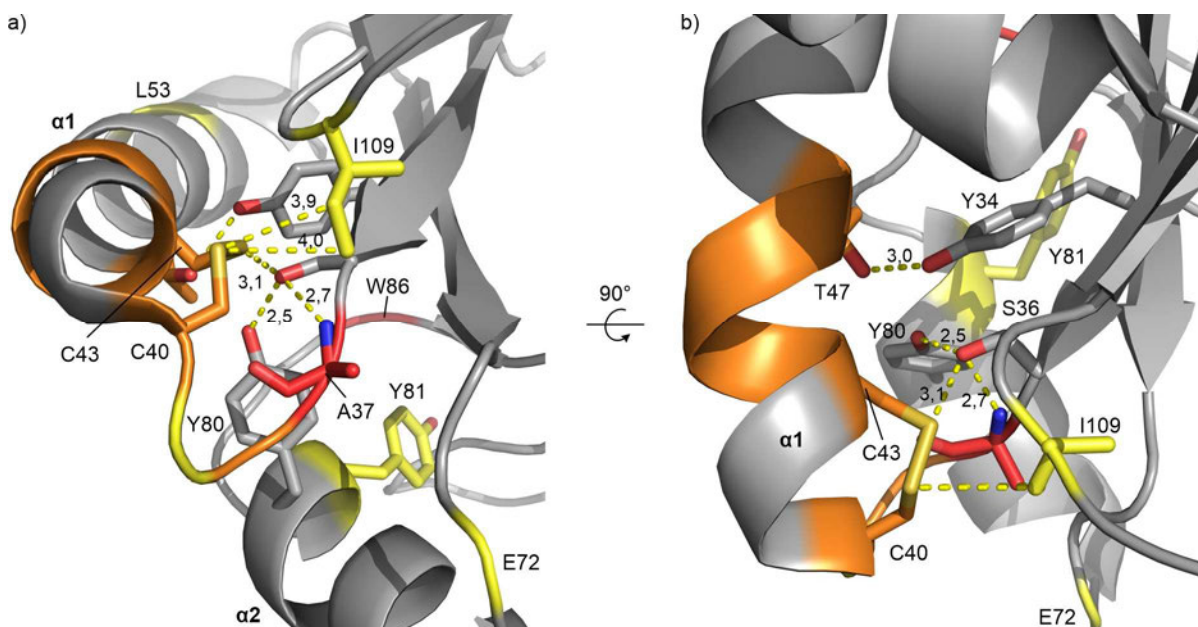


Abbildung 4-1 Zoom in das aktive Zentrum von oxidiertem *T. brucei* Tpx (PDB 1o73) zur Visualisierung des Netzwerkes der Wasserstoffbrückenbindungen. Die Färbung der Aminosäuren basiert auf den Unterschieden der chemischen Verschiebung zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand, basierend auf den in dieser Arbeit erhobenen NMR-Daten aus Kapitel 3.1.1 (Abbildung 3-1; Abbildung 3-2). Aminosäuren, die Unterschiede der chemischen Verschiebung  $\geq 1 \sigma$  Standardabweichung aufwiesen sind gelb eingefärbt,  $\geq 2 \sigma$  sind orange eingefärbt und im reduzierten Zustand fehlende NH-Resonanzen rot. Tyr34, Ser36, Ala37, Cys40, Cys43, Thr47, Tyr80, Tyr81 und Ile109 sind als Stäbchen hervorgehoben. Wechselwirkungen sind als gelb gestrichelte Linien gezeigt und die Abstände in Angström  $\text{\AA}$  angegeben. Farbcodierung der Nicht-Kohlenstoff-Atome: gelb: Schwefel; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff.

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HQSC-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten und reduzierten Zustand zeigten eine gute Dispersion, die auf ein erfolgreich markiertes, gefaltetes Protein hinweisen. Die Rückgrat NH-Resonanzen konnten zu 96,3% beziehungsweise 97,8% im oxidierten und reduzierten Zustand zugeordnet werden (Abbildung 3-1a). Basierend auf den Sekundärstrukturvorhersagen mittels TALOS+ wurden sowohl für den oxidierten als auch reduzierten Zustand Strukturelemente, die vergleichbar mit denen der *T. brucei* Tpx-Kristallstruktur (PDB 1o73) sind, bestimmt.

Es wurde ein Vergleich der chemischen Verschiebungen der zugeordneten NH-Resonanzen im oxidierten und reduzierten Zustand durchgeführt (Abbildung 3-1b). Wie zu erwarten, wiesen die Aminosäuren innerhalb des aktiven Zentrums die größten Unterschiede zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand auf (Abbildung 3-2). Dies betrifft Aminosäuren Ser38, Cys40, Cys43, Arg44, Gly45 und Phe46. Alphey et al. beschrieben für die Kristallstruktur von CfTpxI (PDB 1kq8) ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Wechselwirkungen, welches die Cysteinreste des aktiven Zentrums umgibt (Abbildung 4-1).<sup>[105]</sup> S $\gamma$  von Cys43 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Hydroxylsauerstoff der Seitenkette von Ser36. Der Hydroxylsauerstoff von Ser36 wiederum geht Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rückgratamid von Ala37 und der Hydroxylgruppe von Tyr80 ein. Außerdem bilden die Hydroxylgruppen der Seitenketten von Tyr34 und Thr47 eine Wasserstoffbrückenbindung aus.<sup>[155]</sup> Ferner wurden van der Waals Wechselwirkungen zwischen Cys40 S $\gamma$  und C $\gamma$ 1 sowie C $\delta$ 1 von Ile109 identifiziert.<sup>[155]</sup> Die Öffnung der Disulfidbrücke zwischen Cys40 und Cys43 nach Reduktion von Tpx könnte zu einer Veränderung dieses Netzwerkes und einer damit verbundenen Veränderung der Konformation in der unmittelbaren Umgebung der Cysteinreste führen. Die konformationelle Veränderung spiegelt sich in den Unterschieden der chemischen Verschiebungen der beteiligten Aminosäuren wider. Interessanterweise kommt es bei den Aminosäuren Ser36, Tyr34 und Tyr80, die ebenfalls Teil des beschriebenen Netzwerkes sind, zu keinen Veränderungen, welche über die einfache Standardabweichung der chemischen Verschiebung hinausgehen. Dies ist unerwartet, da in der reduzierten Kette einer Kristallstruktur von CfTpxII (PDB 1fg4; Abbildung 1-10b) neben der Zunahme der Abstände zwischen den Schwefelatomen der Cysteinreste eine Verringerung des Abstands zwischen dem Hydroxylsauerstoff von Ser37 (Ser36 in *Tb*Tpx) und dem Schwefelatom von Cys44 (Cys43 in *Tb*Tpx) von 3,6 Å auf 3,2 Å der einzige signifikante Unterschied zu der oxidierten Kette ist.<sup>[107]</sup> Zum einen deutet dies daraufhin, dass die Kristallstruktur des reduzierten CfTpxII nicht die in Lösung vorkommende Konformation des reduzierten Zustands abbildet, da mehr Aminosäuren durch den Wechsel des Redox-Zustandes Unterschiede in der chemischen Verschiebung aufweisen als Ser36, Cys40 und Cys43. Zum anderen deuten die Unterschiede der Ergebnisse, die mittels NMR-Spektroskopie erhalten wurden im Vergleich zu den in der Kristallstruktur beobachteten Veränderungen durch den Redox-Wechsel darauf hin, dass es möglicherweise in Lösung durch die konformationelle Veränderung vom oxidierten in den reduzierten Zustand in Tpx zur Ausbildung eines anderen Netzwerkes aus Wechselwirkungen in unmittelbarer Umgebung des aktiven Zentrums kommt als in der reduzierten CfTpxII-Struktur beobachtet. Des Weiteren zeigen die Unterschiede  $\Delta\delta$  der chemischen Verschiebungen weiterer Aminosäuren wie Leu53, Glu72 und das „Verschwinden“ der NH-Resonanz von Trp86, welche sich nicht in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum befinden, dass sich Konformationsänderungen, die das Protein beim Wechsel zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand durchläuft, über das aktive Zentrum hinaus erstrecken (Abbildung 4-1).

### 4.1.2 Die Dynamik des aktiven Zentrums von Tpx verändert sich durch den Wechsel des Redox-Zustands

Neben den strukturellen Änderungen in Tpx vom oxidierten im Vergleich zum reduzierten Zustand ist eine Veränderung der Dynamik im Nano- bis Pikosekunden Bereich in  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$ -hetNOE-Experimenten zu beobachten (Abbildung 3-4).

Unabhängig vom Redox-Zustand zeichnen sich einzelne Bereiche des Tpx durch eine erhöhte Dynamik im Vergleich zum restlichen Protein aus. Wie oft in Proteinen beobachtet, ist der N-Terminus (Gly1 und Ser2) flexibel. Interessanterweise weist der C-Terminus diese gesteigerte Flexibilität nicht auf. Dies könnte auf eine Stabilisierung des C-Terminus durch ein hydrophobes Netzwerk zurückzuführen sein. Das hydrophobe Netzwerk des C-Terminus wird in Kapitel 4.1.6 eingehender betrachtet. Ein flexibleres Proteinrückgrat wiesen die Aminosäuren in einem Loop N-terminal des  $\beta$ 1-Faltblatts (Thr12 und Asn13) und Reste des  $\beta$ 2-Faltblatts (Gly19 und Glu20) auf. Diese Bereiche bilden N-terminale Schleifen zu den  $\beta$ -Faltblättern des Zentrums von Tpx und eine gesteigerte Dynamik in diesen Regionen ist nicht unerwartet. Ähnliche flexiblere Bereiche wurden auch in anderen Vertretern der Thioredoxin-Familie mittels  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$ -hetNOE-Experimenten beobachtet. So sind auch der N-Terminus und einzelne Bereich zwischen Sekundärstrukturelementen in Trx1 aus *E. coli*<sup>[156]</sup> oder Trx aus *S. cerevisiae*<sup>[157]</sup> flexibler als das restliche Protein. Insgesamt liegen die  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$ -hetNOE-Werte in diesen Proteinen analog zu Tpx zwischen 0,6 und 0,9. Ungefaltete Peptide, die sehr flexibel sind, haben hingegen hetNOE-Werte zwischen -1,3 und 0.<sup>[158]</sup>

Das Proteinrückgrat von Cys40 hat im reduzierten Zustand eine höhere Dynamik als im oxidierten Zustand. Es könnte durch die fehlende Disulfidbrücke zwischen Cys40 und Cys43 im reduzierten Zustand zu einer Destabilisierung von Cys40 und daher zu einer höheren Flexibilität des Proteinrückgrats von Cys40 im Vergleich zum oxidierten Zustand kommen. Unerwarteterweise ist den  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$ -hetNOE-Werten der NH-Resonanzen von Cys43 zu entnehmen, dass das Proteinrückgrat dieses Rest im reduzierten Zustand rigider wird. Eine mögliche Erklärung wäre, dass  $\text{S}\gamma$  von Cys43 im Gegensatz zu Cys40, welches stärker dem Lösungsmittel ausgesetzt ist, ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen umgibt. Das Netzwerk wird von den Hydroxylgruppen der Aminosäuren Tyr34, Ser36, Thr47 und Tyr80 sowie des Rückgratamids von Ala37 gebildet (siehe auch Kapitel 4.1.1 und Abbildung 4-1).<sup>[105]</sup> Einer der wenigen Unterschiede zwischen der reduzierten und oxidierten Kette in der Einzelzelle einer Kristallstruktur von CfTpxII (PDB 1fg4) ist, dass im reduzierten Zustand der Abstand zwischen dem Hydroxylsauerstoff von Ser36 und  $\text{S}\gamma$  von Cys43 im Vergleich zum oxidierten Zustand abnimmt.<sup>[110]</sup> So könnte durch die Verringerung des Abstands von Cys43  $\text{S}\gamma$  zu der Hydroxylgruppe von Ser36 vom oxidierten in den reduzierten Zustand von Tpx, der Cysteinrest 43 durch Ser36 im reduzierten Zustand stärker stabilisiert werden. Es ist jedoch entgegen den Erwartungen, dass eine Wasserstoffbrückenbindung zu einer höheren Stabilität als eine kovalente Bindung führt. Möglich wäre auch, dass die Disulfidbrücke und damit verbunden die erste N-terminale Windung der  $\alpha$ 1-Helix durch die beiden Prolinreste zwischen Cys40 und Cys43 unter „Spannung“ steht (Abbildung 4-1). Durch die Öffnung der Disulfidbrücke könnte es dann zu einer „Entspannung“ der ersten N-terminalen Windung der  $\alpha$ 1-Helix kommen und eine Stabilisierung des Proteinrückgrats von Cys43 bewirken. Die beschriebenen Ursachen für die herabgesetzte Flexibilität des Proteinrückgrats von Cys43, könnten auch die im reduzierten Zustand rigideren Aminosäuren Ser38 und Arg44 im Vergleich zum oxidierten Zustand erklären.

Abgesehen von den Veränderungen der Dynamik im aktiven Zentrum und einzelnen Aminosäuren (Val59, Asn62, Asn73, Lys83 und Arg128) scheint der Wechsel des Redox-Zustandes die Dynamik von Tpx<sup>WT</sup> nur geringfügig zu beeinflussen.

### 4.1.3 Identifikation von Resten, die an der kovalenten und nicht-kovalenten Bindung von T(SH)<sub>2</sub> an Tpx beteiligt sind

In der Peroxid-Entgiftungs-Kaskade überträgt reduziertes Trypanothion T(SH)<sub>2</sub> Elektronen auf oxidiertes Tryparedoxin Tpx, um die Oxidoreduktase zu reduzieren. Da bisher nur Strukturinformationen über die Interaktionen von Tpx mit Trypanothion-Derivaten verfügbar sind, wurde Tpx in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> NMR-spektroskopisch betrachtet, um die molekulare Interaktion zwischen Tpx und T(SH)<sub>2</sub> besser zu verstehen. Die hier durchgeführten Untersuchungen der Interaktion von Tpx<sup>WT</sup> und T(SH)<sub>2</sub> identifizieren ein mögliches Bindemotiv in *T. brucei* Tpx für T(SH)<sub>2</sub>. Es wurden <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektren von <sup>15</sup>N-Tpx in Ab- und Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> aufgenommen (Abbildung 3-5). Die Unterschiede zwischen oxidiertem und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenem Zustand und zwischen reduziertem und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenem Zustand lassen vermuten, dass sich reduziertes und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenes Tpx ähnlicher sind als der oxidierte und T(SH)<sub>2</sub>-gebundene Zustand (Abbildung 3-7). Der T(SH)<sub>2</sub>-gebundene Zustand von Tpx<sup>WT</sup> ist dem reduzierten Zustand vermutlich ähnlicher, da in beiden Zuständen die Disulfidbrücke zwischen Cys40 und Cys43 nicht ausgebildet ist.

Die NH-Resonanzen einiger Reste werden sowohl durch den Wechsel des Redox-Zustands als auch durch die T(SH)<sub>2</sub>-Bindung beeinflusst (Abbildung 3-1; Abbildung 3-7). In den Vergleichen des oxidierten mit dem reduzierten Zustand und der reduzierte mit dem T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand weist das aktive Zentrum die größten Veränderungen auf. Bei der Veränderung vom oxidierten zum reduzierten Zustand liegen die Unterschiede der chemischen Verschiebungen weit über 2σ. Bei der T(SH)<sub>2</sub>-Bindung konnten die NH-Resonanzen des aktiven Zentrums nicht mehr detektiert werden. Auch die Aminosäuren Trp39, Glu72, Tyr81 und Ile109, welche geringe Unterschiede der chemischen Verschiebungen zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand, „spüren“ die Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub>. Die T(SH)<sub>2</sub>-Bindung scheint somit zusätzlich zur Veränderung des Redox-Zustands einen Einfluss auf die chemische Umgebung dieser Aminosäuren zu haben.

Hofmann et al. veröffentlichten 2001<sup>[107]</sup> eine Kristallstruktur der Cys44Ser-Mutante von TpxII aus *C. fasciculata* in Komplex mit einem *Dead-End*-Derivat von Trypanothion, dem N<sup>1</sup>-Glutathionylspermidin (N<sup>1</sup>-Gsp) (Abbildung 4-2a und b). In der Kristallstruktur bildet der Schwefel der Cysteylseitenkette des N<sup>1</sup>-Gsp eine Disulfidbrücke mit dem Cys41 von TpxII (Cys40 in *TbTpx*). Des Weiteren zeigt die Kristallstruktur Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Seitenkette von Arg129 (Arg128 in *TbTpx*) und der Carboxylgruppe des Glutathionylarms sowie zwischen dem Amid und Carbonylsauerstoff der Ile110-Pro111-Peptidbindung (Ile109-Pro110 in *TbTpx*) und dem Amid und Carbonylsauerstoff des Cysteylrestes des N<sup>1</sup>-gebundenen Glutathionylarms (Abbildung 4-2b).<sup>[107]</sup> N<sup>1</sup>-Gsp fehlt der zweite Glutathionylarm des Trypanothions. Basierend auf der Kristallstruktur von *CfTpxII-C44S* im Komplex mit N<sup>1</sup>-Gsp wurde händisch ein vollständiges Trypanothion in die *T. brucei* Tpx-Kristallstruktur eingezeichnet (Abbildung 4-2c). Als weitere Bezugspunkte dienten Aminosäuren, deren NH-Resonanzen Unterschiede ≥ 2σ in der chemischen Verschiebung zwischen reduziertem und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenem Zustand aufwiesen oder sich im T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand verbreiterten, sodass sie nicht mehr detektiert werden konnten (Abbildung 3-7; Abbildung 3-8a).

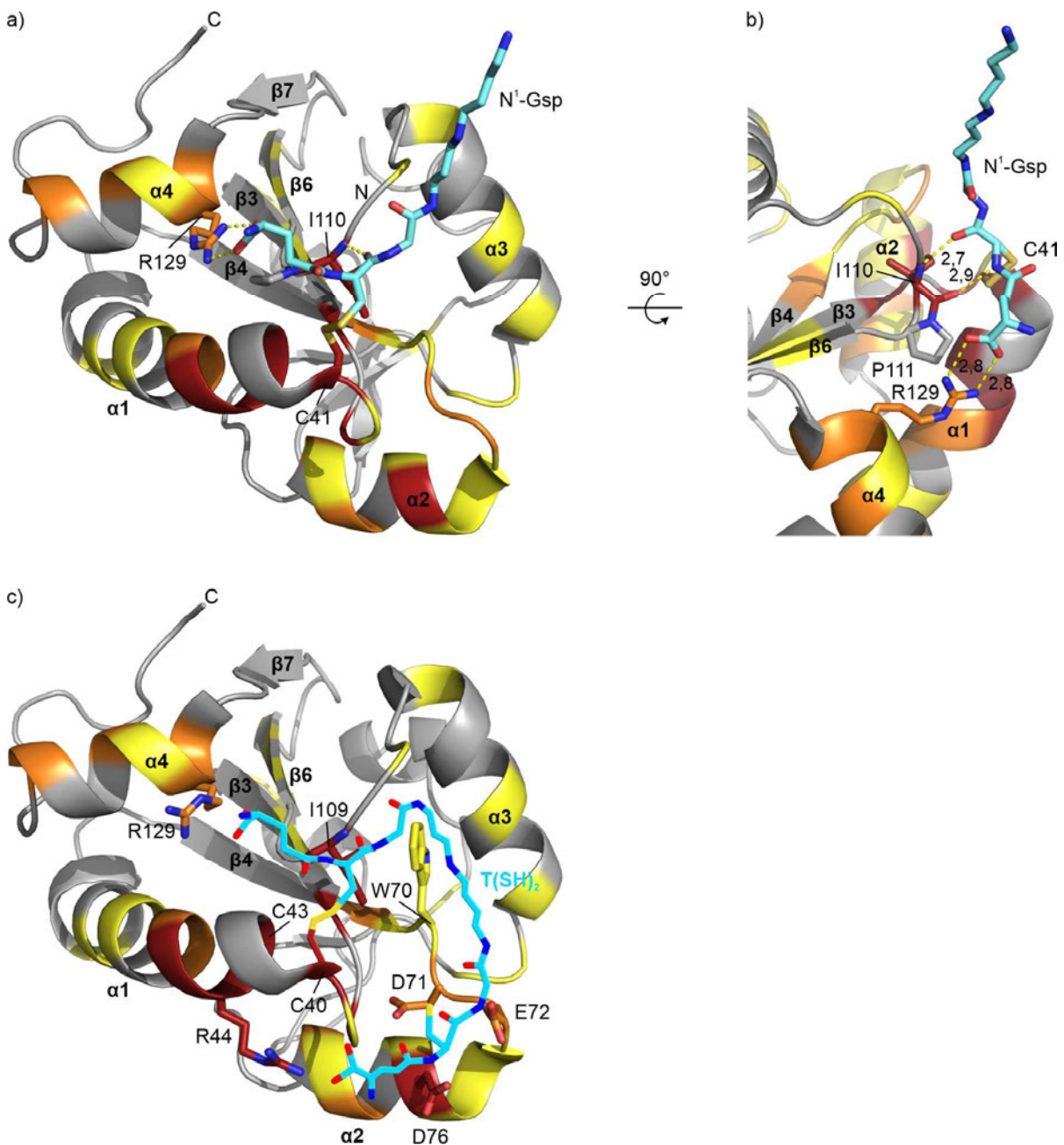


Abbildung 4-2 Basierend auf der Orientierung von N<sup>1</sup>-Glutathionylspermidin (N<sup>1</sup>-Gsp) im Komplex mit CfTpxII-Cys44Ser-Mutante in der Kristallstruktur in (a) und (b) (PDB 1i5g) und den in dieser Arbeit erhobenen NMR-Daten wurde in (c) eine mögliche Orientierung von Trypanothion zu TbTpx<sup>WT</sup> postuliert. In (a) und (b) sind Aminosäuren als Stäbchen hervorgehoben, die in CfTpx Kontaktpunkte mit N<sup>1</sup>-Gsp (cyan) darstellen, Cys41, Ile110, Pro111 und Arg129. Diese Reste entsprechen Cys40, Ile109, Pro110 und Arg128 in TbTpx. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Tpx und N<sup>1</sup>-Gsp sind als gelb gestrichelte Linien dargestellt und die Abstände in Å angegeben. Die Farbcodierung der Kohlenstoffatome in (a)-(c) entspricht der „Hitzekarte“ in Abbildung 3-8. Eingefärbt sind Aminosäuren in TbTpx, deren NH-Resonanzen Unterschiede der chemischen Verschiebungen zwischen dem reduzierten und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand aufwiesen (gelb: 1σ Unterschied; orange: 2σ Unterschied; rot: fehlende NH-Resonanz in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub>). (c) Hervorgehoben als Stäbchen sind Aminosäuren, welche vermutlich in TbTpx<sup>WT</sup> in Kontakt zu T(SH)<sub>2</sub> treten. Das eingezeichnete T(SH)<sub>2</sub> ist in hellblau dargestellt. Farbcodierung der Nicht-Kohlenstoff-Atome: gelb: Schwefel; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff.

Aus der Trypanothion-Orientierung in Abbildung 4-2c ergibt sich ein mögliches Bindemotiv für  $T(SH)_2$  an *TbTpx* bestehend aus folgenden Einzelinteraktionen: i)  $T(SH)_2$  ist kovalent an Cys40 gebunden; ii) Es finden elektrostatische Interaktionen zwischen den Aminen der Seitenkette von Arg128 und der Carboxylgruppe des  $N^1$ -gebundenen Glutathions statt; iii) Das Amid und der Carbonylsauerstoff der Peptidbindung zwischen Ile109 und Pro110 interagieren mit dem Amid und Carbonylsauerstoff des Cysteylrestes des  $N^1$ -gebundenen GSH; iv) Die Seitenkette von Arg44 und die Carboxylgruppe des  $N^8$ -gebundenen Glutathionylrestes wechselwirken; v) Trp70, Asp71, Glu72 und Asp76, die einen Loop N-terminal zu sowie den N-terminalen Bereich der  $\alpha 2$ -Helix formen, bilden elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Spermidinlinker und dem Cysteylrest des  $N^8$ -gebundenen GSH aus. Die Interaktionen i) bis iii) stehen im Einklang mit den beobachteten Interaktionen in der Kristallstruktur des Komplexes aus *CfTpxII* und  $N^1$ -Gsp.<sup>[107]</sup> Zusätzlich zeigten Modellierungen im Rahmen der Veröffentlichung dieser Kristallstruktur von Hofmann et al., dass auch Arg45 und Glu73 in *CfTpxII* Teil des Bindemotivs von  $T(SH)_2$  sein könnten. Auch die in dieser Arbeit erhobenen NMR-Daten an *TbTpx* mit  $T(SH)_2$  zeigen, dass die äquivalenten Reste Arg44 und Glu73 an einer Interaktion mit  $T(SH)_2$  beteiligt sein könnten. Allerdings legen die hier präsentierten NMR-Daten nahe, dass die Interaktion nicht ausschließlich Glu72 betrifft, sondern auch eine Beteiligung der Aminosäuren Trp70, Asp71 und Asp76 vorliegt.

Die Annahme eines solchen Bindemotivs wird auch durch die NMR-spektroskopische Untersuchung von  $Tpx^{C40S}$  in Anwesenheit von  $T(SH)_2$  bestätigt. Aufgrund der Mutation des Cysteinrests zu Serin in  $Tpx^{C40S}$  kann keine kovalente Disulfidbindung zwischen  $Tpx$  und  $T(SH)_2$  gebildet werden. Es wurden  $^1H$ - $^{15}N$  2D HSQC-Spektren von  $^{15}N$   $Tpx^{C40S}$  in An- und Abwesenheit von  $T(SH)_2$  aufgenommen und die Unterschiede der NH-Resonanzen bestimmt. Die Standardabweichung der Unterschiede der chemischen Verschiebungen zwischen dem apo Zustand von  $Tpx^{C40S}$  und in Anwesenheit von  $T(SH)_2$  war im Vergleich zu der Standardabweichung der Unterschiede zwischen dem reduzierten und  $T(SH)_2$ -gebundenen Zustand in  $Tpx^{WT}$  um ein dreifaches niedriger. Somit kommt es anscheinend auch ohne die Ausbildung einer kovalenten Bindung zu einer Anlagerung von  $T(SH)_2$  an  $Tpx^{C40S}$ , diese Interaktion ist jedoch deutlich verringert. In Anwesenheit von  $T(SH)_2$  weisen die gleichen Aminosäuren in  $Tpx^{C40S}$  und  $Tpx^{WT}$  Unterschiede in der chemischen Verschiebung auf: Trp70, Glu72, Asp76 und Ile109 (Abbildung 3-8b). Aufgrund der fehlenden NH-Resonanzen des Cys43 des aktiven Zentrums und der angrenzenden Aminosäuren in den NMR-Spektren von  $Tpx^{C40S}$ , sowohl im apo Zustand als auch in Anwesenheit von  $T(SH)_2$ , kann keine Aussage über die Beteiligung der Aminosäuren des aktiven Zentrums an einem nicht-kovalenten Bindemotiv getroffen werden. Im Gegensatz zu der Beobachtung in  $Tpx^{WT}$  scheint  $T(SH)_2$  in  $Tpx^{C40S}$  keinen Effekt auf Arg128 in der  $\alpha 4$ -Helix zu haben, die Teil des oben postulierten kovalenten Bindemotivs in  $Tpx^{WT}$  ist. Dies legt nahe, dass eine Interaktion von  $T(SH)_2$  mit Arg128 nur stattfindet, wenn es auch zu einer kovalenten Bindung von  $T(SH)_2$  an  $Tpx$  kommt. Ähnliche Beobachtungen machten auch Krumme et al., 2003<sup>[110]</sup> bei der Untersuchung von *CfTpxI* mittels NMR-Spektroskopie in An- und Abwesenheit eines Trypanothion-Derivats. Sie verwendeten redox-inaktives  $N^1, N^8$ -bis( $\gamma$ -Glu-Ala-Gly)-spermidin, welches anstelle der Cysteinreste Alaninreste in den Glutathionylarmen aufwies und somit keine kovalente Disulfidbrücke mit *CfTpxI* eingehen konnte. Die Aminosäuren, deren NH-Resonanzen in diesem Experiment Verschiebungen aufwiesen, waren: Trp39, Cys40, Cys43, Arg44, Glu72 und Ile109.<sup>[110]</sup> Arg128 scheint auch in Anwesenheit eines redox-inaktiven Derivats keine Veränderungen in der chemischen Umgebung zu erfahren.

Im Rahmen ihrer Publikation postulierten Krumme et al.<sup>[110]</sup> eine elektrostatische Interaktion von Arg44 in *CfTpxI* mit der Carboxylgruppe des  $N^8$ -gebundenen Glutathionylrestes in Trypanothion. Der

Cysteylrest des N<sup>8</sup>-gebundenen Glutathionylarms wird so in die Nähe von Aminosäure Cys40 und den daran gebundenen Cysteylrest des N<sup>1</sup>-Glutathionarms gebracht. Die Nähe der Cysteylreste beider Glutathionylarme ist erforderlich, dass diese ein intramolekulares Disulfid bilden und TS<sub>2</sub> sowie reduziertes CfTpxI entsteht. Die Hypothese, dass die elektrostatische Interaktion zwischen den Aminen von Arg44 in CfTpxI und der Carboxylgruppe von T(SH)<sub>2</sub> wichtig für die katalytische Aktivität von CfTpxI ist, beruht auch auf einer Untersuchung der Aktivität der Einzelmutante Arg44 zu Asp<sup>I159I</sup> in CfTpxII in einem gekoppelten Px-Assay. CfTpxII<sup>R44D</sup> wies im Assay eine Aktivität von 0,7%<sup>I159I</sup> relativ zum CfTpxII<sup>WT</sup> auf. Allerdings handelt es sich bei der Substitution von Arginin mit Aspartat um eine drastische Mutation, da die Elektrostatik umgekehrt wurde. Die Aktivität von Tpx<sup>R44A</sup>, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt wurde, unterscheidet sich nur unwesentlich von der Aktivität des Tpx<sup>WT</sup> (Abbildung 3-11). Dies deutet daraufhin, dass Arg44 eine Veränderung der chemischen Umgebung in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> erfährt, dieser Rest jedoch nicht relevant für die Aktivität des Proteins und somit für die Interaktion mit T(SH)<sub>2</sub> ist. Somit scheint ein positiver Rest an dieser Position in Tpx nicht benötigt zu werden, allerdings führt ein negativer Rest, wie in CfTpxII<sup>R44D</sup> von Steinert et al.<sup>I159I</sup> beschrieben, zu einer gestörten Aktivität der Oxidoreduktase. Neben Arg44 wurde die Rolle weiterer Reste für die funktionelle Interaktion mit T(SH)<sub>2</sub> im gekoppelten Px-Assay untersucht. Dafür wurden weitere Aminosäuren in TbTpx in Einzelmutanten mutiert. Es wurden Aminosäuren ausgewählt, deren NH-Resonanzen in <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektren sowohl große Unterschiede zwischen den Verschiebungen im oxidierten und reduzierten Zustand zeigten (Abbildung 3-1), als auch zwischen dem reduzierten Zustand und in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> (Abbildung 3-7). Wie zu erwarten war, wiesen die Einzelmutanten Tpx<sup>C40S</sup> und Tpx<sup>C43S</sup> sowie die Doppelmutante Tpx<sup>C40/43S</sup> keine Aktivität auf. Durch das Fehlen eines oder beider Cysteinreste kann keine Weitergabe von Elektronen erfolgen und es findet so nur der Verbrauch von NADPH statt, welcher durch die spontane Reduktion der Kaskade zustande kommt. Daneben scheinen die Mutationen von Ser38Ala und Thr129Ala sowie Tyr81Phe keine signifikante Auswirkung auf die Aktivität von Tpx zu haben. Obwohl diese Aminosäuren eine Veränderung der chemischen Umgebung durch den Wechsel des Redox-Zustands und der Bindung an T(SH)<sub>2</sub> erfahren, scheinen sie somit nicht für die T(SH)<sub>2</sub>-Bindung (noch für die Wechselwirkung mit der Peroxidase) verantwortlich zu sein, da sonst ein Effekt im Aktivitätsassay zu sehen sein sollte. Die Mutanten Tpx<sup>W39A</sup>, Tpx<sup>W70A</sup> und Tpx<sup>I109A</sup> zeigen keine oder nur eine geringe (bis ~30%) Restaktivität verglichen mit Tpx<sup>WT</sup>. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Aminosäuren Trp39, Trp70 und Ile109 wichtig für die Aktivität von Tpx sind. Mit dem gekoppelten Peroxidase-Assay kann gezeigt werden, ob und welche Aktivität Tpx oder Tpx-Mutanten haben, allerdings nicht, wodurch eine Veränderung der Aktivität ausgelöst wird. So können die Mutationen die strukturelle Integrität des Proteins verändern (hier vermutlich über die vorhandenen SEC-, SAXS-, CD- und NMR-Daten ausgeschlossen) oder zu einer Störung der Interaktion mit Trypanothion und/oder PxIII führen. In der Kristallstruktur von CfTpxII im Komplex mit N<sup>1</sup>-Gsp (PDB 1i5g) bilden das Amid und der Carbonylsauerstoff der Ile110-Pro111-Peptidbindung mit dem Amid und Carbonylsauerstoff des Cysteylrestes des N<sup>1</sup>-gebundenen Glutathionylarms Wasserstoffbrückenbindungen aus (Abbildung 4-2b). In der Kristallstruktur ist keine Beteiligung der Seitenkette von Ile110 an der Interaktion mit N<sup>1</sup>-Gsp zu erkennen. Durch eine Mutation des in *T. brucei* entsprechenden Restes Ile109 zu Ala sind die T(SH)<sub>2</sub>-Interaktionspunkte mit dem Proteinrückgrat der Aminosäure also weiterhin vorhanden. Die direkte Wechselwirkung zwischen T(SH)<sub>2</sub> und der Aminosäure an Position 109 ist somit vermutlich nicht der Grund für die reduzierte Aktivität von Tpx<sup>I109A</sup>. Eine mögliche Erklärung für die geringe Restaktivitäten von Tpx<sup>I109A</sup> sowie Tpx<sup>W39A</sup> und Tpx<sup>W70A</sup> liefert eine genauere Betrachtung der Tryptophanreste 39 und 70, mit denen Ile109 wechselwirkt (Abbildung 4-8), in Kapitel 4.1.6.

Um das Bindeverhalten von  $T(SH)_2$  an Tpx noch genauer zu untersuchen, sollten weitere Punktmutationen der postulierten relevanten Aminosäuren, Asp71, Glu72, Asp76 und Arg128 eingeführt werden. Es wurden bereits von Budde et al.<sup>[89]</sup> Mutationen der möglicherweise relevanten Aminosäuren durchgeführt und die Aktivitäten in einem gekoppelten Px-Assay untersucht. Allerdings handelt es sich hier um sehr drastische Mutationen, da die Polarität der Aminosäurereste umgekehrt wurde: Tpx<sup>E72R</sup>, Tpx<sup>D76K</sup>, Tpx<sup>D79K</sup>, Tpx<sup>D76/79K</sup> und Tpx<sup>R128D</sup>.<sup>[89]</sup> Um die Rolle dieser Reste für die Bindung von  $T(SH)_2$  an Tpx zu überprüfen, wäre es zielführender eine neutrale Seitenkette einzuführen, wie z. B. einen Alaninrest. Da die Aktivität von Tpx im gekoppelten Px-Assay abhängig von der Interaktion mit  $T(SH)_2$  und PxIII ist, sollte eine Methode gewählt werden, welche ausschließlich die Bindung zwischen Tpx und  $T(SH)_2$  betrachtet. Diese Möglichkeit bietet z. B. die NMR-Spektroskopie. Sind diese Aminosäuren relevant oder sogar essenziell für die  $T(SH)_2$ -Bindung, sollte eine abgeschwächte Bindung im Vergleich zum Tpx<sup>WT</sup> in den NMR-Spektren zu beobachten sein. Eine weitere Möglichkeit wäre die Betrachtung des Laufverhaltens der Tpx-Mutanten in Anwesenheit von  $T(SH)_2$  in nativen Polyacrylamidgelen. Durch die Bindung von  $T(SH)_2$  an Tpx, sollte sich durch die Änderung der Ladungsverhältnisse des Komplexes im Vergleich zu freiem Tpx, das Laufverhalten unterscheiden. Außerdem könnte das postulierte Bindemotiv von  $T(SH)_2$  weiter verifiziert werden, indem die Interaktion von Tpx mit GSH untersucht wird. Hierfür könnte <sup>15</sup>N Tpx<sup>WT</sup> mit GSH titriert und die chemischen Verschiebungen mit denen des Tpx- $T(SH)_2$  Komplexes verglichen werden. Die Erwartung wäre, dass die Aminosäuren N-terminal zu und innerhalb  $\alpha 2$ -Helix keine Veränderungen ihrer chemischen Verschiebung erfahren, da der zweite Glutathionylarm und der Spermidinlinker fehlen, um diese Interaktionen einzugehen. Des Weiteren sollte es in Anwesenheit von GSH zu unterschiedlichen Positionen der NH-Resonanzen von  $\alpha 4$ -Helix und insbesondere von Arg128 in den NMR-Spektren von Tpx kommen, wenn das postulierte  $T(SH)_2$ -Bindemotiv an Tpx real ist. Eine weitere Möglichkeit wäre die MD-Simulation des Intermediats aus  $T(SH)_2$  und Tpx um die Annahme des Bindemotivs von  $T(SH)_2$  an Tpx zu überprüfen.

T_brucei	MSGLAKYLPGATNLLSKSGEVSLGSLVGKTVFLYFSASWCPPCRGFTPVLAEFYEKHHVA	60
T_cruzi	MSGLAKYLPSTIKLVSKSGTVSPISLAGKTVFFYFSASWCPPCRGFTPTLVEFYEFRES	60
C_fasciculata	MSGLDKYLPGIEKLRRGDGEVEVKSLAGKLVFFYFSASWCPPCRGFTPQLIEFYDKFHES	60
L_seymouri	MSGLSKYLPNIEKLRHGDSEVEVKSLSGKIVFFYFSASWCPPCRGFTPQLIEFYEFHEQ	60
L_braziliensis	MSGLNKHLPGVVTLQKQSEVSVSSLSGKTVFFYFSASWCPPCRGFTPQLIEFYEKYHDS	60
L_major	MSGVAKHLGEALKLRKQADTADMDSLGSKTVFFYFSASWCPPCRGFTPQLVEFYEKHHDS	60
L_infantum	MSGVSKHLGDVLLKQKQNDMVDMSLSGKTVFLYFSASWCPPCRGFTPKLVEFYEKHHNS	60
	***: *:* .* . . * * * :***** * * *:*.:	
T_brucei	KNFEVVLISWDENESDFHDYYGKMPWLALPFDQRSTVSELGKTFGVESIPTLITINADTG	120
T_cruzi	KNFEVVLVTWDEEEAYNGYFAKMPWLAIPFSSRTELEALRSTFGVETIPTVIAVNADTG	120
C_fasciculata	KNFEVVFCTWDEEEDGFAGYFAKMPWLAVPFAQSEAVQKLSKHFNVESIPTLIGVDADSG	120
L_seymouri	KNFEVILCSWDEEEDGFSGYAKMPWLALSFAQSDVVQKLSKEFNVESIPTLIGVDADSG	120
L_braziliensis	KNLEVVLVTWDEEEDGFNGYYAKMPWLAIPFSQRHLVEGLTKAFKVESIPTVIGVCADTG	120
L_major	KNFEIILASWDEEEDFNAYYAKMPWLSIPFANRNIVEALTKKYSVESIPTLIGLNADTG	120
L_infantum	KNFEIILASWDEEEDFNNGYYSKMPWLSIPFEKRNVEALTKQYKVESIPTLIGLNADTG	120
	**:*::: :***:* . : * :*****: * . : . * . : **:*:* : **:	
T_brucei	AIIGTQARTRVIEDPDGANFPWPN--	144
T_cruzi	AVVSTKGRERLLTDEPKNFPWSD--	144
C_fasciculata	DVVTTRARATLVKDPEGEQFPWKDAP	146
L_seymouri	EVVTTRARQTLVKDPEGQFPWKDAQ	146
L_braziliensis	DVVTTRARHALTQDPEGEQFPWRD--	144
L_major	DTVTRARHALTQDPMGEQFPWRDE-	145
L_infantum	DTVTRARHALTQDPEGEQFPWRDE-	145
	: *:* : * * * :*** :	

Abbildung 4-3 Sequenzalignment von Tryparedoxin aus verschiedenen Trypanosomatidenspezies durchgeführt mit Clustal Omega. *T. cruzi* (UniProt Q8T8E0); *L. major* (UniProt E9ADX4); *T. brucei* (UniProt O77404); *C. fasciculata* (UniProt O96438); *L. infantum* (Q6RYT3); *Leptomonas seymouri* (UniProt A0A0N1I697) *L. braziliensis* (UniProt A0A3P3ZBP9) (rot hinterlegt: Cysteinreste des aktiven Zentrums; blau hinterlegt: mögliches T(SH)<sub>2</sub>-Bindemotiv in Tpx basierend auf den in dieser Arbeit erhobenen NMR-Daten.

Die Übereinstimmung des hier erarbeiteten Bindemotivs von Trypanothion an *T. brucei* Tpx mit dem postulierten Bindemotiv an *C. fasciculata* Tpx<sup>[107,110]</sup> lassen auf ein mögliches generelles Bindemotiv von T(SH)<sub>2</sub> in Tryparedoxinen schließen. Ein Sequenzalignment der Tryparedoxine aus verschiedenen Trypanosomatidenspezies zeigt, dass die Aminosäuren Trp39, Trp70, Glu72, Ile109 und Arg128 in allen Tryparedoxinen hochkonserviert sind (Abbildung 4-3). Zusätzlich ist auch ein saurer Bereich C-terminal zu Trp70 in allen Tryparedoxinen konserviert, welcher, wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, Teil des kovalenten und nicht-kovalenten Bindemotivs sein könnte. Falls es sich bei dem oben postulierten Bindemotiv für T(SH)<sub>2</sub> an *Tb*Tpx um ein generelles Bindemotiv für T(SH)<sub>2</sub> in Tryparedoxinen handelt, könnte dieses auch eine mögliche Erklärung dafür sein, dass Tpx hauptsächlich von T(SH)<sub>2</sub> reduziert wird. Wie in Kapitel 1.5 eingeführt, gehört Tpx der Thioredoxin-Familie an, wird jedoch im Gegensatz zu anderen Vertretern der Familie wie Thioredoxin (Trx) und Glutaredoxin (Grx) durch T(SH)<sub>2</sub> im reduzierten Zustand gehalten.<sup>[65]</sup> Trx wird durch die Thioredoxin-Reduktase und Grx durch Glutathion (GSH) reduziert.<sup>[70]</sup> Unterschiede zwischen den Strukturen von Tpx, Grx und Trx könnten einen Hinweis liefern, ob das T(SH)<sub>2</sub>-Bindemotiv auch für die Selektivität von Tpx für T(SH)<sub>2</sub> als Elektronendonator verantwortlich ist (Abbildung 4-4). So zeigt die NMR-Struktur von Grx im Komplex mit GSH (*E. coli* Grx1-Cys14Ser im Komplex mit GSH, PDB 1grx) eine ähnliche Orientierung des GSH zu Grx (Abbildung 4-4b) wie N<sup>1</sup>-Gsp zu Tpx (Abbildung 4-4a; PDB 1i5g). Es kommt zu einer kovalenten Bindung des Cysteylrestes des GSH mit dem reaktiven Cys11 von Grx sowie zu einer Koordinierung des Amids und Carbonylsauerstoff des Cysteylrestes von GSH durch das Amid und den Carbonylsauerstoff der Peptidbindung zwischen Val59 und Pro60 in Grx. Die Aminosäuren Val59 und Pro60 nehmen in Grx eine ähnliche Position zu Cys11 wie Ile109 und Pro110 zu Cys40 in *Tb*Tpx ein (Abbildung 4-4d). In Trx (*E. coli* Trx1, PDB 1xob) nehmen Ile75 und Pro76 ähnliche Positionen zum reaktiven Cys32 ein (Abbildung 4-4c). Das Glutamyl-Ende des GSH ist,

ähnlich wie T(SH)<sub>2</sub>, in die Richtung der C-terminalen  $\alpha$ 3-Helix in Grx orientiert und interagiert mit Thr73. Die Orientierung der C-terminalen  $\alpha$ 4-Helix in Tpx führt dazu, dass die Seitenkette von Arg128 in Richtung des gebundenen Trypanothions zeigt. Die C-terminale  $\alpha$ 4-Helix in Trx hat eine größere Distanz zum aktiven Zentrum im Vergleich zur  $\alpha$ 4-Helix in Tpx und  $\alpha$ 3-Helix in Grx, da das N-terminale  $\beta$ 5-Faltblatt aus Trx länger ist als der  $\beta$ 7-Strang in Tpx. Ein weiterer bedeutender Unterschied zwischen den Strukturen von Tpx, Grx und Trx ist das Fehlen der  $\alpha$ 2-Helix aus Tpx in Grx und Trx. Die Aminosäuren Trp70, Asp71, Glu72 und Asp76 in Tpx, welche wahrscheinlich Teil des Bindemotivs von T(SH)<sub>2</sub> an Tpx sind, sind N-terminal zu und innerhalb von  $\alpha$ 2-Helix zu finden. Tpx unterscheidet sich strukturell von Grx und Trx in Bereichen, welche ein mögliches Bindemotiv für T(SH)<sub>2</sub> in Tpx bilden: eine Schleife N-terminal zu  $\alpha$ 2-Helix (Trp70 und ein konservierter saurer Bereich) und  $\alpha$ 2-Helix selbst sowie die Orientierung der C-terminalen  $\alpha$ 4-Helix und Arg128. Diese Teile des T(SH)<sub>2</sub>-Bindemotivs in Tpx könnten somit auch eine Rolle in der Selektivität für T(SH)<sub>2</sub> als Elektronendonator für Tpx darstellen. Möglicherweise bringt die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Arg128 in Tpx und der Carboxylgruppe eines Glutathionylarms von Trypanothion sowie zwischen der  $\alpha$ 2-Helix in Tpx und dem Spermidinlinker von Trypanothion den zweiten Glutathionylarm in eine bevorzugte Position für die Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke in Trypanothion. Dies würde eine Dissoziation des Trypanothiondisulfid von Tpx begünstigen. Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch von Krumme et al.<sup>[110]</sup> postuliert. Die ermittelte Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion der Elektronenübertragung von GSH auf Tpx im gekoppelten Px-Assay ist drei Größenordnungen langsamer als die äquivalente Reaktion von T(SH)<sub>2</sub> mit Tpx.<sup>[72]</sup> In Tpx existieren keine Reste, die äquivalent zu Tyr13 und Thr73 in Grx1 mit GSH interagieren könnten. Allerdings könnte GSH, ähnlich orientiert wie N<sup>1</sup>-Gsp, an Tpx binden (Abbildung 4-4d). Die kinetisch günstigere Oxidation von T(SH)<sub>2</sub> im Vergleich zu GSH, da ein intra- und kein intermolekulares Disulfid gebildet werden muss, führt möglicherweise zu einer verlangsamten Dissoziation des Tpx-GSH-Komplexes und damit zu einem stabileren Komplex als Tpx-T(SH)<sub>2</sub>. Um zu überprüfen, ob die Dissoziation des Tpx-GSH-Komplexes langsamer verläuft als die des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex, könnte die Titration von <sup>15</sup>N-Tpx<sup>WT</sup> mit GSH NMR-spektroskopisch betrachtet werden. Bildet GSH einen „stabileren“ Komplex mit Tpx<sup>WT</sup> als T(SH)<sub>2</sub> sollte die Halbwertszeit für den Tpx-GSH-Komplex länger sein als für den Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex. Die Kapitel 3.1.5 und 4.1.5 beschreiben die Untersuchung der Lebensdauer des isolierten Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes. Um die Hypothese zu untersuchen, dass die Orientierung der  $\alpha$ 4-Helix in Tpx sowie die Schleife N-terminal zu  $\alpha$ 2-Helix und  $\alpha$ 2-Helix selbst der entscheidende Unterschied für die Selektivität von T(SH)<sub>2</sub> als Elektronendonator für Tpx ist, könnte Tpx strukturell Grx oder Trx angeglichen werden. Es könnte eine Deletion der  $\alpha$ 2-Helix in Tpx wie in Grx und Trx durchgeführt werden oder eine Verlängerung des  $\beta$ 7-Faltblatts wie in Trx herbeigeführt werden.

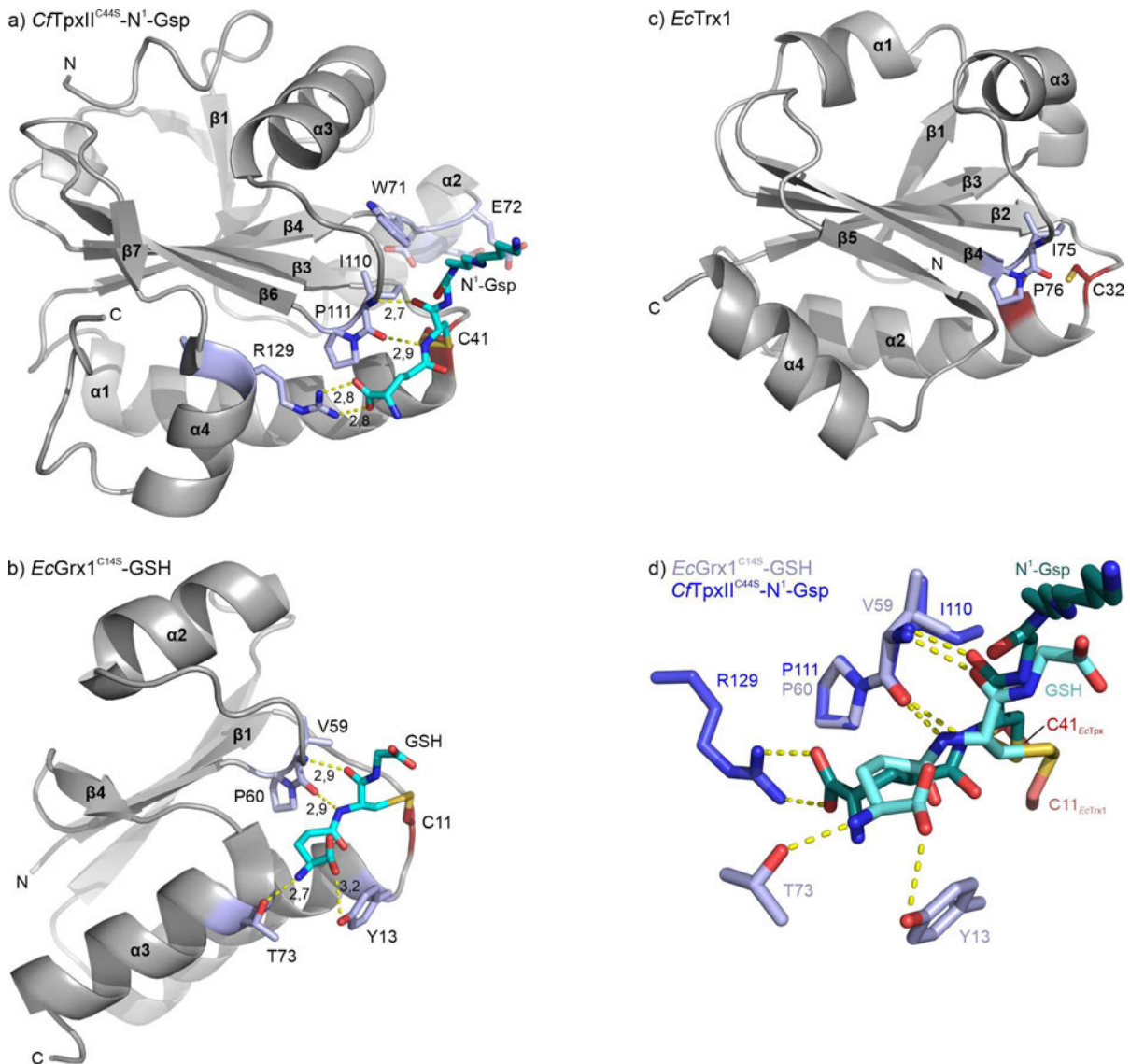


Abbildung 4-4 Strukturen von Tpx, Grx und Trx. (a) *C. fasciculata* TpxII im Komplex mit N<sup>1</sup>-Glutathionylspermidin (PDB 1i5g). Das gebundene Cystein (rot), Seitenketten im Kontakt mit N<sup>1</sup>-Gsp (hellblau) und N<sup>1</sup>-Gsp (cyan) sind als Stäbchen dargestellt. (b) *E. coli* Grx1 im Komplex mit GSH (PDB 1grx). Das Cystein (rot), die im Kontakt mit GSH befindlichen Seitenketten (hellblau) und GSH (cyan) sind als Stäbchen gezeigt. (c) *E. coli* Trx1 (PDB 1xob). Die reaktiven Cysteinreste und die konservierten Reste Ile75 und Pro76 sind als Stäbchen dargestellt. Die Strukturen in (a-c) sind anhand der Position des katalytischen Cystein und der ersten Windung der nachfolgenden C-terminalen Helix ausgerichtet. (d) Überlagerung der Strukturen von *EcGrx1<sup>C14S</sup>-GSH* (1grx, helle Farbschattierung) und *CfTpxII<sup>C44S</sup>-N<sup>1</sup>-Gsp* (1i5g, dunkle Farbschattierung) für eine bessere Übersicht der Orientierung der Liganden (cyan) und der mit ihnen interagierenden Reste (blau). Die Strukturen sind anhand von Pro60 (*EcGrx1*) und Pro111 (*CfTpxII<sup>C44S</sup>*) ausgerichtet. Farbcodierung der Nicht-Kohlenstoff-Atome: gelb: Schwefel; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff.

#### 4.1.4 Die Komplexbildung aus Tpx und T(SH)<sub>2</sub> ist konzentrationsabhängig

Basierend auf den NMR-Daten von Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>C40S</sup> in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> konnte ein mögliches Bindemotiv von T(SH)<sub>2</sub> an Tpx postuliert werden. Neben dieser Information wurde auch ein interessanter konzentrationsabhängiger Effekt während der Titration von Tpx mit T(SH)<sub>2</sub> beobachtet (Abbildung 3-6). So nahmen die Intensitäten von NH-Resonanzen bereits bei einem molaren Verhältnis von 1:0,5 Tpx:T(SH)<sub>2</sub> in den <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> ab und konnten bei einem 1:1 Verhältnis nicht mehr detektiert werden (Abbildung 3-6b). Dieses Verhalten war für einen kovalenten 1:1-Komplex zu erwarten. Unerwartet war jedoch, dass NH-Resonanzen, welche Unterschiede in den chemischen Verschiebungen zwischen oxidiertem und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenem Zustand aufwiesen, auch bei Verhältnissen von 1:4 und 1:8 Tpx:T(SH)<sub>2</sub> weiter migrierten ohne, dass der daraus resultierende Kurvenverlauf eine Sättigung erkennen ließ (Abbildung 3-6a). Die Beobachtung lässt vermuten, dass zusätzlich zur Bildung des kovalenten Komplexes eine konzentrationsabhängige Interaktion zwischen Tpx und T(SH)<sub>2</sub> stattfindet.

Einem solchen Verhalten könnten verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass nach der kovalenten Bindung von T(SH)<sub>2</sub> an Cys40 in Tpx, ein zweites T(SH)<sub>2</sub> an Cys43 bindet. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass die Seitenkette von Cys43 stärker im Protein verborgen ist als die Seitenkette von Cys40 und somit die Bindung eines zweiten T(SH)<sub>2</sub> sterisch gehindert wäre (siehe Abbildung 4-1). Die sterische Hinderung wird durch das an Cys40 gebundene erste T(SH)<sub>2</sub> zusätzlich erschwert.

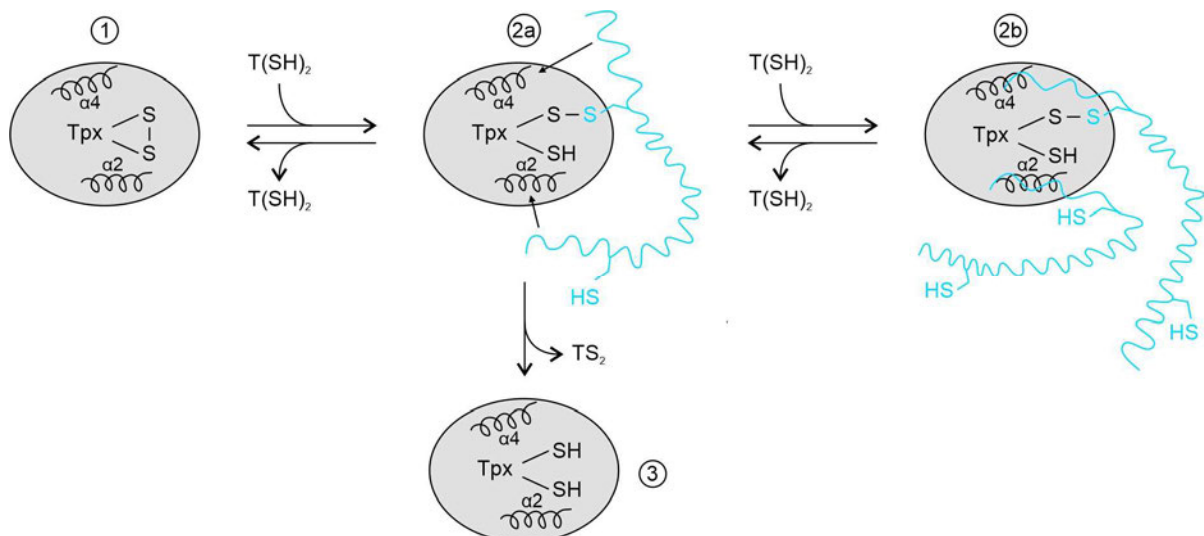


Abbildung 4-5 Graphische Darstellung eines möglichen Mechanismus der konzentrationsabhängigen Komplexbildung von Tpx und T(SH)<sub>2</sub>. Oxidiertes Tpx (1) bildet mit T(SH)<sub>2</sub> einen kovalenten 1:1-Komplex (2a). Mit zunehmender T(SH)<sub>2</sub>-Konzentration kommt es zu der Interaktion eines zweiten T(SH)<sub>2</sub> möglicherweise mit der α2-Helix in Tpx (2b). Der Zerfall des Tpx-Trypanothion-Komplex in 2a führt zu reduziertem Tpx und Trypanothiondisulfid (TS<sub>2</sub>) (3) oder zu einer Rückkehr in den oxidierten Zustand des Proteins (1) (siehe auch Kapitel 4.1.5).

Eine weitere Hypothese wäre eine nicht-kovalente Bindestelle für ein zweites T(SH)<sub>2</sub> an Tpx. Es könnte durch die Erhöhung der T(SH)<sub>2</sub>-Konzentration nach der Bildung des kovalenten Komplexes bei einem 1:1 Tpx:T(SH)<sub>2</sub> Verhältnis zu einer Wechselwirkung mit einem weiteren T(SH)<sub>2</sub>-Molekül mit Tpx kommen (Abbildung 4-5 (2b)). Eine mögliche Bindestelle für ein zweites T(SH)<sub>2</sub> könnte die α2-Helix darstellen. Möglicherweise führt diese Interaktion zu einer „engeren“ Wechselwirkung eines Glutathionylarms des kovalent gebundenen Trypanothions mit der α4-Helix in Tpx. Für diese

Hypothese sprechen auch die NMR-Daten für Tpx<sup>C40S</sup> in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub>, welche ebenfalls eine T(SH)<sub>2</sub>-konzentrationsabhängige Veränderung der chemischen Verschiebung von Aminosäuren der  $\alpha$ 2-Helix zeigen. Des Weiteren weisen die NMR-Daten von Tpx<sup>C40S</sup> auf einen geringeren Einfluss von T(SH)<sub>2</sub> auf die chemische Umgebung von Aminosäuren der  $\alpha$ 4-Helix hin als dies für Tpx<sup>WT</sup> in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> beobachtet werden konnte. Vergleichbare Erkenntnisse wie für Tpx<sup>C40S</sup> lieferten auch NMR-Studien von Krumme et al., welche CfTpxI mit einem redox-inaktiven Trypanothion-Derivat N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis( $\gamma$ -Glu-Ala-Gly)spermidin titrierten.<sup>[110]</sup> In diesen Experimenten konnte wie für Tpx<sup>C40S</sup> kein kovalenter Komplex ausgebildet werden. Krumme et al. beschrieben ebenfalls eine Veränderung der chemischen Verschiebung in  $\alpha$ 2-Helix und konnten keine Veränderungen in der  $\alpha$ 4-Helix detektieren.<sup>[110]</sup>

Um die konzentrationsabhängige Komplexbildung von Tpx und T(SH)<sub>2</sub> weiter zu untersuchen, wären die nächsten möglichen Schritte eine Wiederholung der T(SH)<sub>2</sub>-Titration von Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>C40S</sup> mit höheren T(SH)<sub>2</sub>-Konzentrationen als in dieser Arbeit verwendet wurden. So könnte festgestellt werden, welche T(SH)<sub>2</sub>-Konzentration benötigt wird, um eine Sättigung des nicht-kovalenten Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes zu erreichen und eine Dissoziationskonstante ermittelt werden. Um herauszufinden, ob es zu einem zweiten Bindeereignis von T(SH)<sub>2</sub> an Tpx kommt, könnte eine Untersuchung mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) durchgeführt werden. Bindet ein zweites T(SH)<sub>2</sub> an Tpx, sollte dies bei einer Titration von Tpx mit T(SH)<sub>2</sub> in der ITC zu einem zweiten Wendepunkt in der Hitzesignatur führen. Eine weitere Möglichkeit wären Untersuchungen mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (engl. *small-angle X-ray scattering*, SAXS) oder Mehrwinkel-Lichtstreuung gekoppelt mit einer Größenausschlusschromatographie (engl. *size exclusion chromatographie multi angle light scattering*, SEC-MALS). Beide Methoden können Aufschluss über die Größe von Tpx in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> und somit über die Stöchiometrie des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes geben. Um festzustellen, ob T(SH)<sub>2</sub> in höheren Konzentrationen sowohl an Cys40 als auch an Cys43 in Tpx bindet, könnte ein massenspektrometrisches Experiment durchgeführt werden. Ob die  $\alpha$ 2-Helix in Tpx eine mögliche nicht-kovalente Bindestelle für ein zweites T(SH)<sub>2</sub>-Molekül darstellt, könnte ebenfalls NMR-spektroskopisch untersucht werden. Hierfür könnte <sup>15</sup>N-Tpx<sup>WT</sup> mit GSH gesättigt, freies GSH über eine SEC abgetrennt (falls die Stabilität des Komplexes es zulässt) und der Tpx-GSH-Komplex mit GSH, T(SH)<sub>2</sub> oder Spermidin titriert werden. Wie in Kapitel 4.1.3 diskutiert, könnte GSH ähnlich wie N<sup>1</sup>-Gsp mit der  $\alpha$ 4-Helix in Tpx interagieren. In den NMR-Spektren des Tpx-GSH-Komplexes wäre dann eine Veränderung der chemischen Verschiebungen der  $\alpha$ 4-Helix zu erwarten. Zusätzliche Effekte auf NH-Resonanzen durch die Titration mit GSH, T(SH)<sub>2</sub> oder Spermidin könnten dann Aufschluss auf eine nicht-kovalente Bindestelle geben.

#### 4.1.5 Die Lebensdauer des isolierten Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Intermediats ist länger als erwartet

Unter physiologischen Bedingungen muss die Entgiftung von Hydroperoxiden in der Zelle sehr schnell ablaufen, um Schädigungen und den darauffolgenden Zelltod zu verhindern. Dies erfolgt *in vitro* mit Geschwindigkeitskonstanten zwischen  $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für die einzelnen katalytischen Schritte der trypanosomalen Peroxid-Entgiftungs-Kaskade.<sup>[98]</sup> Die Reaktion von Tpx mit T(SH)<sub>2</sub> hat in Anwesenheit der vollständigen Peroxid-Entgiftungs-Kaskade eine Wechselzahl von  $392 \text{ min}^{-1}$  und das Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Intermediat somit eine maximale Lebensdauer von 0,15 s.<sup>[72]</sup> Da der Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex über die Dauer einer NMR-Messung von ~20 min stabil war, ist die Lebensdauer

des isolierten Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes länger, als die Wechselzahl der Reaktion im gekoppelten Px-Assay erwarten ließ.

Für die Bestimmung der Halbwertszeit des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes wurden über einen Zeitraum von 11,25 h 15 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC-Spektren des Tpx<sup>WT</sup> in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> in Serie aufgenommen. Es wurden die Integrale oder die Unterschiede der chemischen Verschiebung von einzelnen NH-Resonanzen über die Zeit bestimmt. Die Ergebnisse aus beiden Analysen wurden gegen die Zeit aufgetragen und Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  von 2,7 h bis 6,7 h für den Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex erhalten. Es ist unerwartet, dass sich die gemessenen Halbwertszeiten für die NH-Resonanzen der einzelnen Aminosäuren um bis zu 4 h unterscheiden. Da es sich bei Tpx-T(SH)<sub>2</sub> um einen 1:1 Komplex handelt, wäre zu erwarten, dass die Halbwertszeiten, welche für die NH-Resonanzen einzelner Aminosäuren bestimmt wurden, ähnlicher zueinander sind und innerhalb des Fehlers liegen. Die geringsten Halbwertszeiten wurden für NH-Resonanzen von Aminosäuren bestimmt, welche nicht in direktem Kontakt mit Cys40 stehen, wie die der Aminosäuren Trp70, Ile109 und Ala127 (Abbildung 4-6a). Die längsten Halbwertszeiten des Komplexes wurden für die Integrale der NH-Resonanzen von Cys43 und Ala37 bestimmt. Dies lässt vermuten, dass der Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex zusätzlich zur kovalenten Bindung auch ein nicht-kovalentes Bindeereignis beinhaltet. In Kapitel 4.1.4 wurde für die Komplexbildung von Tpx und T(SH)<sub>2</sub> die Hypothese aufgestellt, dass es neben der Bildung der kovalenten Bindung von T(SH)<sub>2</sub> an Tpx auch zu einer T(SH)<sub>2</sub>-konzentrationsabhängigen nicht-kovalenten Interaktion kommt (Abbildung 4-5). Diese Annahme könnte auch auf die Dissoziation von Tpx und Trypanothion übertragen werden. Es könnte bei dem verwendeten 1:1,5 Tpx:T(SH)<sub>2</sub> Verhältnis eine nicht-kovalente Anlagerung eines zweiten T(SH)<sub>2</sub> an Tpx erfolgen (Abbildung 4-5 (2b)). Da die Aufnahme der NMR-Spektren von Tpx in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> in Serie nicht unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt wurde, könnte es durch Luft-Sauerstoff zu einer Oxidation von T(SH)<sub>2</sub> zu Trypanothiondisulfid (TS<sub>2</sub>) gekommen sein. Daher sinkt die Konzentration von T(SH)<sub>2</sub> in der Lösung über die Zeit und die nicht-kovalente Interaktion eines zweiten T(SH)<sub>2</sub> an Tpx entfällt (Abbildung 4-5 (2a)). Durch die abnehmende nicht-kovalente Bindung eines zweiten T(SH)<sub>2</sub> an Tpx, migrieren die NH-Resonanzen von Resten die Effekte durch die nicht-kovalente Bindung erfahren, wie z. B. Aminosäuren der  $\alpha$ 4- und  $\alpha$ 2-Helix. Dies könnte die kürzeren Halbwertszeiten des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes erklären, welche anhand von NH-Resonanzen bestimmt wurden, deren Aminosäuren nicht im direkten Kontakt mit dem aktiven Zentrum stehen. Sinkt die Konzentration von T(SH)<sub>2</sub> durch die Oxidation durch Luft-Sauerstoff weiter, kommt es durch die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen T(SH)<sub>2</sub> und TS<sub>2</sub> hin zu TS<sub>2</sub> zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen dem Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex und freiem Tpx hin zu freiem Tpx (Abbildung 4-5 (1)). Die längsten Halbwertszeiten des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes wurden mit Hilfe von NH-Resonanzen der Aminosäuren nahe und im aktiven Zentrum ermittelt. Dieser Bereich in Tpx steht am längsten im Kontakt mit Trypanothion.

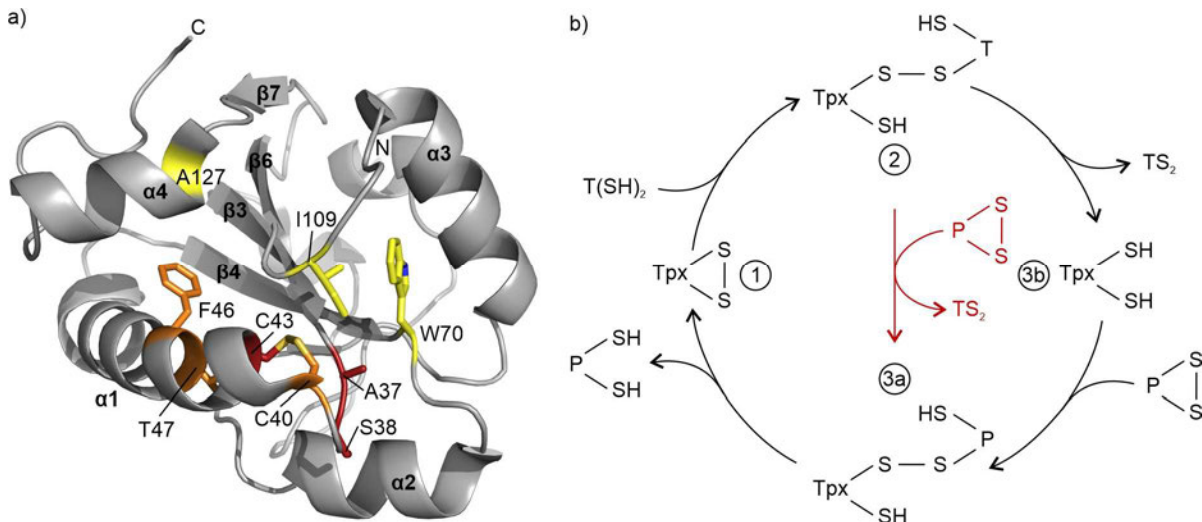


Abbildung 4-6 (a) Visualisierung der unterschiedlichen Halbwertszeiten des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes, bestimmt anhand der chemischen Verschiebungen oder Intensitäten der NH-Resonanzen einzelner Aminosäuren, welche als Stäbchen hervorgehoben sind. Reste deren Veränderungen der NH-Resonanzen kurze Halbwertszeiten zwischen 2,7 h und 3,7 h lieferten sind gelb eingefärbt, mittlere Halbwertszeiten zwischen 4,6 h und 5,5 h sind orange und lange Halbwertszeiten zwischen 5,7 h und 6,7 h sind rot eingefärbt. Farbcodierung der Nicht-Kohlenstoff-Atome: gelb: Schwefel; blau: Stickstoff. (b) Modifizierung des katalytischen Zyklus von Tpx basierend auf den Daten aus dieser Dissertation. T(SH)<sub>2</sub> bindet an oxidiertes Tpx (1) und es wird eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen Tpx und T(SH)<sub>2</sub> gebildet (2). Das Zielprotein erkennt den Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex, verdrängt T(SH)<sub>2</sub> und bindet an Cys40 in Tpx (3a). Freies reduziertertes Tpx (3b) liegt in der Zelle somit nur zwischen dem Verdrängen von T(SH)<sub>2</sub> und der Bindung des Zielproteins vor.

Die NH-Resonanzen von Tpx<sup>WT</sup> nahmen nach Zugabe von T(SH)<sub>2</sub> die aus vorherigen NMR-Messungen erwarteten Positionen für den Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex ein. Interessanterweise migrierten die Resonanzen über die Zeit in Richtung der chemischen Verschiebungen des oxidierten Zustands und entsprachen nach 11,25 h dem anfänglichen oxidierten Zustand von Tpx<sup>WT</sup>. Die NH-Resonanzen nahmen zu keinem Zeitpunkt dieses Experiments Positionen ein, die zuvor dem reduzierten Zustand zugeordnet wurden (Abbildung 3-13). Für NMR-Experimente, deren vorläufige Ergebnisse in dieser Arbeit aufgrund von Unvollständigkeit nicht gezeigt werden, wurde Tpx mit TCEP reduziert, das Reduktionsmittel mittels SEC abgetrennt und NMR-Spektren aufgenommen. Die chemische Verschiebung der Resonanzen dieser NMR-Spektren entsprachen dem zuvor zugeordneten reduzierten Zustand von Tpx. Dies zeigt, dass der reduzierte Zustand von Tpx (allerdings durch TCEP herbeigeführt) für die Dauer der SEC sowie anschließender Aufnahme der NMR-Spektren stabil war. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der reduzierte Zustand von Tpx auch in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> NMR-spektroskopisch detektiert worden wäre, wenn er sich zwischenzeitlich eingestellt hätte. Dies lässt vermuten, dass während der Aufnahme der NMR-Spektren von Tpx in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> keine Übertragung von Elektronen von T(SH)<sub>2</sub> auf Tpx stattfand. Tpx und T(SH)<sub>2</sub> haben annähernd die gleichen pK-Werte und Redoxpotentiale. In früheren Veröffentlichungen wurde angenommen, dass der Elektronenfluss durch das Konzentrationsgefälle von T(SH)<sub>2</sub> zu Tpx getrieben wird.<sup>[104]</sup> In der Blutstromform von *T. brucei brucei* liegen Tpx und T(SH)<sub>2</sub> in einem molaren Verhältnis von ca. 1:3 bis zu 1:7 vor. Es wurden in dieser Arbeit NMR-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> mit T(SH)<sub>2</sub> in molaren Verhältnissen von 1:0,5 bis zu 1:8 aufgenommen, allerdings waren die absoluten Konzentrationen in den NMR-Messungen 3 - 7-fach höher als in der Zelle (Abbildung 3-5; Tabelle 2-3). Dies lässt vermuten, dass die höhere Konzentration von T(SH)<sub>2</sub> im Vergleich zu Tpx nicht ausschließlich die treibende Kraft der Dissoziation des Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplexes und des Elektronenflusses von T(SH)<sub>2</sub> auf

Tpx in der Zelle oder *in vitro* im gekoppelten Px-Assay ist. Ein alternativer Mechanismus wäre, dass T(SH)<sub>2</sub> durch ein Zielprotein z. B. der Peroxidase aus dem Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex verdrängt wird. Dies setzt jedoch voraus, dass die Zielproteine auch den Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex erkennen.

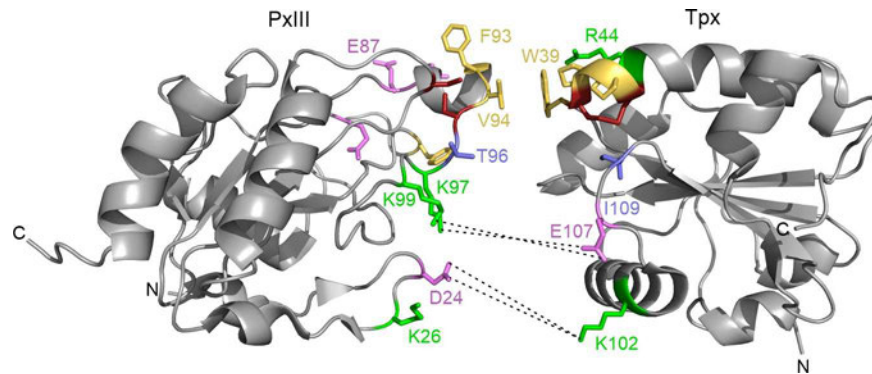


Abbildung 4-7 Intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Tpx und PxlIII. Die intermolekularen Kontaktpunkte zwischen Tpx (PDB 1o73) und PxlIII (PDB 2rm6) wurden durch Docking-Studien ermittelt<sup>[160]</sup> und sind als Stäbchen hervorgehoben. Mögliche Interaktionspunkte sind Salzbrücken (Lys97 und Lys99 in PxlIII mit Glu107 in Tpx; Asp24 in PxlIII mit Lys102 in Tpx; Glu83, Glu87 und Glu88 in PxlIII mit Arg44 in Tpx; negativ geladene Reste: rosa; positiv geladene Reste: grün), Wasserstoffbrückenbindungen (Thr96 in PxlIII mit Ile109 in Tpx; blau) und hydrophobe Wechselwirkungen (Phe79, Phe93 und Val94 in PxlIII mit Trp39, Pro41 und Pro42 in Tpx; gelb). Die Cysteine sind rot eingefärbt. Potenzielle Interaktionspunkte, die auch zwischen PxlIII und dem Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex ausgebildet werden könnten, sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Modifiziert nach Melchers et al., 2008.<sup>[160]</sup>

Melchers et al. publizierten 2008 ein Modell des Komplexes aus Tpx und PxlIII basierend auf den Strukturen der isolierten Proteine<sup>[106,160]</sup> und anschließendem Docking (Abbildung 4-7).<sup>[160]</sup> Im T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand, in Annahme der in dieser Arbeit mittels NMR bestimmten Bindestelle, wären die Reste der Aminosäuren Trp39, Pro41, Pro42, Arg44 und Ile109 in Tpx nicht zugänglich für eine Interaktion mit PxlIII. Es könnten allerdings die Seitenketten von Lys102 und Glu107 in Tpx mit Asp24, Lys97 und Lys99 in PxlIII Salzbrücken ausbilden. Die Aktivitäten von Tpx-Einzelmutanten der Reste Lys102 und Glu107, welche für die Untersuchung der Rolle der intermolekularen Protein-Protein-Interaktion für die Dimerformation des Tpx-CFT-Komplexes generiert wurden (Kapitel 3.2.4; Abbildung 3-30), lassen zum Teil jedoch etwas anderes vermuten. Die im gekoppelten Px-Assay ermittelten Aktivitäten betragen 124,0% ± 2,2% für Tpx<sup>K102A</sup>, 159,6% ± 12,2% für Tpx<sup>K102E</sup>, 55,1% ± 2,1 für Tpx<sup>E107A</sup> und 46,5% ± 4,6% für Tpx<sup>E107K</sup>. Die erhöhten Aktivitäten von Tpx<sup>K102A</sup> und Tpx<sup>K102E</sup> im Vergleich zu Tpx<sup>WT</sup> deuten darauf hin, dass die Salzbrücke zwischen Lys102 in Tpx und Asp24 in PxlIII keine essenzielle Wechselwirkung für eine Interaktion zwischen Tpx und PxlIII ist. Im Gegenteil, die Substitution von Lys102 gegen eine neutrale Seitenkette wie in Tpx<sup>K102A</sup> oder einen negativ geladenen Rest wie in Tpx<sup>K102E</sup> scheint die Interaktion zwischen Tpx und PxlIII sowie die damit verbundene Aktivität der Kaskade zu fördern. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die positiv geladenen Reste Lys102 in Tpx und Lys26 in PxlIII sich gegenseitig abstoßen (Abbildung 4-7). Durch die Einführung eines negativen Rests an Position 102 in Tpx kann eine Salzbrücke zwischen Glu102 in Tpx<sup>K102E</sup> und Lys26 in PxlIII ausgebildet werden. Die verringerten Aktivitäten von Tpx<sup>E107A</sup> und Tpx<sup>E107K</sup> im Vergleich zu Tpx<sup>WT</sup> lassen vermuten, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen von Glu107 in Tpx mit Lys97 und Lys99 bedeutend für die Interaktion zwischen Tpx und PxlIII sind.

Neben den Salzbrücken zwischen Tpx und PxIII könnte es zu einer hydrophoben Interaktion zwischen Trypanothion und Phe93 sowie Val94 in PxIII kommen. PxIII könnte somit den Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex erkennen, Salzbrücken mit Tpx bilden und Trypanothion aus dem Komplex verdrängen (Abbildung 4-6b). Freies, reduziertes Tpx würde in diesem Modell nur für einen kurzen Moment in der Zelle existieren - zwischen dem, in dem die Peroxidase T(SH)<sub>2</sub> aus der Bindung mit Cys40 verdrängt und der erneuten Bindung von Tpx Cys40 an die Peroxidase<sup>[108]</sup>. Ist dieser Mechanismus des Verdrängens von TS<sub>2</sub> aus dem Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex real, stellt auch die lange Lebensdauer des Komplexes keinen Nachteil für die Zelle dar. Der Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex wäre eine Art „reduzierte“ Speicherform von Tpx und die Zelle könnte somit schnell auf Peroxide reagieren.

Um zu überprüfen, ob es zu einer Oxidation von T(SH)<sub>2</sub> durch Luft-Sauerstoff kommt und die Geschwindigkeit der Oxidation zeitlich mit den für den Tpx-T(SH)<sub>2</sub>-Komplex bestimmten Halbwertszeiten korreliert, könnte die gleiche Konzentration von T(SH)<sub>2</sub>, wie in den NMR-Messungen von Tpx mit T(SH)<sub>2</sub> in Serie, in NMR-Puffer vorgelegt werden und in 45 min Intervallen mit Ellmanns-Reagenz der Thiolgehalt der Probe bestimmt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die wiederholte Aufnahme von NMR-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> mit T(SH)<sub>2</sub> in Serie mit verschiedenen T(SH)<sub>2</sub>-Konzentrationen. Findet die Dissoziation von Tpx und T(SH)<sub>2</sub> nur aufgrund der Oxidation von T(SH)<sub>2</sub> durch Luft-Sauerstoff statt, sollten ähnliche sigmoidale Kurven wie für das 1:1,5 molare Verhältnis Tpx:T(SH)<sub>2</sub> zu beobachten sein, jedoch mit einer zeitlichen Verschiebung. Ob es zu einem Verdrängen des T(SH)<sub>2</sub> durch PxIII aus dem Komplex mit Tpx kommt, könnte ebenfalls NMR-spektroskopisch untersucht werden. Zu <sup>15</sup>N-markiertem Tpx kann im ersten Schritt T(SH)<sub>2</sub> und im zweiten Schritt PxIII hinzugegeben werden und von jedem Schritt ein NMR-Spektrum aufgenommen werden. Kann die Peroxidase TS<sub>2</sub> aus dem Komplex mit Tpx verdrängen, sollten die NH-Resonanzen von Tpx in dem NMR-Spektrum des zweiten Schritts entweder die Positionen des oxidierten Zustands einnehmen oder den PxIII-gebundenen Zustand von Tpx repräsentieren.

#### 4.1.6 Die Tryptophanreste des Tpx sind essenziell für seine korrekte Faltung und die Interaktion mit T(SH)<sub>2</sub>

Tryparedoxin unterscheidet sich von den verwandten Oxidoreduktasen Thioredoxin (Trx) und Glutaredoxin (Grx) unter anderem durch drei hoch konservierte Tryptophanreste, Trp70, Trp86 und Trp142. Des Weiteren kommt ein vierter hoch konservierter Tryptophanrest Trp39 in Tpx nur bedingt in Trx oder Grx vor (Abbildung 3-14). Um den Einfluss der Tryptophanreste auf die Struktur zu untersuchen, wurden sie einzeln zu Alanin mutiert und die strukturelle Integrität der jeweiligen Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten untersucht. Außerdem wurde die Fähigkeit der Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten ihren Redox-Zustand zu verändern und mit T(SH)<sub>2</sub> zu interagieren NMR-spektroskopisch betrachtet. Im Folgenden wird die Rolle der Tryptophanreste in *T. brucei* Tpx für dessen Struktur und die Interaktion mit T(SH)<sub>2</sub> diskutiert.

Wie in Kapitel 1.5 eingeführt, unterscheidet sich die Kristallstruktur von *T. brucei* Tpx (PDB 1o73) von anderen Kristall- und NMR-Strukturen von *C. fasciculata* oder *L. major* Tpx in der Orientierung der Seitenkette von Trp39 (Abbildung 1-10a). Die Seitenkette von Trp39 bildet in der Kristallstruktur von *T. brucei* Tpx einen Kristallkontakt zur benachbarten Kette, daher handelt es sich bei der Orientierung von Trp39 vermutlich um ein Artefakt. In allen weiteren verfügbaren Tpx-Strukturen steht Trp39 intramolekular in Wechselwirkung mit Trp70 und weiteren Resten in Tpx. Daher wurde repräsentativ

eine Kristallstruktur von CfTpxI (PDB 1ezk) verwendet, um eine Hypothese zu generieren, welche Rolle Trp39 für die Struktur und Aktivität hat.

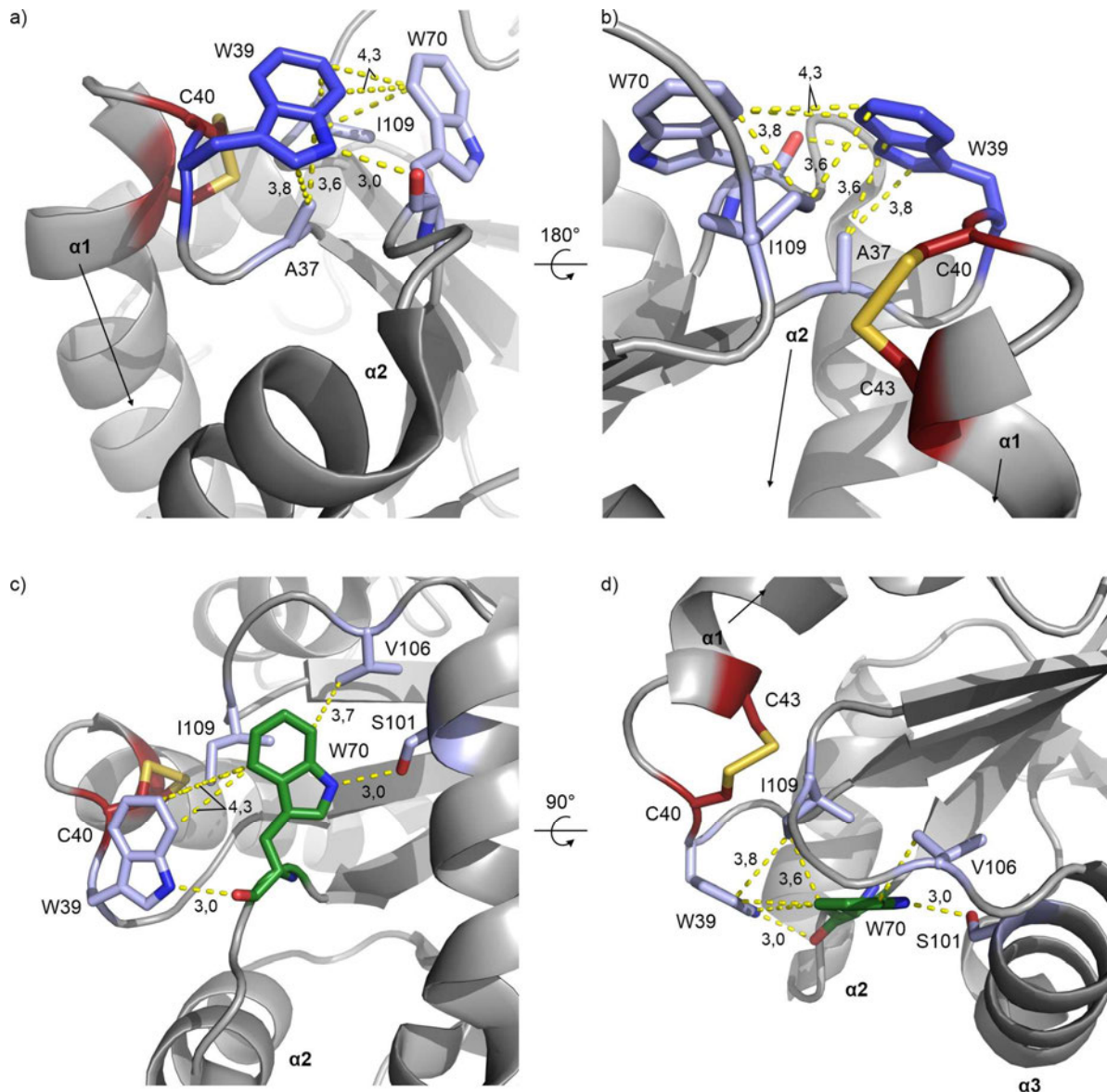


Abbildung 4-8 Wechselwirkungen von Trp39 und Trp70 in *C. fasciculata* TpxI (PDB 1ezk). (a) und (b) Der Ausschnitt der Kristallstruktur zeigt die Disulfidbindung der Cysteinreste (rot) und Aminosäuren (hellblau), die in Wechselwirkung mit Trp39 (blau) stehen als Stäbchen. (c) und (d) Darstellung der Wechselwirkungen von Trp70 (grün) mit Aminosäuren in der Nähe (hellblau) als Stäbchen. Abstände sind gelb gestrichelt eingezeichnet (Entfernung in Å). Farbcodierung der Nicht-Kohlenstoff-Atome: gelb: Schwefel; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff.

Trp39 und Trp70 stehen in engem Kontakt zueinander und bilden einen „Tryptophan-Deckel“ über dem aktiven Zentrum von Tpx (Abbildung 4-8).<sup>[105]</sup> Zwischen den Benzo-Ringen der Indol-Seitenketten von Trp39 und Trp70 bestehen hydrophobe Wechselwirkungen sowie eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem N $\epsilon$ -Amid von Trp39 und dem Carbonylsauerstoff des Proteinrückgrats von Trp70 (Abbildung 4-8). Der Benzo-Ring von Trp39 bildet eine CH- $\pi$ -Interaktion mit der Seitenkette von Ile109 sowie mit der Seitenkette von Ala37 aus. Vermutlich handelt es sich bei der Interaktion der Seitenkette von Ile109 um eine schwache CH- $\pi$ -Interaktion, da die Entfernung vom Kohlenstoff des Wasserstoffdonors bis zum nächsten Kohlenstoff des Benzols der Indol-Seitenkette 3,8 Å beträgt und die Entfernung zu dem weitesten Kohlenstoff des Benzols der Indol-Seitenkette 5,3 Å (PDB 1ezk). Für CH-

$\pi$ -Interaktionen sollte der Abstand zwischen dem Kohlenstoff des Wasserstoffdonors bis zur Ringfläche kleiner als 4,3 Å sein.<sup>[161]</sup> Dies trifft auf die CH- $\pi$ -Interaktion zwischen dem Pyrrol der Indol-Seitenkette von Trp39 und Ala37 zu, da der Kohlenstoff des Wasserstoffdonors von Ala37 einen Abstand von 3,6 Å zum nächsten Kohlenstoffatom des Pyrrol und 4,2 Å zum am weitesten entfernten Kohlenstoff hat (PDB 1ezk). Außerdem interagiert Trp70 über eine Wasserstoffbrückenbindung des N $\epsilon$ -Amids der Seitenkette mit der Hydroxygruppe des Ser101 und über eine hydrophobe Interaktion mit Val106 und Ile109. Die NH-Resonanzen des Proteinrückgrats und der Seitenkette von Trp39 und Trp70 in Tpx<sup>WT</sup> verändern beim Wechsel des Redox-Zustands und in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> ihre Position (Abbildung 3-1; Abbildung 3-7). Dies entspricht den Erwartungen, da beide Aminosäuren strukturell sehr nah am aktiven Zentrum sind. Bemerkenswert ist an dieser Stelle, dass Trp39 und Trp70 im Vergleich zu anderen Aminosäuren nahe des aktiven Zentrums geringe Unterschiede der chemischen Verschiebung  $\Delta\delta$  bei der Veränderung vom oxidierten zum reduzierten Zustand zeigen. Dies ist für Trp39 auch bei den Unterschieden der chemischen Verschiebungen zwischen reduziertem und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenem Zustand zu beobachten. Im Gegensatz zu anderen Aminosäuren im aktiven Zentrum ist keine Veränderung der Dynamik im <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-hetNOE von Trp39 zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand zu erkennen. Trp39 ist neben der Interaktion mit Trp70 in einem hydrophoben Netzwerk mit Ile109 und Ala37 eingebettet. Dies führt vermutlich zu einer Stabilisierung und gewissen Fixierung, wodurch Einflüsse wie der Wechsel des Redox-Zustands oder die Bindung von T(SH)<sub>2</sub> eine geringere Veränderung der chemischen Umgebung im Vergleich zu den umliegenden Aminosäuren bewirken. Daher verändert sich auch die Dynamik von Trp39 zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand nicht.

Die einzelnen Mutationen von Trp39 und Trp70 zu Alanin führen zu keinem Verlust der strukturellen Integrität von Tpx, wie in den CD-Spektren, den SEC-Läufen und den Gyrationradien basierend auf SAXS-Messungen im Vergleich zu Tpx<sup>WT</sup> zu erkennen ist (Abbildung 3-15). Allerdings weist die Tpx<sup>W39A</sup>-Mutante im gekoppelten Aktivitätsassay fast keine Aktivität mehr auf. Die Tpx<sup>W70A</sup>-Mutante hat noch eine Restaktivität von  $21,6 \pm 1,9\%$  relativ zu Tpx<sup>WT</sup>. Die Aufnahmen von <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektren beider Tpx<sup>W/A</sup>-Mutanten im oxidierten und reduzierten Zustand zeigen, dass beide Mutanten noch in der Lage sind, ihre Redox-Zustände zu verändern (Abbildung 3-16). Da es durch die Zugabe von T(SH)<sub>2</sub> zu keinen Veränderungen der chemischen Verschiebungen in den HSQC-Spektren von Tpx<sup>W39A</sup> kommt, scheint Tpx<sup>W39A</sup> nicht mehr mit T(SH)<sub>2</sub> zu interagieren (Abbildung 3-16). Die geringen Unterschiede der NH-Resonanzen in den HSQC-Spektren von Tpx<sup>W70A</sup> bei Titration mit T(SH)<sub>2</sub> lassen vermuten, dass hier eine verminderte Bindung stattfindet. Die Mutation von Trp39 zu Alanin scheint somit die größeren Auswirkungen auf die Aktivität im gekoppelten Px-Assay und die Interaktion mit T(SH)<sub>2</sub> zu haben als die Mutation von Trp70 zu Alanin. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die beiden Tryptophanreste jeweils verantwortlich sind für die Orientierung des anderen Tryptophanrests und diesen in die für die Tpx-Aktivität erforderliche Position bringt. Das heißt, die Interaktion der Indol-Seitenkette von Trp39 mit Trp70 könnte einen Einfluss auf die Orientierung von Trp70 haben. Das Fehlen dieser Interaktion könnte zu zwei möglichen Positionsveränderungen von Trp70 führen: i) Durch das Fehlen der sowohl hydrophoben als auch polaren attraktiven Wechselwirkungen kommt es zu einer größeren Entfernung der Indol-Seitenkette von Trp70 zum aktiven Zentrum; ii) Durch die fehlende Raumerfüllung durch Trp39 nähert sich die Indol-Seitenkette von Trp70 stärker dem aktiven Zentrum an. Beide Veränderungen könnten zu einer minimalen, jedoch entscheidenden Veränderung der Position der Schleife N-terminal zu  $\alpha$ 2-Helix (Asp71 und Glu72) und der Helix selbst führen (Abbildung 4-2c). Diese Annahme wird durch den Vergleich der chemischen Verschiebungen der NH-Resonanzen von Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>W39A</sup> bekräftigt. Es konnten Veränderungen sowohl für Trp70 als auch

im Bereich dieser Helix beobachtet werden (Abbildung 3-17). Wie in Kapitel 4.1.3 postuliert, ist die N-terminale Schleife von  $\alpha 2$ -Helix und die  $\alpha 2$ -Helix selbst vermutlich Teil des T(SH)<sub>2</sub>-Bindemotivs und eine veränderte Orientierung dieses Bereiches in Tpx<sup>W39A</sup> könnte die gestörte Interaktion mit T(SH)<sub>2</sub> verursachen. Um zu überprüfen, ob ein aromatischer Rest an Position 39 ausreichend für eine Tpx-Aktivität vergleichbar mit Tpx<sup>WT</sup> ist, wurden Phenylalanin- und Tyrosin-Mutanten von Trp39, Tpx<sup>W39F</sup> und Tpx<sup>W39Y</sup>, generiert. Tpx<sup>W39F</sup> und Tpx<sup>W39Y</sup> weisen ebenso wie Tpx<sup>W39A</sup> keine Veränderungen ihrer strukturellen Integrität auf (Anhang Abbildung 6-8). Die Aktivitäten von Tpx<sup>W39F</sup> (19,4% ± 1,5%) und Tpx<sup>W39Y</sup> (24,2% ± 2,2%) entsprechen ungefähr der Aktivität von Tpx<sup>W70A</sup> (21,6 ± 1,9%). Aufgrund der aromatischen Seitenkette an Position 39 der Primärstruktur des Proteins, können die hydrophoben Wechselwirkungen zu Trp70 ausgebildet werden, allerdings nicht die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem N $\epsilon$ -Amid von Trp39 und der Carbonylgruppe des Proteinrückgrats von Trp70. Durch die hydrophobe Interaktion von Phe39 oder Tyr39 mit Trp70 kommt es somit zu einem Anstieg der Aktivität, auch wenn das Aktivitätslevel des Wildtyp nicht erreicht wird. Die Wechselwirkung von Tpx<sup>W39F</sup> und Tpx<sup>W39Y</sup> mit T(SH)<sub>2</sub> ist vermutlich ähnlich der Wechselwirkung von Tpx<sup>W70A</sup> mit T(SH)<sub>2</sub> beeinträchtigt.

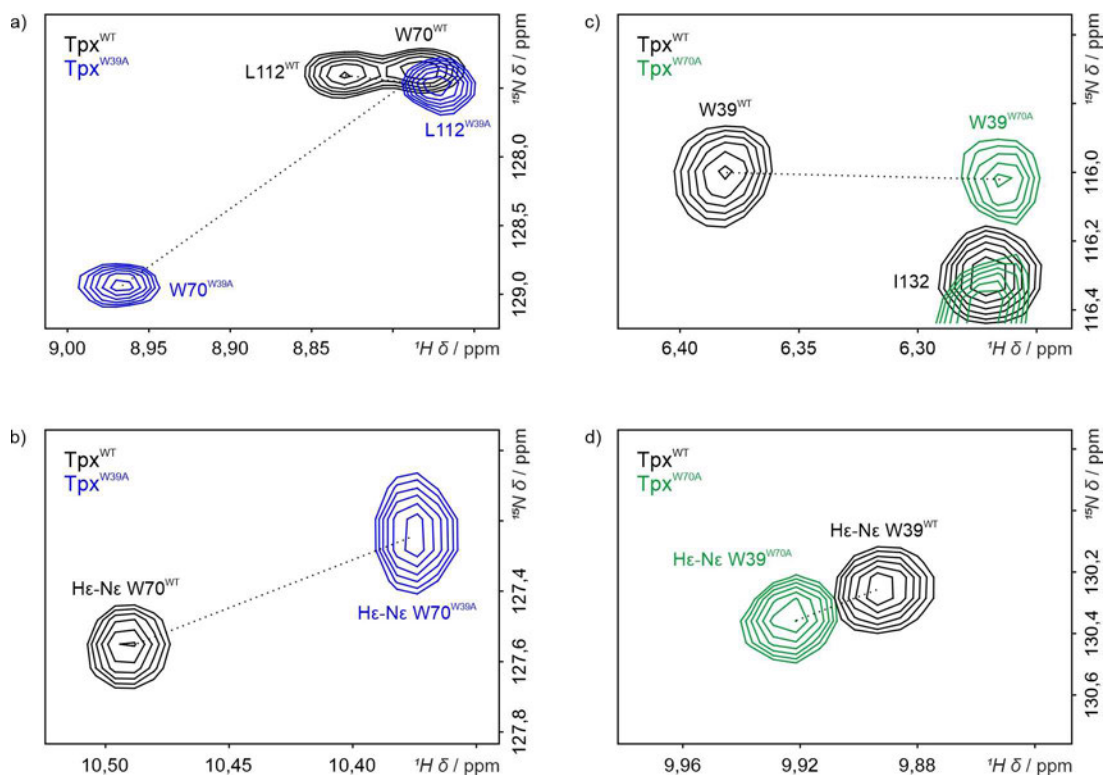


Abbildung 4-9 Ausschnitte der <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektren von Tpx<sup>W39A</sup> und Tpx<sup>W70A</sup> mit Tpx<sup>WT</sup>. Darstellung der NH-Resonanz des Proteinrückgrats (a) und der Seitenkette (b) von Trp70 im Tpx<sup>WT</sup>- (schwarz) und Tpx<sup>W39A</sup>-Proteinhintergrund (blau) sowie NH-Verschiebung des Proteinrückgrats (c) und der Seitenkette (d) von Trp39 im Tpx<sup>WT</sup>- (schwarz) und Tpx<sup>W70A</sup>-Proteinhintergrund (grün).

Die NH-Resonanzen des Proteinrückgrats und der Seitenkette von Trp70 zeigten in Tpx<sup>W39A</sup> im Vergleich zu den Spektren des Tpx<sup>WT</sup> eine ausgeprägte Änderung der chemischen Verschiebung (Abbildung 4-9a und b). Daher wurden die Trp39 zugehörigen NH-Resonanzen des Proteinrückgrats und der Seitenkette auch im HSQC-Spektrum von Tpx<sup>W70A</sup> betrachtet. Obwohl keine allgemeine Zuordnung der Rückgrat-NH-Resonanzen von Tpx<sup>W70A</sup> durchgeführt wurde, sind die NH-Resonanzen von Trp39 trotzdem gut zuzuordnen, da sie deutlich von der Hauptpopulation der NH-Resonanzen separiert sind (Abbildung 3-1). Sowohl die NH-Resonanzen der Seitenkette von Trp39 als

auch das Proteinrückgrat zeigen deutliche Unterschiede in der chemischen Verschiebung im Tpx<sup>W70A</sup>-Proteinhintergrund im Vergleich zu Tpx<sup>WT</sup> (Abbildung 4-9c und d). Eine Mutation von Trp70 zu Alanin bewirkt den Verlust der hydrophoben Interaktion mit Trp39, allerdings kann die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem N $\epsilon$ -Amid von Trp39 und dem Carbonyl des Proteinrückgrats der Aminosäure an Position 70 weiter ausgebildet werden. Somit könnte in Tpx<sup>W70A</sup> eine Wechselwirkung zwischen Ala70 und der Schleife des aktiven Zentrums bestehen. Die gestörte Interaktion von Tpx<sup>W70A</sup> mit T(SH)<sub>2</sub> könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Indol-Seitenkette von Trp70 ein Teil des T(SH)<sub>2</sub>-Bindemotivs ist und das Fehlen der Indol-Seitenkette zu einer schwächeren Bindung von T(SH)<sub>2</sub> an Tpx führt. Diese Annahme beruht auch auf den Veränderungen der chemischen Verschiebung der NH-Resonanzen des Proteinrückgrats und der Seitenkette von Trp70 in Tpx<sup>WT</sup> in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> im Vergleich zum reduzierten Zustand. Für diese Annahme sprechen auch die Restaktivitäten von Phenylalanin- und Tyrosin-Mutanten von Trp70. Diese Mutationen beeinflussen, analog zu Tpx<sup>W70A</sup>, die strukturelle Integrität von Tpx nicht (Anhang Abbildung 6-8). Ebenso weisen Tpx<sup>W70F</sup> (33,1%  $\pm$  2,2%) und Tpx<sup>W70Y</sup> (20,4%  $\pm$  0,6%) ähnliche Aktivitäten wie Tpx<sup>W70A</sup> (21,6%  $\pm$  1,9%) auf. In diesen Mutanten können die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der Indol-Seitenkette von Trp39 und Position 70 ausgebildet werden. Es scheint somit, dass an Position 70 ein aromatischer Rest nicht ausreichend ist, um eine katalytische Aktivität ähnlich der des Wildtyp-Proteins zu erreichen, sondern eine Indol-Seitenkette für die Interaktion von Tpx mit T(SH)<sub>2</sub> und/oder PxIII benötigt wird.

Für die Wechselwirkung zwischen Trp39 und Trp70 und die korrekte Ausrichtung des „Tryptophan-Deckels“ könnten auch andere Reste in Tpx wichtig sein. Die Seitenkette von Ile109 interagiert mit Trp39 in einer CH- $\pi$ -Interaktion und mit Trp70 in einer hydrophoben Wechselwirkung (Abbildung 4-9). Die Mutation von Ile109 zu Alanin führt zu einer eingeschränkten Aktivität von Tpx (32,4  $\pm$  1,5%), welche interessanterweise in der gleichen Größenordnung wie die Restaktivität von Tpx<sup>W70A</sup> liegt. Durch die fehlende hydrophobe Seitenkette an Position 109 in Tpx<sup>I109A</sup> könnte es zu einer Destabilisierung des „Tryptophan-Deckels“ und möglicherweise einer Veränderung der Orientierung von Trp39 und/oder Trp70 kommen. Die veränderten Ausrichtungen der Tryptophanreste könnten wiederum zu einer gestörten Interaktion mit T(SH)<sub>2</sub> und/oder PxIII führen und für die reduzierte Aktivität von Tpx<sup>I109A</sup> verantwortlich sein.

Der dritte, im Rahmen dieser Arbeit, untersuchte Tryptophanrest von Tpx ist Trp86. Trp86 ist umgeben von hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren Thr47, Leu50, Tyr54, Val65 und Pro85. Des Weiteren besteht eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Schwefel der Thioethergruppe von Met84 und dem N $\epsilon$ -Amid der Seitenkette von Trp86 (Abbildung 4-10). Dieses Tryptophan stellt so eine Verbindung zwischen den Strukturelementen  $\alpha$ 1-Helix,  $\beta$ 4-Faltblatt und einer Schleife zwischen  $\alpha$ 2-Helix und  $\beta$ 5-Faltblatt dar. Die Unterschiede der NH-Resonanzen des Proteinrückgrats und der Seitenkette von Trp86 im HSQC-Spektrum von Tpx<sup>WT</sup> zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand und in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> lassen vermuten, dass Trp86 aufgrund der Verbindung zu den einzelnen Strukturelementen die Veränderung des Redox-Zustandes und die Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> „spürt“ (Abbildung 3-1, Abbildung 3-5, Abbildung 3-7). Das Fehlen der Indol-Seitenkette in Tpx<sup>W86A</sup> als Interaktionspunkt der einzelnen Strukturelemente könnte zu einer Instabilität des Proteinkerns und einer Entfaltung des Proteins führen. Dies wäre eine mögliche Begründung für die Unlöslichkeit von Tpx<sup>W86A</sup>.

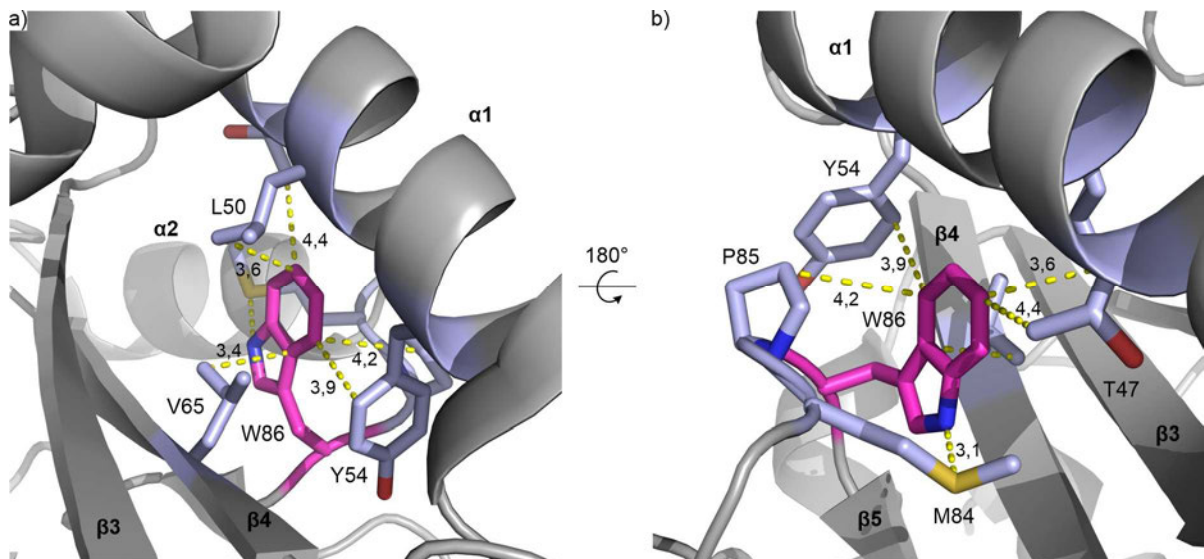


Abbildung 4-10 Intramolekulare Kontakte der Indol-Seitenkette von Trp86 in der Kristallstruktur von *T. brucei* Tpx (PDB 1o73). Die im Kontakt mit Trp86 (magenta) stehenden Aminosäuren, Thr47, Leu50, Tyr54, Val65 und Pro85 sind als Stäbchen (hellblau) dargestellt. Die gestrichelten Linien repräsentieren die Interaktionen und die Abstände sind in Å angegeben. Farbcodierung der Nicht-Kohlenstoff-Atome: gelb: Schwefel; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff.

Der vierte hochkonservierte Tryptophanrest in Tpx, Trp142, ist am C-Terminus lokalisiert. Trp142 ist eingeschlossen von einem hydrophoben Käfig, gebildet durch die Seitenketten von Phe32, Phe53 und Phe140 (Abbildung 4-12). Des Weiteren bildet das N $\epsilon$ -Amid von Trp142 eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carboxy-Gruppe des Asp134 aus sowie das Amid seines Proteinrückgrats zum Carbonylsauerstoff von Asn139. Die aufgenommenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten, reduzierten und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand belegen, dass sowohl die Seitenkette als auch das Proteinrückgrat von Trp142 keine Veränderungen der chemischen Umgebung durch den Wechsel des Redox-Zustands oder die Bindung von T(SH)<sub>2</sub> erfährt. Dies spricht für eine große Stabilität des Netzwerkes, in welches Trp142 eingebettet ist. Eine Mutation von Trp142 zu Alanin führt zu einer Veränderung der strukturellen Integrität von Tpx. Trp142 fixiert möglicherweise als zentraler Ankerpunkt des Netzwerkes den C-Terminus. Fehlt die Indol-Seitenkette von Trp142, könnte es zu einer partiellen Entfaltung der Tertiärstruktur kommen und eine gesteigerte Dynamik des C-Terminus sowie der mit ihm verbundenen  $\alpha$ 4-Helix hervorrufen (Abbildung 4-11). Dies führt zu einem Verlust der globulären Struktur, was ein geringeres

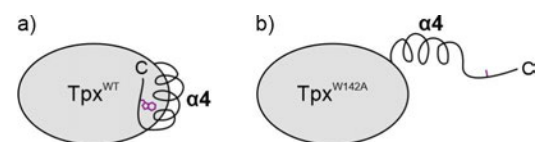


Abbildung 4-11 Darstellung der möglichen partiellen Entfaltung der Tertiärstruktur von Tpx<sup>W142A</sup>. In violett sind Trp142 in Tpx<sup>WT</sup> (a) und Ala142 in Tpx<sup>W142A</sup> (b) schematisch gezeigt.

Elutionsvolumen von Tpx<sup>W142A</sup> in der SEC und das veränderte CD-Spektrum erklären könnte (Abbildung 3-15a und d). Der Cluster von NH-Resonanzen in der Mitte des HSQC-Spektrums von Tpx und die beobachteten Linienverbreiterungen lassen ebenfalls auf partielle Entfaltung und veränderte Dynamik schließen (Abbildung 3-15g). In den NMR-Spektren von Tpx<sup>W142A</sup> wurde eine abgeschwächte T(SH)<sub>2</sub>-Interaktion im Vergleich zu Tpx<sup>WT</sup> beobachtet. In Anwesenheit von Trp142 wird die  $\alpha$ 4-Helix vermutlich in der Position gehalten, die die Interaktion der Carboxylgruppe von T(SH)<sub>2</sub> mit Arg128 ermöglicht (Abbildung 4-2b). Eine partielle Entfaltung des C-Terminus durch das Fehlen der Indol-Seitenkette in Tpx<sup>W142A</sup> führt möglicherweise dazu, dass Arg128 nicht mehr mit dem Glutathionylarm von T(SH)<sub>2</sub> interagieren kann. Das eingeschränkte Bindevormögen von T(SH)<sub>2</sub> an

Tpx<sup>W142A</sup> spiegelt sich auch in der reduzierten Aktivität von Tpx<sup>W142A</sup> im gekoppelten Px-Assay wider ( $35,2 \pm 2,5\%$ ).

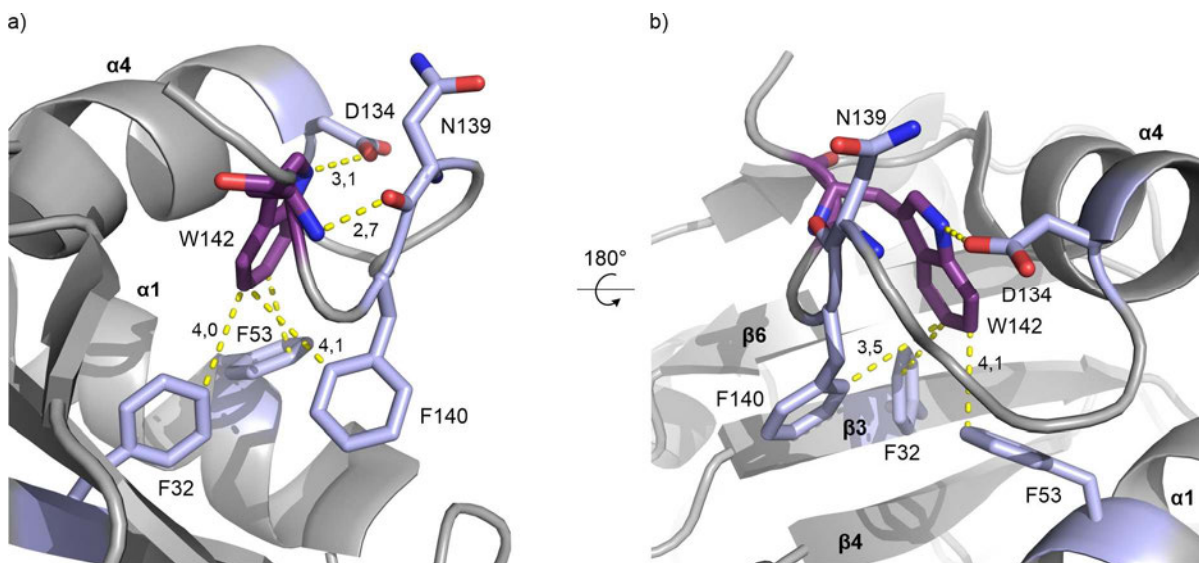


Abbildung 4-12 Wechselwirkungen von Trp142 in der *T. brucei* Tpx Kristallstruktur (PDB 1o73). Die mit Trp142 (violett) interagierenden Aminosäuren (hellblau) sind als Stäbchen gezeigt. Die gelb gestrichelten Linien stellen die mögliche Interaktion mit der Entfernung in Å dar. Farbcodierung der Nicht-Kohlenstoff-Atome: rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff.

Die vier Tryptophanreste in Tpx sind eingebettet in Netzwerke aus hydrophoben sowie elektrostatischen Wechselwirkungen und bilden dabei vermutlich jeweils eine Art Ankerpunkt: i) Trp39 und Trp70 verbinden das aktive Zentrum und die  $\alpha$ 2-Helix, welche vermutlich wichtig für die Bindung von T(SH)<sub>2</sub> ist; ii) Trp86 stabilisiert den Kern von Tpx; iii) Trp142 fixiert den C-Terminus und die  $\alpha$ 4-Helix und bringt diese in eine Position für die Interaktion mit T(SH)<sub>2</sub>.

Der nächste Schritt, um die hier erhobenen Hypothesen zur Rolle der Tryptophanreste in Tpx weiter zu verfolgen, wäre z. B. eine MD-Simulation, um die „Kommunikation“ zwischen Trp39 und Trp70 und des damit verbundenen Kontakts zwischen dem aktiven Zentrum und der  $\alpha$ 2-Helix zu untersuchen. Mit dieser Methode könnte gezeigt werden, ob die Mutation der Indol-Seitenkette von Trp39 eine Veränderung der Position der Indol-Seitenkette von Trp70 zur Folge hätte; und damit verbunden eine veränderte Position der Schleife N-terminal zu und der  $\alpha$ 2-Helix selbst bewirkt. Des Weiteren könnte eine Kristallstruktur von Tpx<sup>W39A</sup> Aufschluss über die Orientierung der Seitenkette von Trp70 geben. Durch eine Zuordnung der NH-Resonanzen in den NMR-Spektren von Tpx<sup>W70A</sup> und Tpx<sup>W142A</sup> könnte ein Vergleich durchgeführt werden, welche NH-Resonanzen durch die Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> beeinflusst sind. Eine Titration von Tpx<sup>W70A</sup> und Tpx<sup>W142A</sup> mit T(SH)<sub>2</sub> über die in dieser Arbeit verwendeten molaren Verhältnisse hinaus könnte in NMR-Studien eine quantitative Analyse des T(SH)<sub>2</sub>-Bindevormögens ermöglichen. Eine Kristallstruktur von Tpx<sup>W142A</sup> könnte zeigen, ob die Mutation von Trp142 zu Alanin zu einer partiellen Entfaltung der Tertiärstruktur des C-Terminus führt. Eine <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-hetNOE-Messung von Tpx<sup>W142A</sup> wäre eine Möglichkeit, die Dynamik zu untersuchen und mögliche Unterschiede zu Tpx<sup>WT</sup> zu bestimmen.

## 4.2 Die kovalente Bindung von CFT an Tpx induziert eine Dimerisierung des Protein-Inhibitor-Komplex

Tryparedoxin stellt aus verschiedenen Gründen einen ausgezeichneten Angriffspunkt für die Entwicklung von Arzneistoffen gegen *Trypanosoma brucei* dar<sup>[72,107]</sup>: i) Tpx ist essenziell in *T. brucei*;<sup>[98]</sup> ii) Tpx ist einzigartig in Trypanosomatiden;<sup>[77,104]</sup> iii) Die Reduktion von Tpx durch T(SH)<sub>2</sub> ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der essenziellen Trypanothion/Trypanothion-Reduktase-Kaskade.<sup>[72,73]</sup> Füller et al., 2012<sup>[21]</sup> präsentierten erste Inhibitoren gegen Tpx, darunter 2-(Chlormethyl)-5-(4-fluorphenyl)-thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (CFT), dessen molekularer Bindemechanismus in dieser Arbeit weiter aufgeklärt werden konnte.

Wie schon von Füller et al.<sup>[21]</sup> gezeigt, bindet CFT unter Eliminierung von Hydrochlorid an Cys40 in Tpx. Die in dieser Arbeit bestimmte antitrypanosomale Aktivität von CFT liegt im niedrigen mikromolaren Bereich und entspricht den Ergebnissen von Füller et al. ( $0,7 \pm 0,03 \mu\text{M}$  (24 h);  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$  (72 h)<sup>[21]</sup>). Im gekoppelten Px-Assay bewirkt CFT eine vollständige Inhibierung der Kaskade nach ~25 min (Abbildung 3-20). Ein Derivat des CFT, 2-Methyl-5-(4-fluorphenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (MFT), welchem die Chlor-Abgangsgruppe fehlt, zeigt im ATPlite Assay keinerlei antitrypanosomale Aktivität. Es konnte auch keine Inhibition der Peroxid-Entgiftungs-Kaskade im gekoppelten Px-Assay durch MFT beobachtet werden. Somit kommt es ohne eine kovalente Bindung des Inhibitors zu keiner antitrypanosomalen Aktivität und keiner *in vitro* Inhibition. Ferner konnte auch NMR-spektroskopisch keine Interaktion von MFT mit Tpx beobachtet werden (Abbildung 3-21). Die kovalente Bindung von CFT an Tpx ist daher nicht nur für die Inhibition essenziell, ohne die kovalente Bindung von CFT an Cys40 in Tpx findet keine Protein-Inhibitor-Interaktion statt. Dies lässt darauf schließen, dass das Chloratom in CFT auch Teil der initialen Komplexformation vor der Ausbildung der kovalenten Bindung mit Tpx ist, wobei die Inaktivierung langsam erfolgt ( $k_{\text{inact}} 4,6 \pm 1,4 \text{ min}^{-1}$ ). Das Potential von kovalenten Inhibitoren wurde lange skeptisch betrachtet. Allerdings waren 2009 drei von zehn der meist-verkauften Arzneistoffe in den USA kovalente Inhibitoren und 33% dieser Klasse von Therapeutika sind Antiinfektiva.<sup>[162]</sup> Nach weiterer Untersuchung und Weiterentwicklung von CFT könnte auch dieser kovalente Inhibitor zur Klasse der Antiinfektiva zählen.

Innerhalb der zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung stehenden 16 Kristall- oder NMR-Strukturen von Tryparedoxin aus *C. fasciculata*, *L. major* und *T. brucei*, existierte keine im Komplex mit einem Inhibitor (siehe Tabelle 1-3). Die in dieser Arbeit präsentierten Kristallstrukturen des Tpx-CFT-Komplexes stellen die ersten Strukturen von Tpx im Komplex mit einem Inhibitor dar.<sup>[111]</sup> Die Tpx-Kristallstrukturen in Komplex mit CFT haben eine exzellente Auflösung von 1,6 Å und 1,8 Å. Beide Kristallstrukturen zeigten eine Mischung aus Monomer (Kette C) und Dimer (Kette A und Kette B) in der asymmetrischen P2<sub>1</sub> Einzelzelle. CFT interagiert in den Ketten A und B mit mehreren Aminosäuren von Tpx (Pose 1); in der Kette C jedoch besteht der einzige Protein-Inhibitor-Kontakt aus der kovalenten Bindung mit Cys40 (Pose 2).

Das Auftreten einer zweiten Tpx-Population in Anwesenheit von CFT bei niedrigerem Elutionsvolumen in der analytischen SEC, die Vergrößerung des beobachteten Molekulargewichts in SEC-MALS, die Erhöhung des Gyrationradius in den SAXS-Messungen und die Linienverbreiterung in den <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC- und <sup>19</sup>F NMR-Spektren, zeigen anschaulich, dass die Dimerisierung des Tpx-CFT-Komplexes auch in Lösung erfolgt (Abbildung 3-21; Abbildung 3-27; Abbildung 3-28; Abbildung 3-37). Ausgehend von der Kristallstruktur wurde ein Gyrationradius von 2,22 nm für das Tpx<sup>WT</sup>-CFT-

Dimer erwartet;<sup>[111]</sup> der ermittelte Gyrationradius des Tpx<sup>WT</sup>-CFT-Dimers in den SAXS-Messungen ist allerdings kleiner (2,03 nm). Diese Beobachtung lässt auf eine Mischung aus Monomer und Dimer in Lösung schließen, welche auch in der Kristallstruktur zu beobachten ist. Die gemessenen Daten ließen jedoch die Frage offen, ob die Orientierung von CFT im monomeren Tpx-CFT-Komplex der Ausrichtung in Kette C der Kristallstruktur entspricht (Pose 2). Über die Orientierung von CFT im monomeren Protein in Lösung, konnte eine systematische QM/MM-Simulation der chemischen Verschiebung des Fluoratoms von CFT, vorgenommen von [REDACTED], Doktorand im Arbeitskreis von Prof. Dr. [REDACTED] an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Aufschluss geben.<sup>[118]</sup> Es handelt sich hier um eine der bisher größten rechnerischen Studien zu chemischen Verschiebungen von <sup>19</sup>F-Kernen in einem biologischen Kontext. Diese Studie berücksichtigte, die aus der Kristallstruktur des Tpx-CFT-Komplexes bekannten, Konformationen des CFT sowohl im monomeren (Pose 1 und Pose 2) als auch im dimeren Inhibitor-Protein-Komplex (Abbildung 3-23; Abbildung 3-38). Die berechneten chemischen Verschiebungen sagten korrekt voraus, dass freies CFT und MFT einander sehr ähnlich sind (Abbildung 3-39). Eine stärkere Tieffeldverschiebung wurde für CFT gebunden an dimeres Tpx sowohl berechnet als auch für das Tpx<sup>WT</sup>-CFT-Dimer gemessen. Eine weitere Tieffeldverschiebung wurde für CFT an monomeres Tpx in Pose 1 gebunden vorhergesagt.<sup>[118]</sup> Dies steht im Einklang mit der beobachteten chemischen Verschiebung für CFT, gebunden an die monomere Tpx<sup>W39A</sup>-Mutante. Die Berechnung für CFT in Pose 2 im monomeren Komplex ergab eine chemische Verschiebung zwischen freiem CFT und dem Dimer-Komplex. Da das <sup>19</sup>F-Signal von CFT gebunden an Tpx<sup>W39A</sup> Tieffeldverschoben zur Resonanz des Tpx<sup>WT</sup>-CFT-Dimers vorliegt, ist die in Kette C der Kristallstruktur beobachtete Bindungsposition 2 von CFT vermutlich in Lösung nicht relevant. Die Berechnungen sagen somit qualitativ die korrekte Reihenfolge der chemischen <sup>19</sup>F-Verschiebung für CFT in den verschiedenen Zuständen sowie die richtige Richtung der Änderung der chemischen Verschiebung, welche durch die Proteinbindung und die Dissoziation des Komplexes verursacht werden, voraus. Diese systematische Studie zeigt die Fähigkeit Computer-basiert Vorhersagen für komplexe biologische Systeme zu treffen. Sie bietet eine Grundlage für weitere biomedizinische Anwendungen und rationale Arzneistoffentwicklung.<sup>[118]</sup>

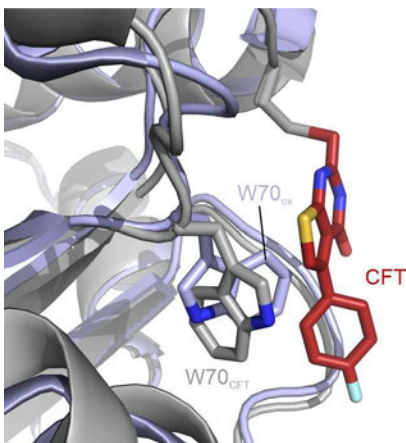


Abbildung 4-13 *Alignment* der Kristallstrukturen von oxidiertem Tpx (hellblau; PDB 1o73) und im Komplex mit CFT (grau; PDB 6gxy). Trp70 stellt ein sterisches Hindernis für die CFT-Bindung an Tpx dar. Farbcodierung der Nicht-Kohlenstoff-Atome: blau: Stickstoff; rot: Sauerstoff; gelb: Schwefel; türkis: Fluor.

In der Kristallstruktur und in den MD-Simulationen wurden die intramolekularen Interaktionen zwischen den Aminosäuren Trp70, Glu107 und Ile109 und dem Inhibitor beobachtet (Abbildung 3-24, Abbildung 3-25). Die Alanin-Mutanten der Seitenkette von Trp70 und Ile109 zeigten weiterhin die Fähigkeit, CFT zu binden (Abbildung 3-31a). Allerdings wurde Tpx<sup>W70A</sup> schon bei einem molaren Verhältnis von 1:1 zu CFT nach 5 min Inkubationszeit vollständig inhibiert (Abbildung 3-31b). Eine mögliche Erklärung bietet der Vergleich der Kristallstrukturen von oxidiertem Tpx (PDB 1o73) und Tpx im Komplex mit CFT (Kette A, PDB 6gxy) (Abbildung 4-13). Die Indol-Seitenkette von Trp70 stellt in der oxidierten Kristallstruktur ein sterisches Hindernis für die CFT-Bindung dar. Die Indol-Seitenkette muss ihre Orientierung verändern, damit CFT eine Pose wie in Kette A oder B der Tpx-Kristallstruktur in Komplex mit CFT einnehmen kann. Fehlt dieser räumlich anspruchsvolle Rest, weil er durch eine Alanin-Seitenkette ersetzt wurde, fehlt die sterische

Hinderung und CFT kann schneller an Tpx binden. Die Alanin-Mutationen der Aminosäuren Trp70 und Ile109 haben keinen Einfluss auf das Dimerisierungsverhalten des Tpx-CFT-Komplexes. Diese sind reine *cis* Interaktionen.

In der MD-Simulation des Tpx-CFT-Dimerkomplexes wurde beobachtet, dass die Ketten A und B in Abwesenheit von CFT erhöhte RMSD-Werte relativ zur Ausgangsposition hatten, dies lässt vermuten, dass CFT die Dimerbildung nicht nur induziert, sondern auch stabilisiert (Abbildung 3-26f). Allerdings weist die antiparallele Orientierung von CFT zu CFT' in der Kristallpackung ohne Tpx, im Gegensatz zur parallelen Ausrichtung im Tpx-CFT-Komplex, darauf hin, dass CFT-CFT-Wechselwirkungen nicht allein die treibende Kraft der Dimerisierung sind (Abbildung 3-29). Für die Untersuchung der Rolle der *trans* Interaktion zwischen Trp39 und CFT' für die Tpx-CFT-Dimerisierung wurde die Punktmutante Tpx<sup>W39A</sup> verwendet. Mittels analytischer SEC, SAXS, SEC-MALS, ITC sowie NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen der Indol-Seitenkette an Position 39 zu einem Tpx-CFT-Monomer führt (Abbildung 3-32c und d; Abbildung 3-33; Abbildung 3-34; Abbildung 3-35b; Abbildung 3-36b). Die beobachtete chemische Verschiebung des Fluoratoms von CFT in Komplex mit Tpx<sup>W39A</sup> in den <sup>19</sup>F NMR-Messungen verändert sich durch eine Verdünnungsreihe leicht (Abbildung 3-37c). Dies könnte auf eine residuale, extrem schwache Dimerisierung von Tpx<sup>W39A</sup>-CFT hindeuten. Um zu überprüfen, ob ein aromatischer Rest an Position 39 der Primärstruktur von Tpx ausreichend für ein *Stacking* intermolekular mit der Methylgruppe des CFT' ist, wurden Phenylalanin- und Tyrosin-Punktmutanten anstelle des Trp39 generiert (Anhang Abbildung 6-8). Tpx<sup>W39F</sup> und Tpx<sup>W39Y</sup> wurden analog der vorangegangenen SEC-Analyse mit steigenden CFT-Konzentrationen inkubiert und die Elutionsvolumina in den Chromatogrammen betrachtet (Abbildung 4-14). Die SEC-Läufe in Anwesenheit von CFT zeigen ein klares Auftreten einer Dimerpopulation mit geringerem Elutionsvolumen als in Abwesenheit von CFT. Somit reicht ein aromatisches Ringsystem wie in den Seitenketten von Trp, Tyr und Phe, um ein *Stacking* des Ringsystems mit der Methylgruppe des an Cys40 gebundenen CFT zu bewirken. Trp39 oder ein aromatischer Rest an dieser Position in Tpx ist essenziell für die Stabilisierung des Dimerkomplexes.

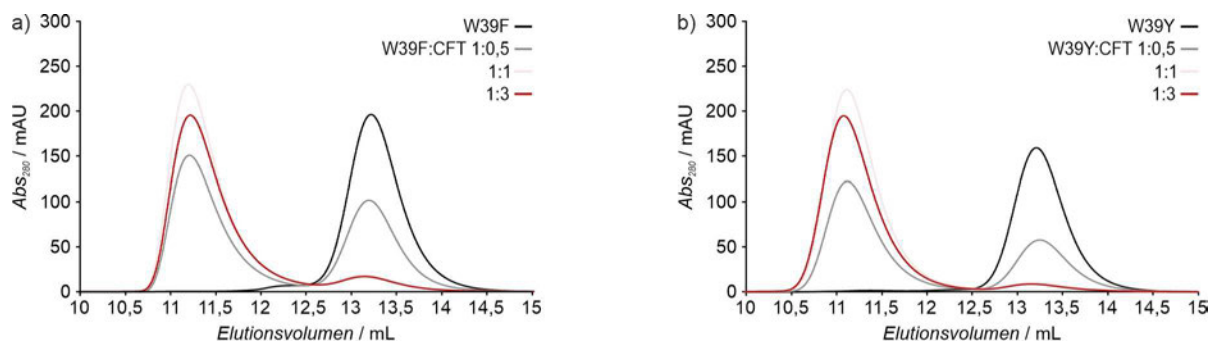


Abbildung 4-14 Analytische SEC-Läufe der Tpx-Mutanten Tpx<sup>W39F</sup> und Tpx<sup>W39Y</sup>. Alle hier gezeigten SEC-Läufe wurden mit reduziertem Protein durchgeführt. Die SEC-Läufe erfolgten nach einer 30-minütigen Inkubationszeit des Proteins mit DMSO oder CFT bei 25 °C. (a) Tpx<sup>W39F</sup> und (b) Tpx<sup>W39Y</sup> wurden mit CFT in steigenden Tpx:CFT Verhältnissen (Tpx:CFT 1:0,5; 1:1; 1:3) behandelt und eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Die Chromatogramme sind hier dargestellt.

Die intermolekulare Salzbrücke zwischen Lys102 und Glu107' ist eine reine Protein-Protein-Interaktion, welche jedoch ohne CFT, wie den MD-Simulationen zu entnehmen ist, nicht gebildet wird. Zusätzlich zeigen diese Simulationen auch, dass die Abstände zwischen Lys102 und Glu107' sowie Lys102' und Glu107 groß sind und die Salzbrücke nur transient gebildet wird. In den ITC-Messungen der Tpx<sup>K102E</sup>-Mutante ergab sich eine Dissoziationskonstante für Tpx<sup>K102E</sup>-CFT die 15-fach erhöht ist im

Vergleich zum Tpx<sup>WT</sup>. Die Salzbrücke stabilisiert zusätzlich das Dimer, scheint jedoch nicht essenziell für die Dimerbildung zu sein. Daher ist der ermittelte Gyrationradius basierend auf den SAXS-Messungen und das gemessene Molekulargewicht in SEC-MALS zwischen dem Tpx<sup>WT</sup>-CFT-Dimer und dem Tpx<sup>W39A</sup>-CFT-Monomer zu beobachten. Tpx<sup>K102E</sup> bildet eine Mischung aus Monomer und Dimer, wie schon für Tpx<sup>WT</sup>-CFT beobachtet, allerdings ist der Anteil des Monomers in der Mutante aufgrund der Destabilisierung ohne die Salzbrücke höher als für Tpx<sup>WT</sup>-CFT. Eine eindrucksvolle Darstellung dieser Destabilisierung sind die <sup>19</sup>F-NMR-Spektren des Tpx<sup>K102E</sup>-CFT-Komplexes, wo die chemische Verschiebung zwischen der Tpx<sup>W39A</sup>-CFT-Monomer Pose 1 und der Tpx<sup>WT</sup>-CFT-Dimer Resonanz liegt und außerdem eine stark vergrößerte Linienbreite im Vergleich zum Tpx<sup>WT</sup>-CFT-Dimer und Tpx<sup>W39A</sup>-CFT-Monomer aufweist (Abbildung 3-37). Die Linienverbreiterung ist hier vermutlich nicht nur auf die Zunahme des Molekulargewichts, sondern auch auf die transiente Natur des Tpx<sup>K102E</sup>-CFT-Dimers zurückzuführen.

Zusammengefasst ist die Dimerisierung des Tpx-CFT-Komplexes von den folgenden Interaktionen abhängig: i) dem parallelen *Stacking* der CFT-Moleküle; ii) der intermolekularen Protein-Inhibitor-Interaktion zwischen Trp39 und CFT und iii) der Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Lys102 und Glu107 der beiden Monomereinheiten. Fehlt eine dieser Interaktionen, ist die Dimerformation gestört oder findet nicht statt. Die Inhibitor-induzierte Dimerisierung von Tpx, könnte zum einen für die Weiterentwicklung von CFT als Wirkstoff gegen die afrikanische Schlafkrankheit genutzt werden und darüber hinaus eine allgemeine methodische Anwendung finden. Chemisch induzierte Dimerisierungen wurden in der Vergangenheit z. B. für die Kontrolle von Proteinfunktionen genutzt.<sup>[163,164]</sup> Rapamycin ist beispielsweise ein natürlich vorkommender Arzneistoff, welcher zu einem Heterodimer von mTOR und FK506 Bindeprotein (FKBP) führt.<sup>[165]</sup> FK506 und Derivate werden in der Kontrolle von Signalwegen verwendet und führen zu Homodimeren.<sup>[164]</sup> Diese „Dimerisierer“ sind jedoch im Vergleich zu CFT sehr groß. CFT ist der bisher kleinste bekannte „Dimerisierer“.<sup>[111]</sup>

## 5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Peroxid-Entgiftungs-Kaskade in *Trypanosoma brucei* überwiegend als isoliertes System betrachtet, allerdings steht die Kaskade in der trypanosomalen Zelle in Wechselwirkungen mit vielen weiteren Stoffwechselprozessen, z. B. dem Eisen-Stoffwechsel. Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit der Untersuchung eines potenziellen, lysosomalen Eisenkanals begonnen, dem trypanosomalen TRPML (engl. *transient receptor potential mucolipin*) Kanal *TbMLP* (engl. *T. brucei* *Mucolipin-like protein*). Dieser Ausblick stellt eine Verbindung zwischen der Peroxid-Entgiftungs-Kaskade und dem Eisen-Stoffwechsel in *Trypanosoma brucei* sowie mit TRPML Kanälen vor und präsentiert die ersten Ergebnisse der Untersuchung des *TbMLP* Kanals:

Die Entgiftung von Hydroperoxiden und Lipidperoxiden (Abbildung 5-1 (1)) ist überlebenswichtig für die trypanosomale Zelle.<sup>[83-85]</sup> Peroxide können in einer Fenton-Reaktion mit  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  und Hydroxylanion sowie Hydroxylradikal reagieren (Abbildung 5-1 (2)). Die so entstandenen Hydroxylradikale können zur Zerstörung von Zellmembranen führen, welche wiederum den Zelltod, die Ferroptose, einleiten können.<sup>[166]</sup> Die Aktivität der zytosolischen Peroxid-Entgiftungs-Kaskade schützt die Zelle vor dieser Art des Zelltods. Neben Peroxiden ist auch die intrazelluläre Konzentration von Eisen bedeutungsvoll für die Ferroptose. Eisen ist überlebenswichtig für den Parasiten, allerdings kann es wie oben beschrieben giftig für den Organismus sein.

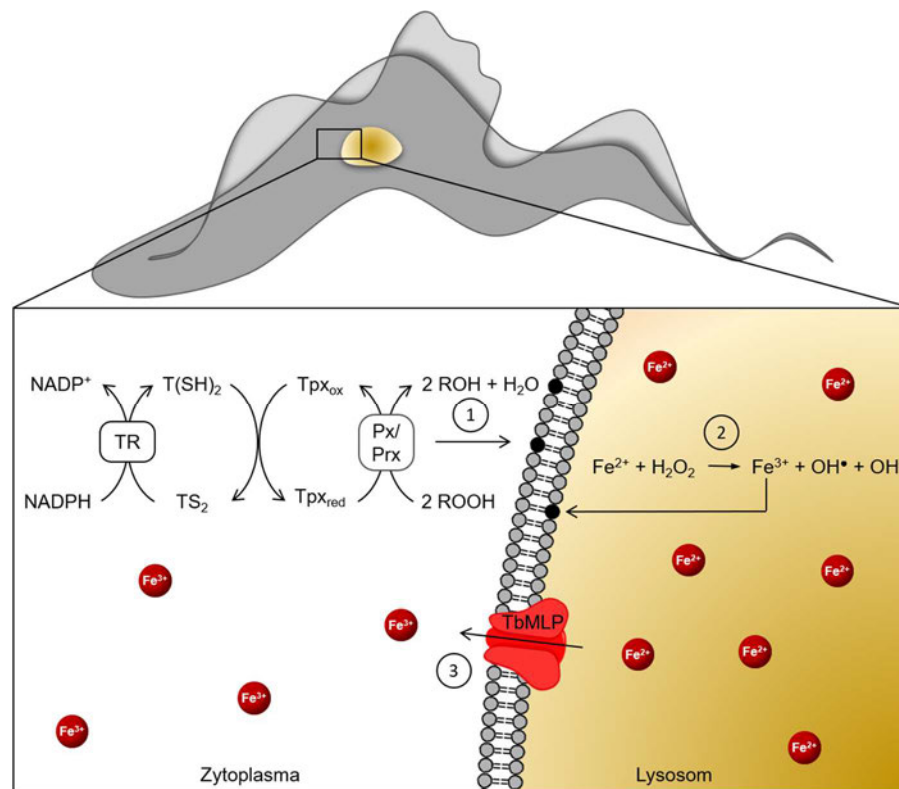


Abbildung 5-1 Cartoon von *T. brucei* mit einem Ausschnitt des Zytoplasmas und des Lysosoms. (1) Die Peroxid-Entgiftungs-Kaskade entfernt schädliche Hydro- und Lipidperoxide. (2) Peroxide können in einer Fenton-Reaktion mit  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  und Hydroxylradikal und -anion, welche z. B. die Zellmembranen schädigen, reagieren. (3) *TbMLP* ist ein möglicher Kandidat für den Transfer von Eisen aus dem Lysosom in das Zytoplasma des Parasiten.

In Blutstrom *T. brucei*-Zellen wird Eisen, gebunden an Transferrin, aus dem Blut des Wirts aufgenommen und im Lysosom des Parasiten gespeichert.<sup>[167]</sup> Eisen wird jedoch nicht nur im Lysosom, sondern hauptsächlich im Zytoplasma z. B. als Cofaktor benötigt.<sup>[168,169]</sup> In humanen Zellen übernehmen der DMT1 Transporter (engl. *divalent metal transporter*)<sup>[170]</sup> und der TRPML1 Kanal die Aufgabe, Eisen vom Lysosom ins Zytoplasma zu transportieren.<sup>[171]</sup> In *T. brucei* konnte bisher kein Ortholog des DMT1 Transporters entdeckt werden. Taylor et al. identifizierten 2013 ein Homolog des TRPML1 Kanals in der Gensequenz von *T. brucei*, den *TbMLP* Kanal.<sup>[172]</sup> Sie konnten zeigen, dass *TbMLP* analog zu humanem TRPML1 im endolysosomalen System, insbesondere im Lysosom, lokalisiert ist. Weitere Erkenntnisse dieser Gruppe waren, dass ein Knock-Out des *TbMLP*-Gens nur in Anwesenheit einer ektopischen Kopie möglich war, was dafürspricht, dass *tbmlp* ein essenzielles Gen, bzw. *TbMLP* ein essenzielles Protein ist. Obwohl Taylor et al. nicht abschließend zeigten, dass ausschließlich *TbMLP* Eisen aus dem Lysosom ins Zytoplasma transferiert, ist deutlich, dass *TbMLP* eine wichtige Rolle für diesen Transfer spielt.<sup>[172]</sup> Somit ist *TbMLP* ein möglicher Kandidat für die Aufgabe des Eisentransfers vom Lysosom ins Zytoplasma (Abbildung 5-1 (3)). Die Arbeit von Taylor et al.<sup>[172]</sup> ist ein guter Ausgangspunkt für die weitere Untersuchung des *TbMLP*-Kanals.

TRPML-Kanäle sind unselektive Ionenkanäle für zweiwertige Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$ . Sie sind beteiligt am Vesikel-Transport, Autophagie und Signaltransduktion sowie an der Regulation der vesikulären Calcium-Ausschüttung.<sup>[173,174]</sup> Ihre Aktivität wird durch Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat<sup>[175]</sup>, Calcium und den pH-Wert beeinflusst<sup>[176,177]</sup>. TRPML Kanäle sind Tetramere (Abbildung 5-2a). Ein Monomer besteht aus sechs Transmembranhelices. Das herausragende Merkmal von Proteinen der TRPML-Familie ist eine extrazytosolische/luminale Domäne (ELD, engl. *extracytosolic/luminal domain*) zwischen der Transmembranhelix S1 und S2. Im Gegensatz zu *T. brucei* besitzen Menschen drei TRPML Kanäle, TRPML1-3<sup>[173]</sup>. TRPML2 ist der strukturell am wenigsten charakterisierte TRPML Kanal. Im Rahmen dieser Arbeit (in enger Kollaboration mit [REDACTED], AG [REDACTED] und [REDACTED], AG [REDACTED], Johannes Gutenberg-Universität Mainz) konnte durch Kristallstrukturen der humanen TRPML2 ELD bei pH 6,5 (2,0 Å) und pH 4,5 (2,95 Å, Abbildung 5-2b und c), sowie SAXS-, CD-, SEC-, ITC- und nativen massenspektrometrischen Experimenten zur Aufklärung der Struktur und Kalziuminteraktion beigetragen werden.<sup>[178]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die isolierte humane TRPML2 ELD als Tetramer vorliegt und ähnlich wie die ELDs von TRPML1 und 3 eine  $C_4$ -Rotationssymmetrie aufweist.<sup>[176,177]</sup> Durch die Lokalisation des TRPML2 Kanals im endolysosomalen System, erfährt die ELD pH-Werte zwischen 4,5 und 7,4, welche den Bedingungen im Lysosom und außerhalb der Zelle entsprechen. In ITC-Messungen konnte eine pH-abhängige Affinität der TRPML2 ELD zu  $\text{Ca}^{2+}$  bestimmt werden. So ergab sich bei pH 7,4 für die Interaktion von TRPML2 ELD und  $\text{Ca}^{2+}$  ein  $K_D$  von  $2,97 \pm 0,11$  mM. Die Affinität erscheint niedrig, allerdings befindet sich der  $K_D$  in einem physiologisch relevanten Bereich. Bei pH 6,5 ist der  $K_D$  der Interaktion von TRPML2 ELD und  $\text{Ca}^{2+}$  vierfach reduziert und bei pH 4,5 konnte keine Interaktion zwischen ELD und  $\text{Ca}^{2+}$  detektiert werden.<sup>[178]</sup> Diese Ergebnisse korrelieren mit der postulierten Hypothese für TRPML1 ELD von Li et al., 2017, dass saure Aminosäuren einer in die Pore reichenden Schleife (D<sup>113</sup>EDD<sup>116</sup> in TRPML2 ELD, in Abbildung 5-2c in Rot hervorgehoben) bei neutralen pH-Werten deprotoniert vorliegen,  $\text{Ca}^{2+}$  binden können und die Pore des Kanals so blockiert ist. Niedrigere pH-Werte führen zu einer Protonierung der sauren Aminosäuren und einer niedrigeren Affinität der TRPML ELD zu  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>[176]</sup> Überträgt man diesen Modus Operandi auf TRPML2 ELD lassen die Ergebnisse der ITC-Messungen darauf schließen, dass bei einer extrazytosolischen Lokalisation der TRPML2 ELD die Pore durch  $\text{Ca}^{2+}$  blockiert ist. Bei einer Lokalisation im Lumen des Lysosoms sind die sauren Aminosäuren protoniert und die Pore ist nicht blockiert. Es wäre höchstinteressant, ob die ELD von *TbMLP* einem

ähnlichen Kontrollmechanismus unterliegt wie TRPML2 ELD. Um dies zu untersuchen, könnte die *TbMLP* ELD rekombinant exprimiert, aufgereinigt und analog TRPML2 ELD strukturell charakterisiert werden.

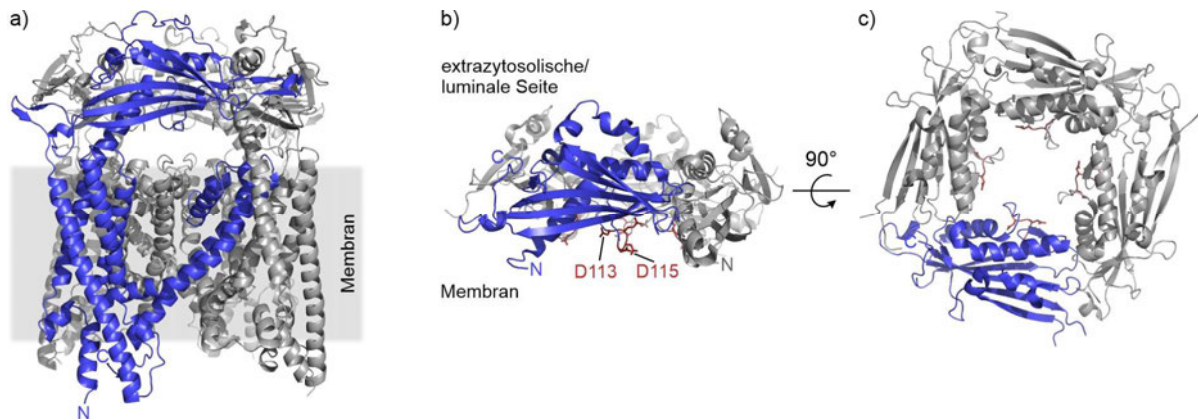


Abbildung 5-2 Kristallstruktur der TRPML2 ELD. Eine Monomereinheit ist in blau hervorgehoben. (a) Swiss-Modell des TRPML2-Kanals in Volllänge basierend auf der Cryo-Elektronenmikroskopie-Struktur des TRPML3-Kanals (PDB 5w3s). (b) und (c) zeigen die Kristallstruktur der TRPML2 ELD (pH 4,5; PDB 6hrs). Die Aminosäuren D<sup>113</sup>EDD<sup>116</sup> bilden eine acide Schleife, die in die Kanalpore reichen und sind als rote Stäbchen hervorgehoben. Modifiziert nach Viet\*, Wagner\*, Schwickert\* et al., 2019.<sup>[178]</sup>

*T. brucei* sowie *Drosophila melanogaster* haben im Gegensatz zum Menschen nur eine TRPML-Form. Dies warf die Frage auf, ob der TRPML Kanal aus *D. melanogaster* (*dTRPML*) *TbMLP* so ähnlich ist, dass dieser die zelluläre(n) Funktion(en) des *TbMLP* übernehmen kann. Der TRPML Kanal aus *D. melanogaster* ist funktionell gut charakterisiert.<sup>[179,180]</sup> Wenn die Substitution von *TbMLP* durch den *dTRPML* Kanal möglich ist, lassen sich möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion von *TbMLP* ziehen. Für die Substitution des *TbMLP* durch den *dTRPML* Kanal, wurde im ersten Schritt der *D. melanogaster* TRPML Kanal in Blutstrom *T. brucei* Zellen Tetrazyclin-induzierbar überexprimiert (Abbildung 5-3). Die Zelllinie, *dTRPML* OE, exprimiert *dTPRML* mit einem C-terminalen Myc-Tag. Die Zellen wurden für 24 h oder 48 h mit Tetrazyclin induziert und die Expression des *dTRPML* durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Western Blot-Analyse mit Hilfe eines Erstantikörpers gegen den cMyc-Tag überprüft. Es ist eine Bande im Western Blot knapp über 72 kDa in der Spur der induzierten Proben zu erkennen (Abbildung 5-3a). Diese kann dem *dTRPML* Kanal mit einer Größe von 77 kDa zugeordnet werden. Die Intensitäten der Banden unterscheiden sich leicht, allerdings sind diese Unterschiede nicht in der Ladekontrolle (mTXNPx) zu erkennen. Die verschiedenen Klone exprimieren somit *dTRPML* unterschiedlich stark. Da der Klon 20B1 das höchste Expressionslevel aufwies, wurde er für die weitere Untersuchung der Lokalisation des *dTRPML* Kanals mittels Immunfluoreszenz ausgewählt. *T. brucei* haben ein Lysosom, welches zwischen dem Kinetoplast und dem Nukleus lokalisiert ist (Abbildung 1-2). Diese Position stimmt mit der Lokalisation des rot gefärbten Bereichs in den abgebildeten Trypanosomen überein (Abbildung 5-3b). Es kann davon ausgegangen werden, dass der *dTRPML* Kanal in den *T. brucei* Blutstrom-Zellen erfolgreich exprimiert wird und im Lysosom lokalisiert ist. Der nächste Schritt für die funktionelle Aufklärung wäre nun der Knock-Out der beiden *TbMLP*-Gene. Höchstinteressant wäre auch die strukturelle Aufklärung von *TbMLP* in Volllänge und der Vergleich zu den humanen TRPML1-3 Kanälen. Neben der strukturellen Aufklärung von *TbMLP* stellt auch die Untersuchung einer Verbindung des Kanals zur Peroxid-Entgiftungs-Kaskade ein großes Interesse dar. Hierfür könnte untersucht werden, ob von außen herbeigeführter oxidativer Stress, z. B. durch Wasserstoffperoxid, die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals beeinflusst. Der Effekt von Lipidperoxiden auf den *TbMLP* könnte ebenfalls Aufschluss über

eine mögliche Wechselbeziehung zwischen der Peroxid-Entgiftungs-Kaskade und dem trypanosomalen TRPML Kanal geben.

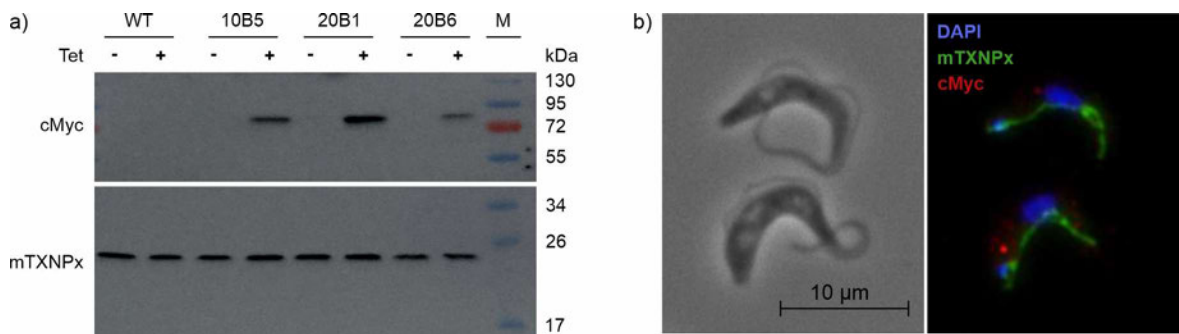


Abbildung 5-3 Western Blot-Analyse und Immunofluoreszenz-Mikroskopie von *T. brucei* BS449-Zellen, welche den *Drosophila melanogaster* TRPML-Kanal überexprimieren. (a) Western Blot-Analyse des Zelllysats nach Induktion mit Tetrazyklin (1 µg/mL) für 48 h. Aufgetragen sind die Zelllysate der *dTRPML* OE Klone 10B5, 20B1 und 20B6 mit und ohne Induktion sowie Wildtyp-Zellen zur Kontrolle (jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen/Spur). Der Blot wurde mit cMyc (1:1000) im ersten Schritt als Erstantikörper behandelt. Nach der Detektion wurde die Membran mit Methanol reaktiviert und im zweiten Schritt mit mTXNPx (1:1000) als Erstantikörper inkubiert. (b) Weitfeld- und Immunofluoreszenz-Aufnahme des *dTRPML* OE 20B1-Klones nach Tet-Induktion (1 µg/mL) für 24 h. Es wurden Antikörper gegen die mitochondriale Tryparedoxin-Peroxidase (mTXNPx; grün; 1:1000) und cMyc (rot; 1:500) verwendet. Die nukleäre und kinetoplastide DNA wurde mit DAPI-Färbung (blau) sichtbar gemacht.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungen

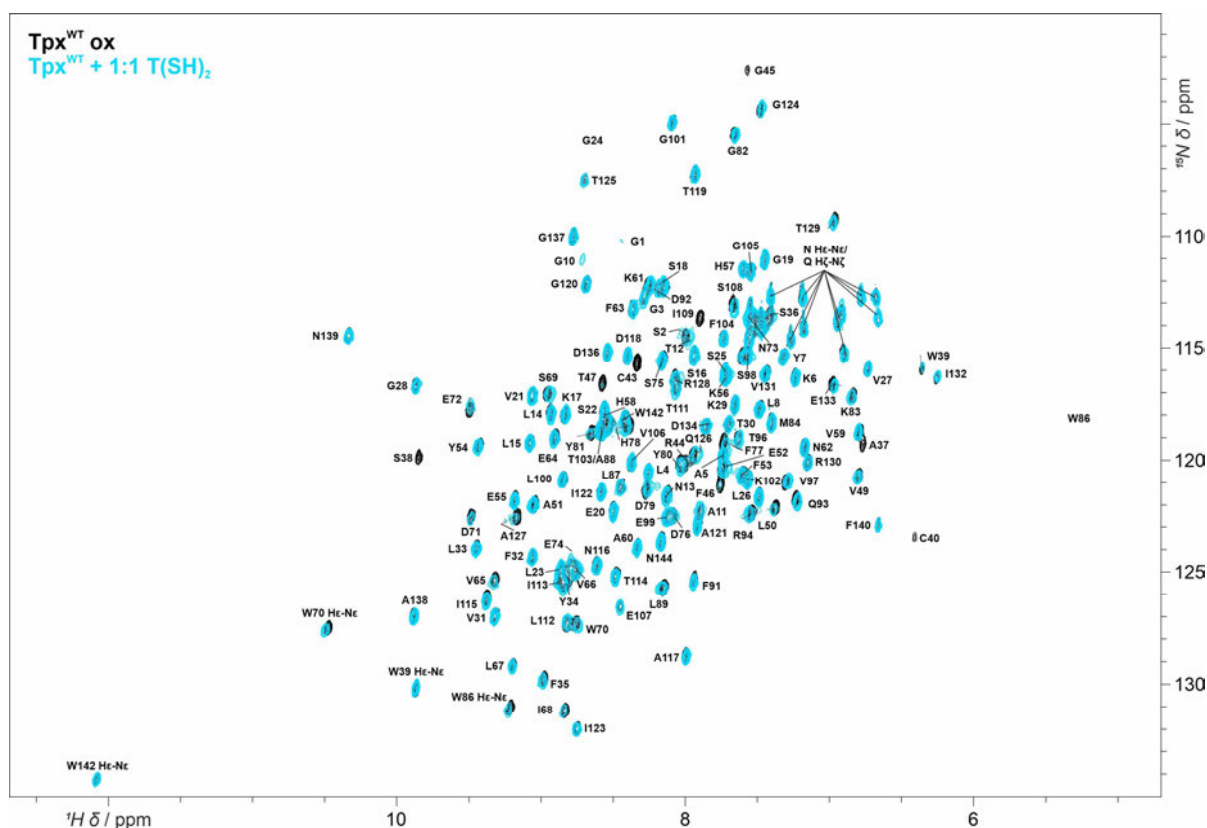


Abbildung 6-1 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten (schwarz) und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand molares Verhältnis Tpx:T(SH)<sub>2</sub> 1:1, hellblau).

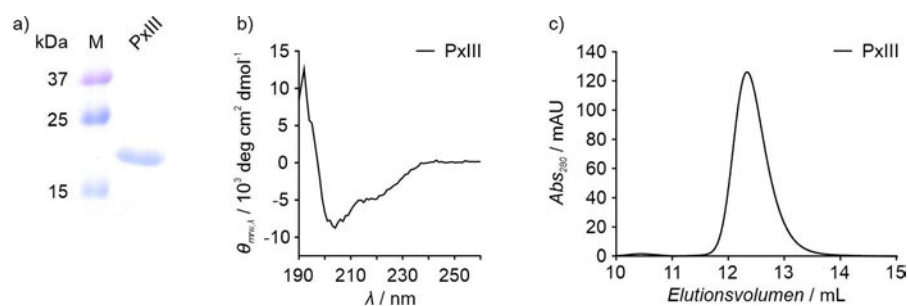


Abbildung 6-2 Analyse der strukturellen Integrität von PxlIII. Darstellung (a) einer 15% SDS-Page von PxlIII (4,6 ng Protein/Spur; MW ~18 kDa), (b) eines CD-Spektrums (5  $\mu$ M Protein) und (c) eines SEC-Laufs (200  $\mu$ L 100  $\mu$ M Protein) von PxlIII.

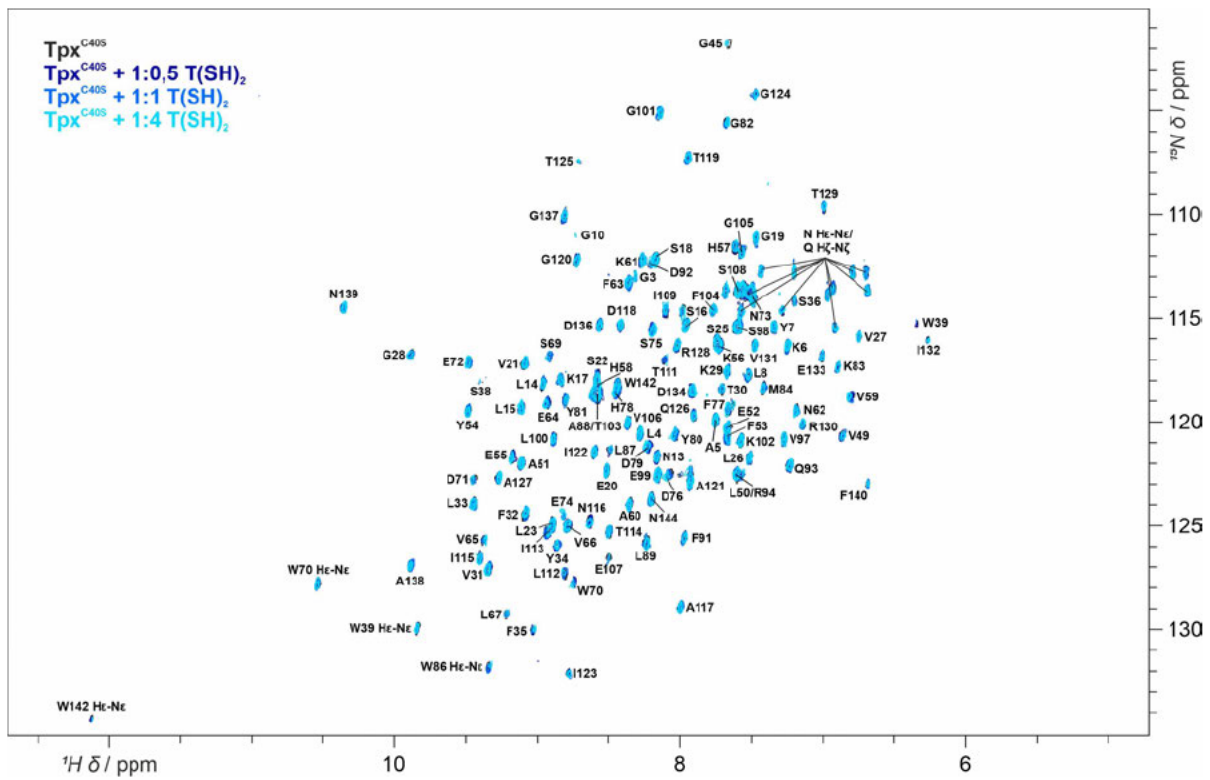


Abbildung 6-3  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HSQC-Spektren von  $\text{Tpx}^{\text{C405}}$  in Ab- (schwarz) und Anwesenheit von  $\text{T}(\text{SH})_2$  (Blauschattierungen; molares Verhältnis  $\text{Tpx}:\text{T}(\text{SH})_2$  1:0,5, 1:1 und 1:4). Die Zuordnung der NH-Resonanzen von  $\text{Tpx}^{\text{C405}}$  im apo Zustand wurde von [REDACTED] im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt.

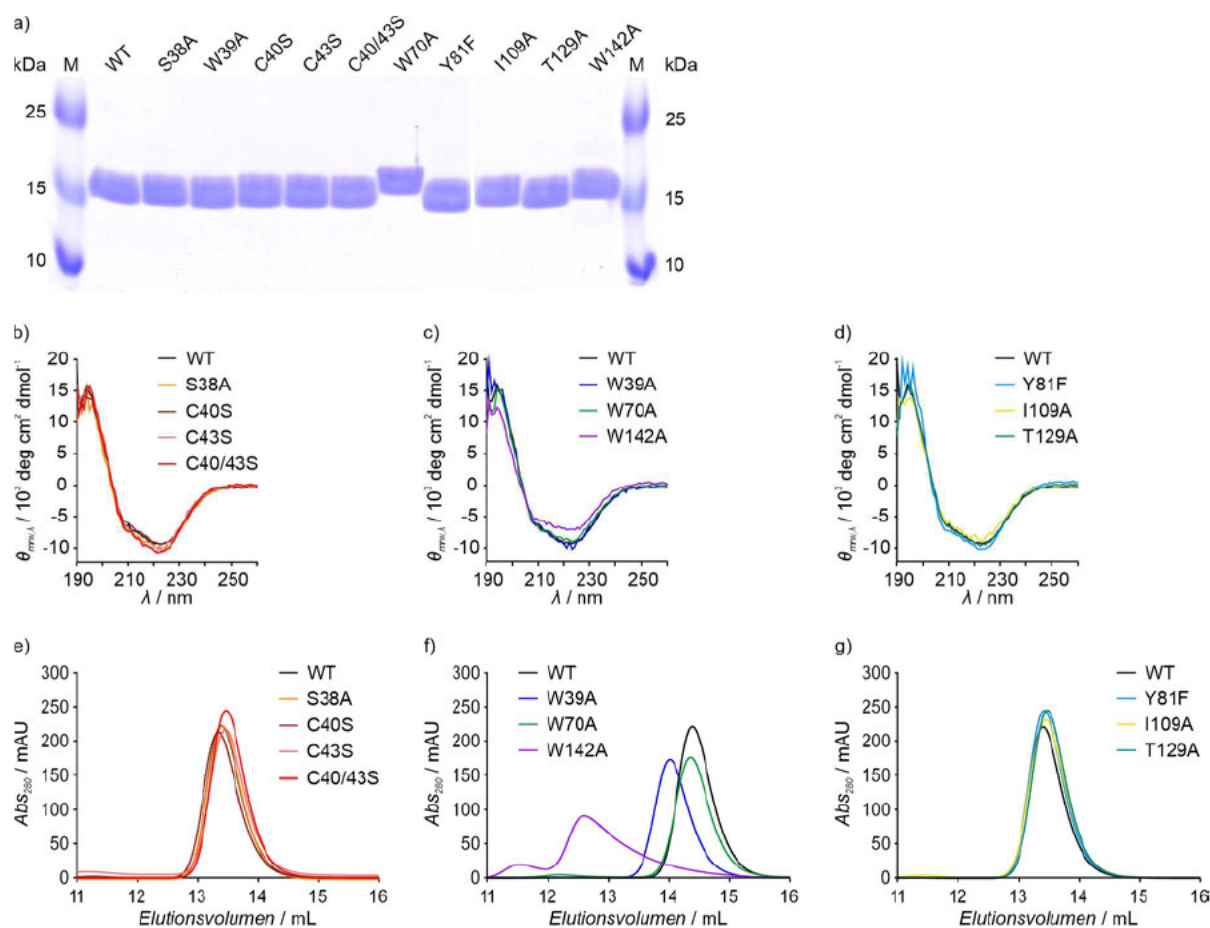


Abbildung 6-4 Analytik der strukturellen Integrität verschiedener Tpx-Mutanten. Dargestellt sind (a) 15% SDS-PAGE (jeweils 4 ng/Spur), (b)-(d) CD-Spektren (5  $\mu$ M Protein) und (e)-(g) SEC-Läufe (100  $\mu$ M 200  $\mu$ L) von Tpx<sup>WT</sup> und verschiedenen Punktmutanten.

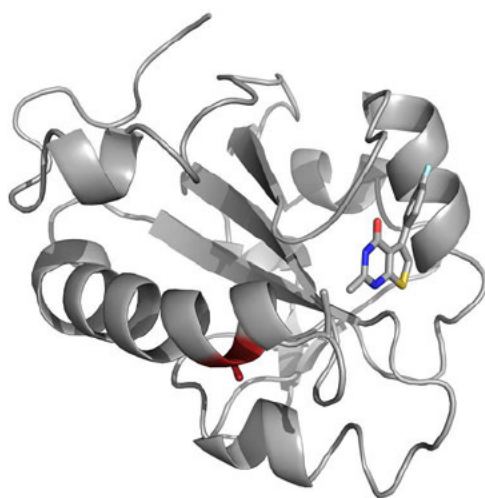


Abbildung 6-5 2,2 Å Kristallstruktur von Tpx<sup>R44A</sup> im Komplex mit CFT. Die P1-Einzelzelle beinhaltet sechs Protein-Inhibitor-Komplexe. Es wurden zwei Datensätze aufgenommen. Der erste lieferte eine Auflösung von 2,3 Å und der zweite, hier gezeigte Datensatz, eine 2,2 Å Kristallstruktur. In dieser Aufnahme wurde die kovalente Bindung zwischen Tpx<sup>R44A</sup> und CFT durch die Strahlung gebrochen. In rot ist die Alanin-Mutation gekennzeichnet. Durchgeführt von [REDACTED] und Prof. Dr. [REDACTED], Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Farbcodierung der Nicht-Kohlenstoff-Atome: gelb: Schwefel; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff; türkis: Fluor.

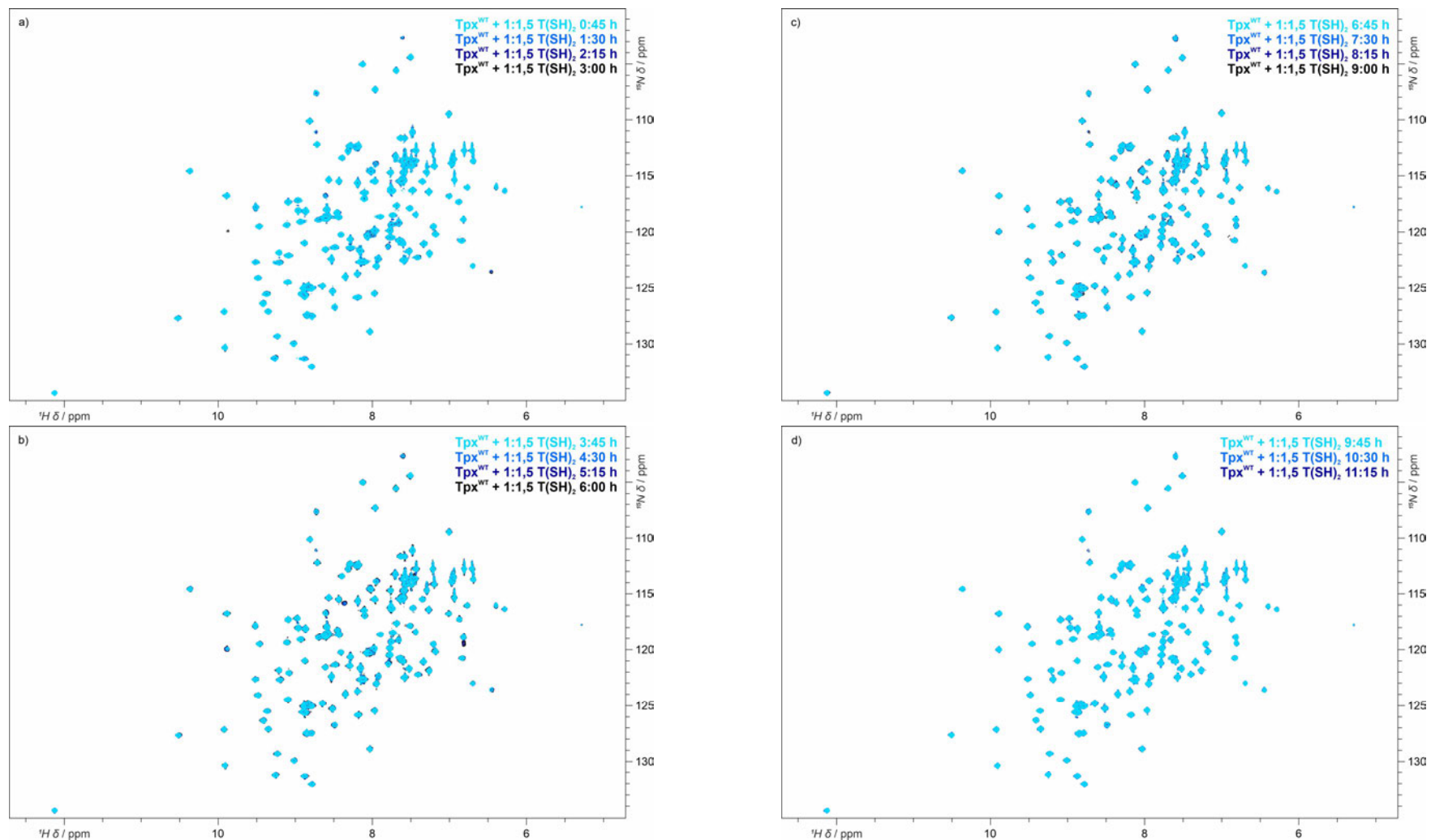


Abbildung 6-6  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren von  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von  $\text{T}(\text{SH})_2$ . Die Dauer der Aufnahme eines NMR-Spektrums entsprach 45 min. Eine Serienaufnahme lieferte so Spektren der Zeitpunkte (a) 0:45 h bis 3:00 h, (b) 3:45 h bis 6:00 h, (c) 6:45 h bis 9:00 h und (d) 9:45 h bis 11:15 h nach  $\text{T}(\text{SH})_2$ -Zugabe (abnehmende Blau-Färbung). Die NH-Resonanzen von  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  nehmen unmittelbar nach der  $\text{T}(\text{SH})_2$ -Zugabe die für den  $\text{T}(\text{SH})_2$ -gebundenen Zustand erwarteten Positionen ein und migrierten über die Zeit zurück zur anfänglichen Position, dem oxidierten Zustand. In Abbildung 3-12 ist dies für ausgewählte Resonanzen anschaulich zusammenfasst.

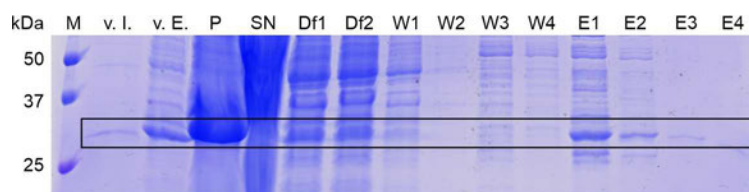


Abbildung 6-7 SDS-PAGE der Proteinaufreinigung von  $\text{Tpx}^{\text{W86A}}$ . Jede Spur wurde mit 10  $\mu\text{L}$  der Lösung des entsprechenden Expressions- bzw. Aufreinigungsschritts beladen, ungeachtet der Konzentration. v.I. = vor Induktion der Proteinexpression in Bakterienzellen mit IPTG; v. E. = vor der Zellernte; P = Pellet nach Zentrifugation der sonifizierten Lösung; SN = Überstand nach Zentrifugation der sonifizierten Lösung; Df = Durchfluss der NiNTA Affinitätssäule; W = Waschschritt der NiNTA Affinitätssäule; E = Elutionsschritt der NiNTA Affinitätssäule. Der eingezeichnete Rahmen zeigt den Bereich in dem das Fusionsprotein  $\text{Trx-His}_6\text{-Tpx}^{\text{W86A}}$  ( $\sim 30$  kDa) zu erwarten war.

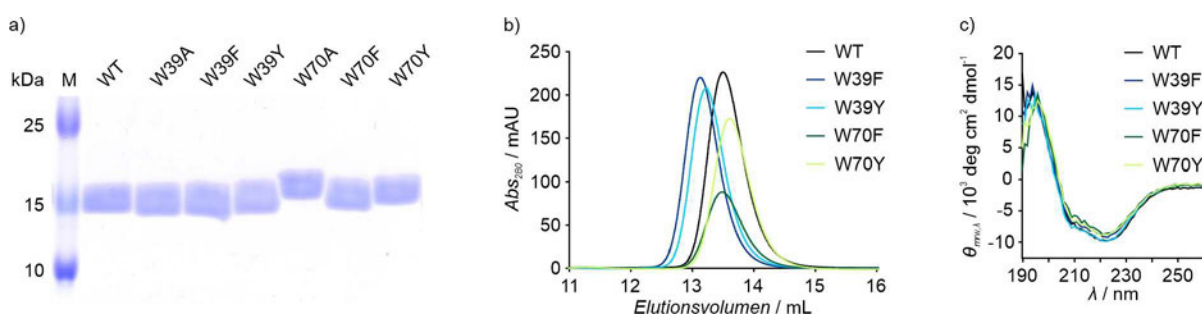


Abbildung 6-8 Analytik der strukturellen Integrität der Phenylalanin- und Tyrosin-Punktmutanten von Trp39 und Trp70 im Vergleich zum  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$ . Gezeigt sind (a) 15% SDS-PAGE (4 ng Protein/Spur), (b) SEC-Läufe (200  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{M}$  Protein) und (c) CD-Spektren (5  $\mu\text{M}$  Protein) der Mutanten,  $\text{Tpx}^{\text{W39F}}$ ,  $\text{Tpx}^{\text{W39Y}}$ ,  $\text{Tpx}^{\text{W70F}}$  und  $\text{Tpx}^{\text{W70Y}}$ .

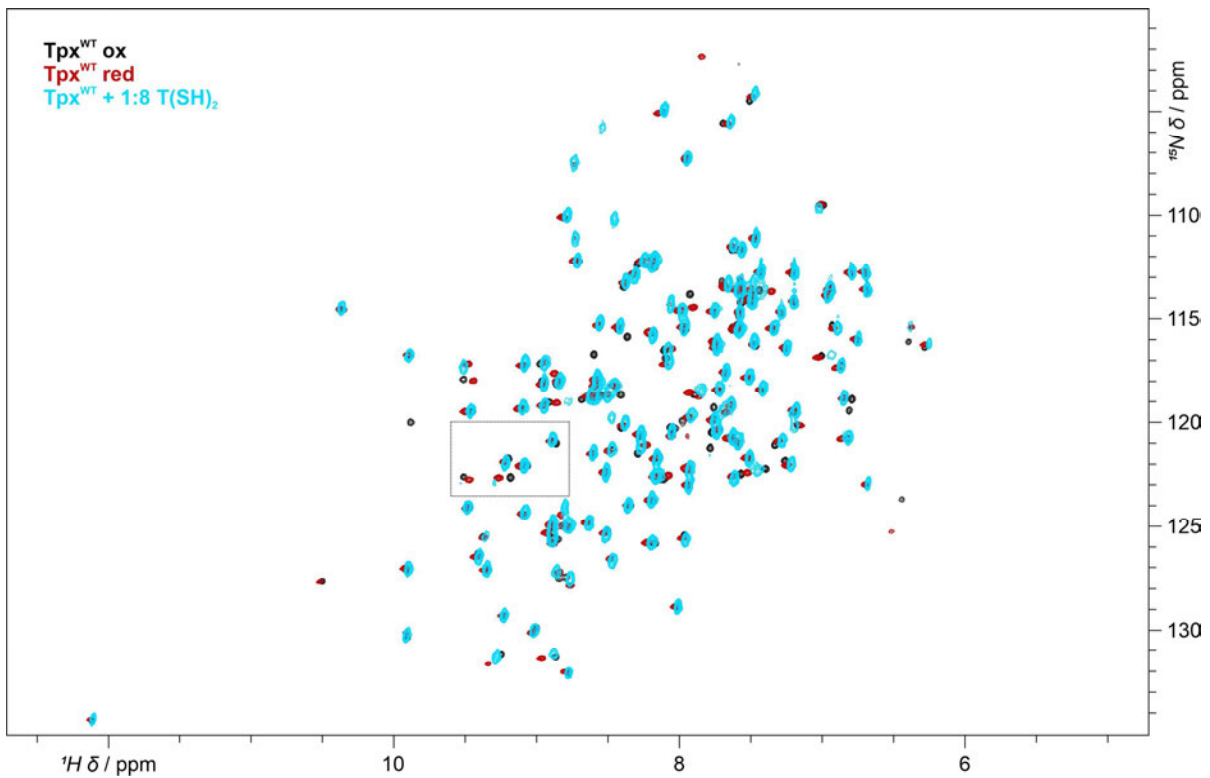


Abbildung 6-9 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektren des Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten, reduzierten und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand. Die NMR-Spektren wurden ohne Zusätze (schwarz), in Gegenwart von 2 mM TCEP (rot) oder 1:8 T(SH)<sub>2</sub> (hellblau) aufgenommen. Der Kasten kennzeichnet den Ausschnitt für Abbildung 3-16.

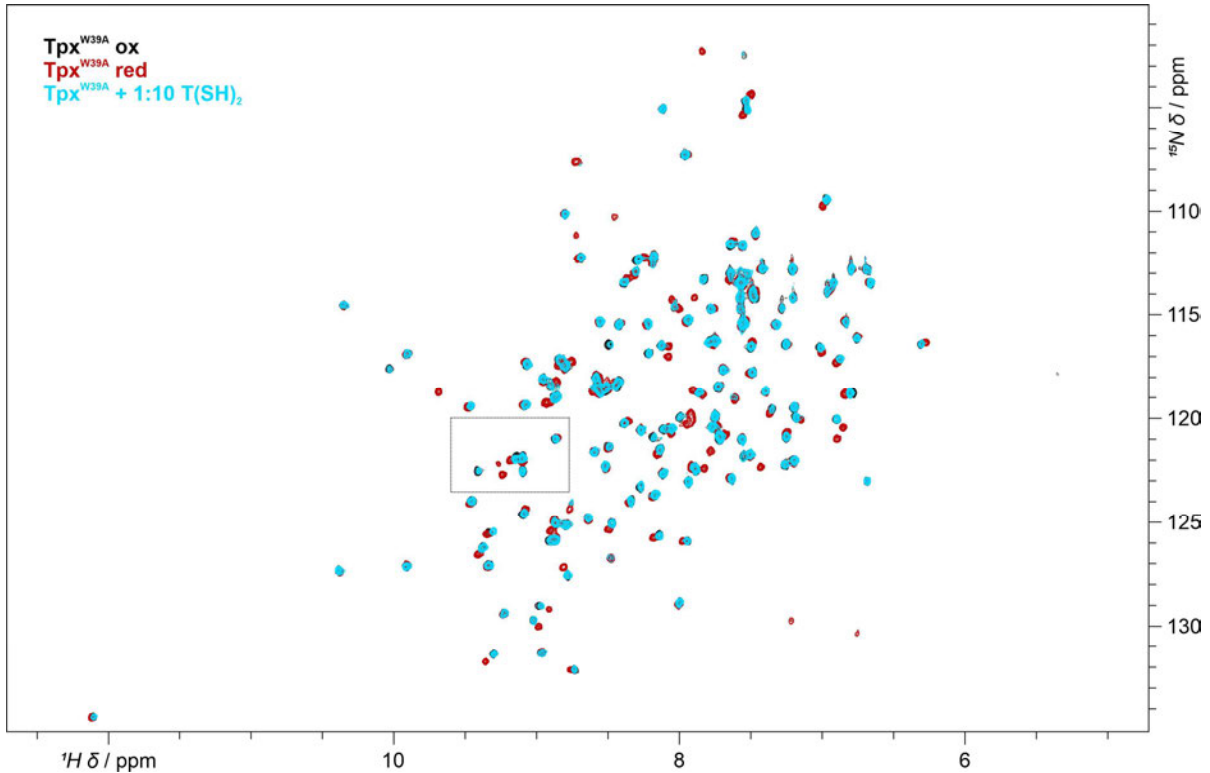


Abbildung 6-10 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektren von Tpx<sup>W39A</sup> im oxidierten, reduzierten und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand. Die NMR-Spektren wurden im oxidierten Zustand (schwarz), in Gegenwart von 2 mM TCEP (rot) oder 1:10 T(SH)<sub>2</sub> (hellblau) aufgenommen. Der Kasten kennzeichnet den Ausschnitt für Abbildung 3-16.

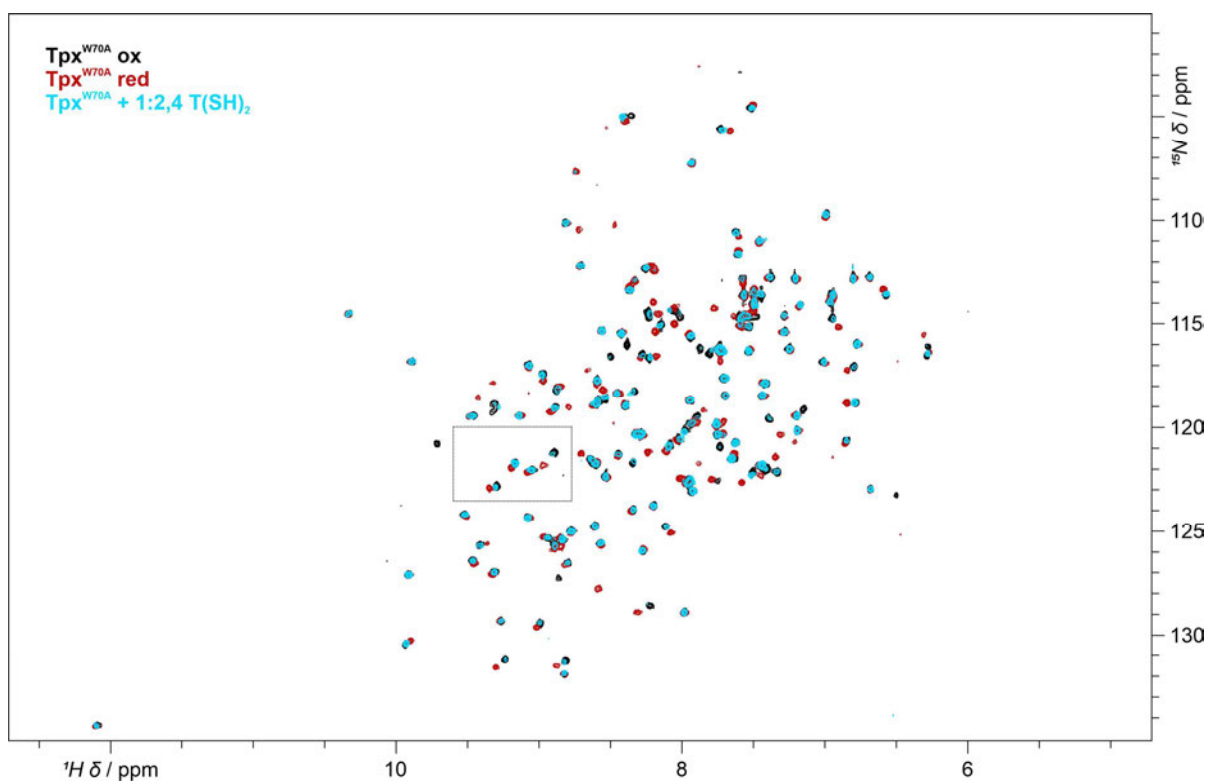


Abbildung 6-11 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektren des Tpx<sup>W70A</sup> im oxidierten, reduzierten und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand. Die NMR-Spektren wurden ohne Zusätze (schwarz), in Gegenwart von 2 mM TCEP (rot) oder 1:2,4 T(SH)<sub>2</sub> (hellblau) aufgenommen. Der Kasten kennzeichnet den Ausschnitt für Abbildung 3-16.

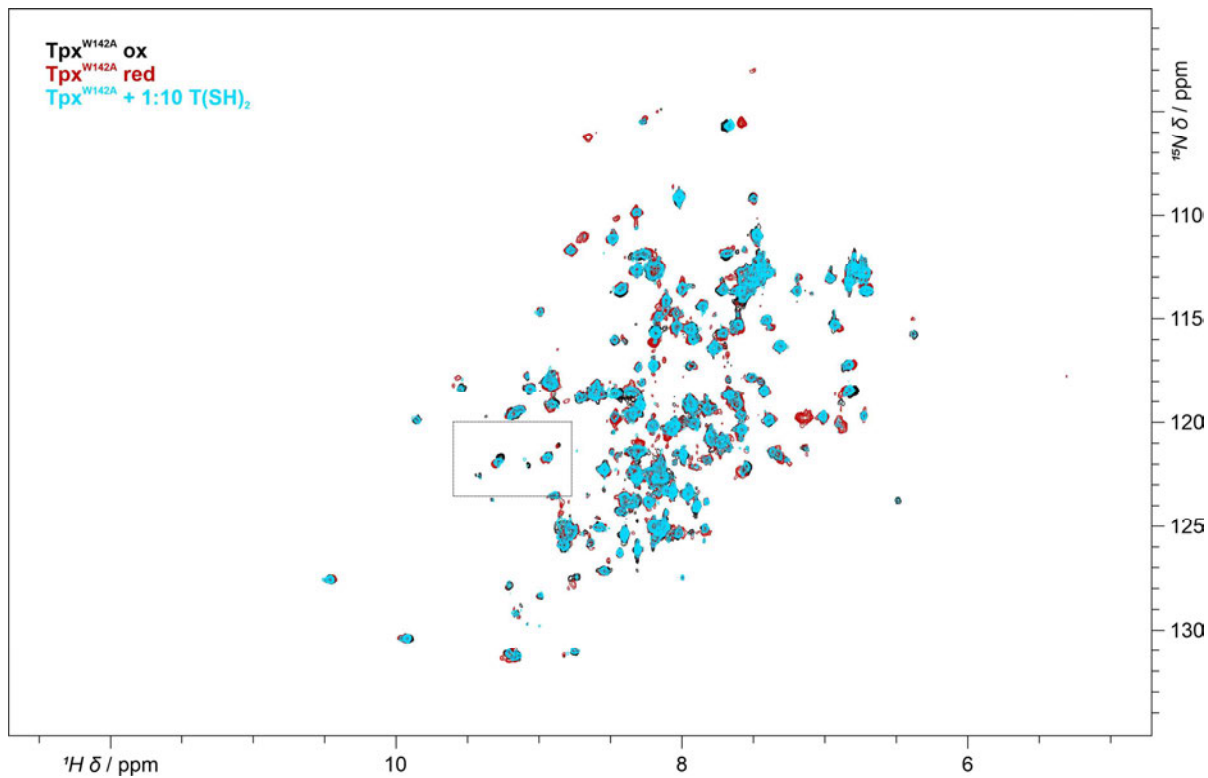


Abbildung 6-12 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2D HSQC-Spektren des Tpx<sup>W142A</sup> im oxidierten, reduzierten und T(SH)<sub>2</sub>-gebundenen Zustand. Die NMR-Spektren wurden ohne Zusätze (schwarz), in Gegenwart von 2 mM TCEP (rot) oder 1:10 T(SH)<sub>2</sub> (hellblau) aufgenommen. Der Kasten kennzeichnet den Ausschnitt für Abbildung 3-16.



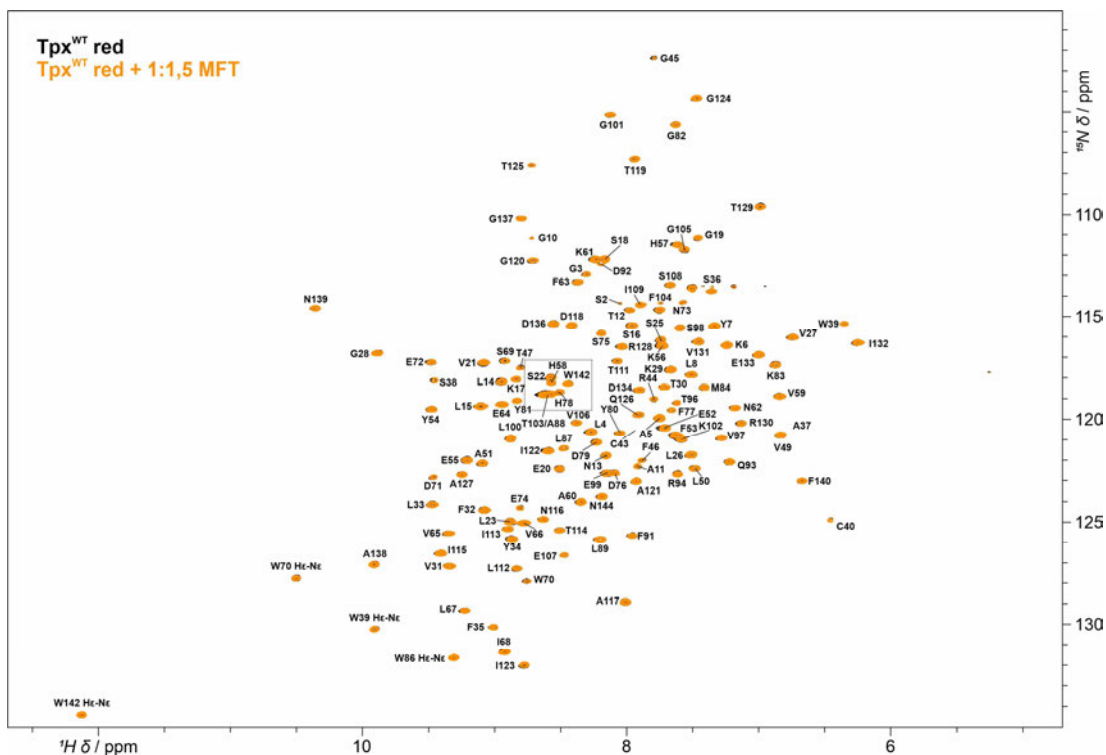


Abbildung 6-15  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Best-Trosy-HSQC-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> im reduzierten Zustand (schwarz) und in Anwesenheit von MFT (orange). Tpx<sup>WT</sup> wurde mittels 2 mM TCEP reduziert und MFT in einem 1:1,5 molaren Verhältnis Tpx:MFT zugegeben. Der gestrichelte Kasten kennzeichnet den Ausschnitt für Abbildung 3-21.

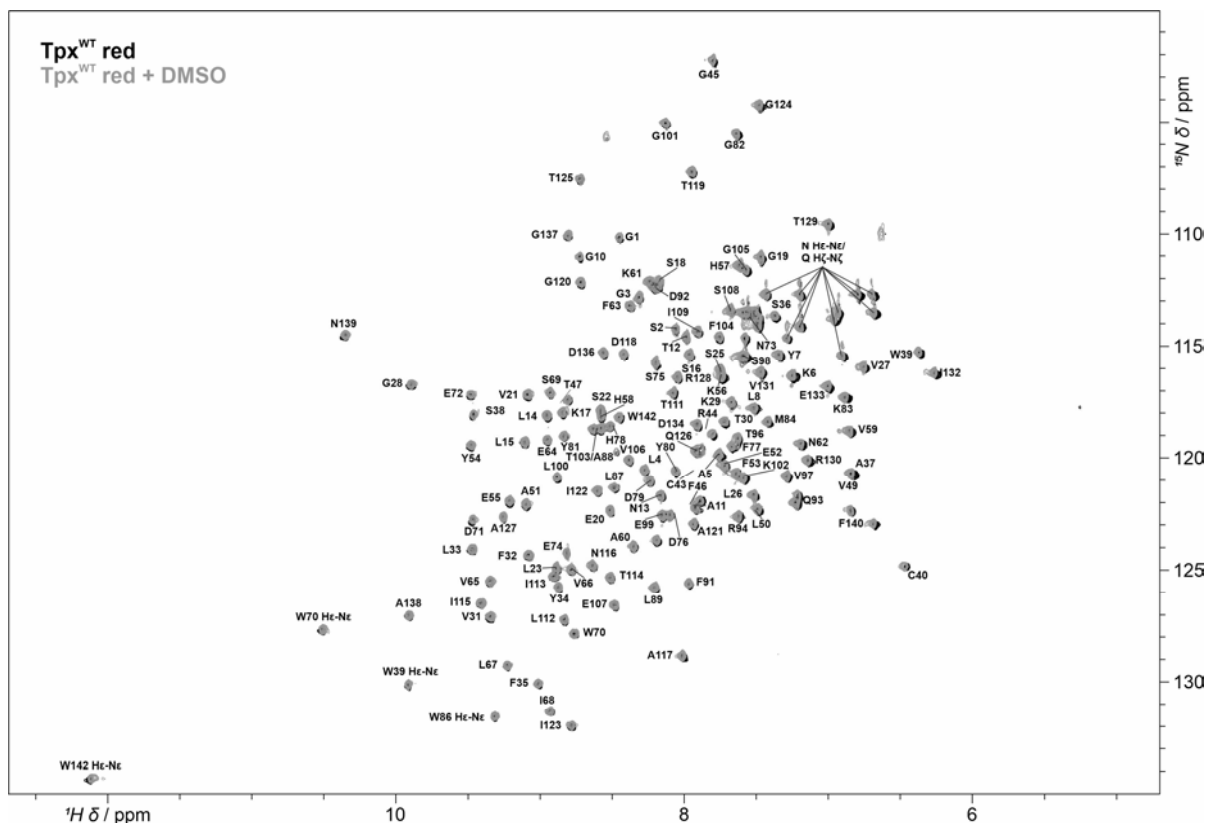


Abbildung 6-16  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HSQC-Spektren Tpx<sup>WT</sup> im reduzierten Zustand und in Anwesenheit von DMSO. Tpx<sup>WT</sup> wurde durch 2 mM TCEP reduziert (schwarz) und im nachfolgenden Schritt 1% DMSO hinzugefügt (grau).

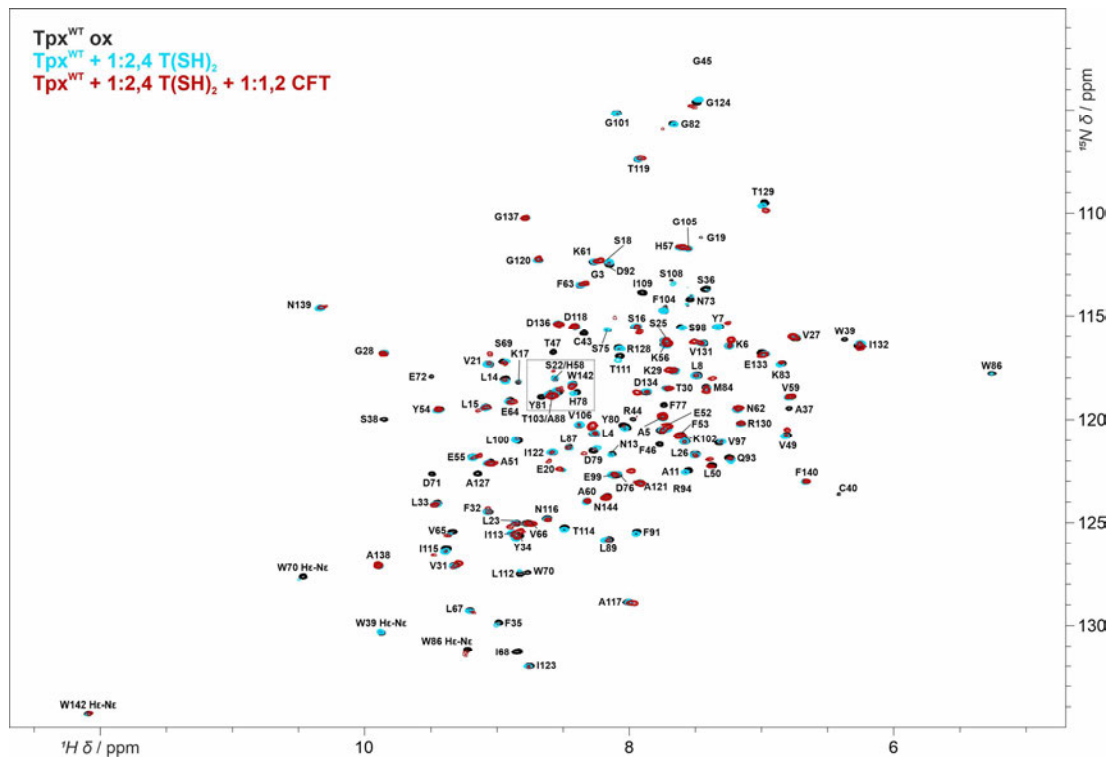


Abbildung 6-17  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Best-Trosy-HSQC-Spektren von  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  im oxidierten,  $\text{T(SH)}_2$ -gebundenen und CFT-gebundenen Zustand. Oxidiertem  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  (schwarz) wurde im ersten Schritt  $\text{T(SH)}_2$  (1:2,4 molares  $\text{Tpx}:\text{T(SH)}_2$  Verhältnis hellblau) und im zweiten Schritt CFT in einem 1:1,2  $\text{Tpx}:\text{CFT}$  Verhältnis hinzugefügt (rot). Der gestrichelte Kasten kennzeichnet den Ausschnitt für Abbildung 3-21.

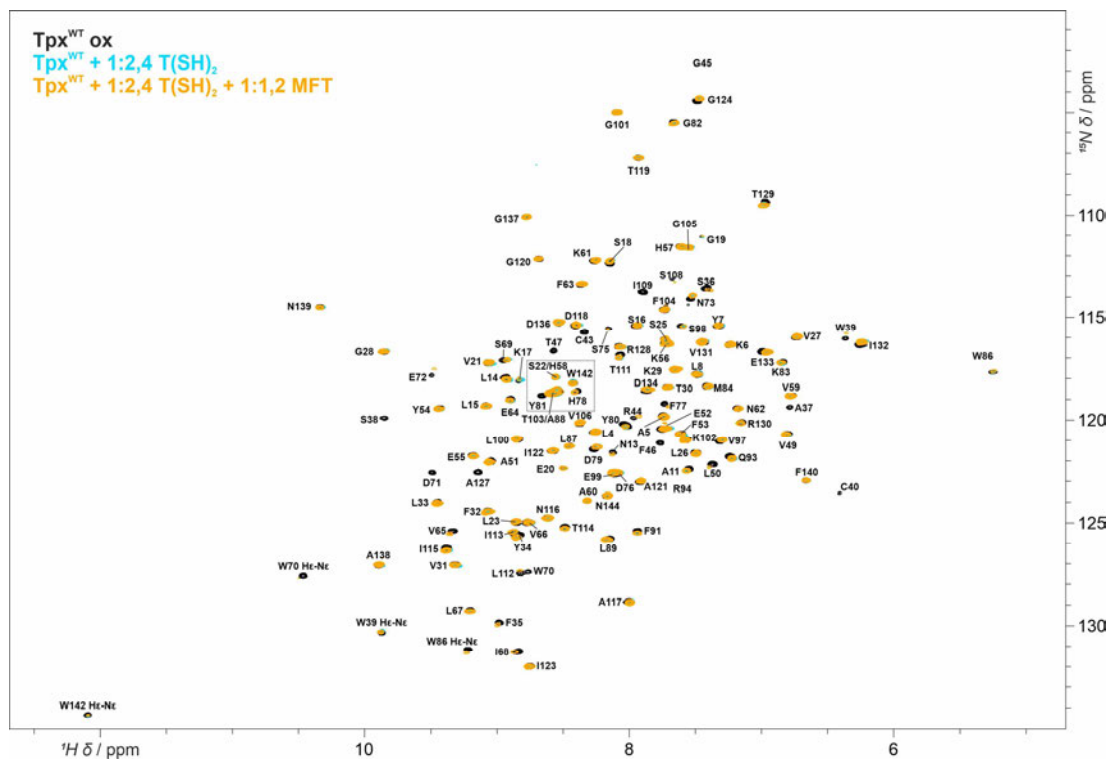


Abbildung 6-18  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Best-Trosy-HSQC-Spektren von  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  im oxidierten,  $\text{T(SH)}_2$ -gebundenen und CFT-gebundenen Zustand. Oxidiertem  $\text{Tpx}^{\text{WT}}$  (schwarz) wurde im ersten Schritt  $\text{T(SH)}_2$  (hellblau) und im zweiten Schritt MFT in einem 1:1,2  $\text{Tpx}:\text{MFT}$  Verhältnis hinzugefügt (orange). Der Kasten kennzeichnet den Ausschnitt dargestellt in Abbildung 3-21.

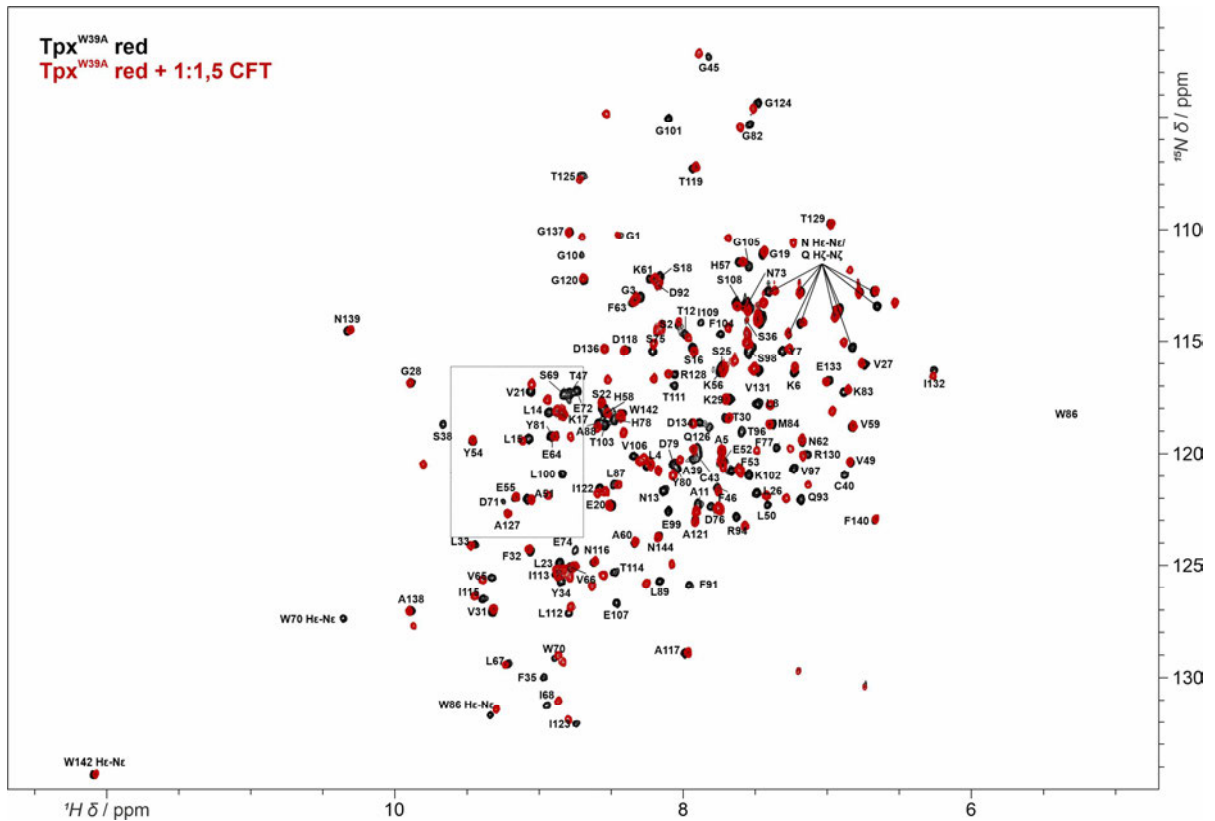


Abbildung 6-19  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D HSQC-Spektren von  $\text{Tp}x^{\text{W39A}}$  im reduzierten Zustand in An- und Abwesenheit von CFT.  $\text{Tp}x^{\text{W39A}}$  wurde im ersten Schritt mit 2 mM TCEP reduziert (schwarz) und im zweiten Schritt wurde CFT im molaren Verhältnis 1:1,5 hinzugefügt (rot). Der Kasten kennzeichnet den Ausschnitt Abbildung 3-35.

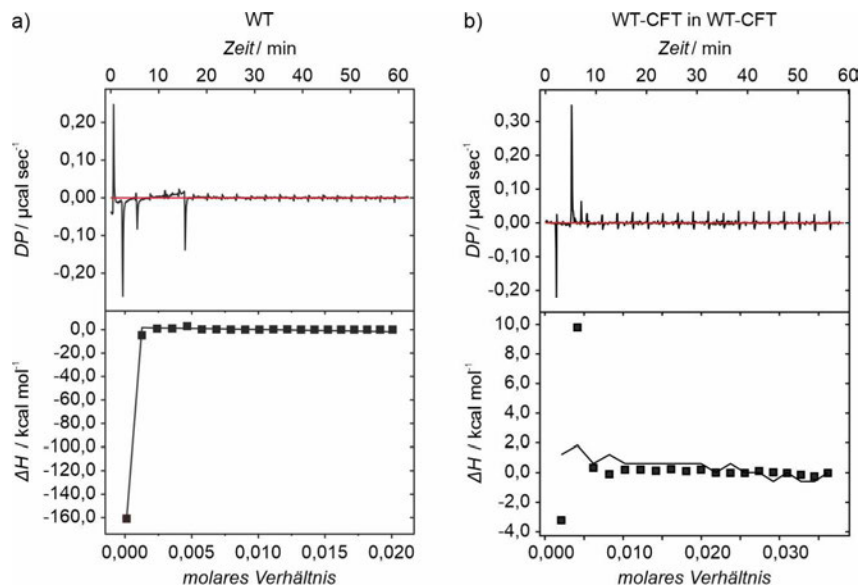


Abbildung 6-20 Thermogramme der Kontroll-Experimente der ITC-Messungen zur Bestimmung des  $K_D$ -Wertes des  $\text{Tp}x$ -CFT-Dimerkomplexes. Der obere Teil zeigt die Rohdaten der Titrationsmessungen; der untere Teil präsentiert die integrierten Hitzesignaturen und den Fit der Kurve. (a)  $\text{Tp}x^{\text{WT}}$  wurde in Abwesenheit von CFT in Puffer titriert. (b) Es wurde  $\text{Tp}x^{\text{WT}}$ -CFT in  $\text{Tp}x^{\text{WT}}$ -CFT, welches in der Messzelle vorgelegt wurde, titriert. Modifiziert nach Wagner et al., 2019.<sup>[111]</sup>

## 6.2 Tabellen

Tabelle 6-1  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ -,  $^{13}\text{C}\alpha$ -,  $^{13}\text{C}\beta$ - und  $^{13}\text{C}'$ -Resonanzen der NMR-Spektroskopie von Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten Zustand. Prolinreste sind durch grau unterlegte Zeilen gekennzeichnet und Glycinreste mit einem Gly in der Spalte für die Resonanz von C $\beta$ . Alle Werte sind in ppm angegeben.<sup>[117]</sup>

AS-Nummer	H	N	C $\alpha$	C $\beta$	C'
1				Gly	
2			58,114	34,387	175,591
3	8,293	112,610	43,749	Gly	172,141
4	8,263	120,468	54,153	39,617	175,052
5	7,748	119,670	51,323	15,212	175,707
6	7,248	116,228	55,530	29,289	174,445
7	7,326	115,332	54,995	37,016	171,530
8	7,490	117,671	48,569	39,847	170,454
9	Pro	Pro			
10			43,331	Gly	171,424
11	7,904	122,144	49,161	15,868	174,342
12	7,999	114,440	60,427	67,236	170,943
13	8,132	121,458	49,410	38,087	171,604
14	8,940	117,852	50,175	41,058	173,658
15	9,088	119,201	52,547	40,230	172,924
16	7,947	115,301	53,924	65,859	172,802
17	8,843	117,948	54,230	28,142	175,076
18	8,182	112,234	54,466	60,934	170,992
19	7,459	110,932	42,142	Gly	170,674
20	8,507	122,230	53,694	29,442	174,196
21	9,070	117,088	56,908	32,962	171,677
22	8,569	117,778	54,383	62,110	174,538
23	8,867	124,853	55,530	38,317	177,057
24			43,656	Gly	173,019
25	7,738	115,946	57,825	60,641	172,508
26	7,498	121,522	51,935	37,934	171,555
27	6,740	115,882	60,427	29,213	174,368
28	9,869	116,589	42,984	Gly	172,068
29	7,662	117,462	53,618	31,431	175,149
30	7,709	118,292	61,345	66,012	170,601
31	9,328	126,892	57,979	32,120	171,114
32	9,073	124,289	53,006	38,087	172,900
33	9,460	123,871	50,940	39,158	172,215
34	8,857	125,395	50,303	36,098	169,940
35	8,987	129,705	53,388	36,557	171,652
36	7,420	113,442	54,077	62,722	168,718
37	6,778	119,250	49,104	19,803	173,707
38	9,854	119,803	58,055	60,274	171,921

39	6,364	115,953	51,399	26,841	172,288
40	6,414	123,313	48,951	42,066	169,990
41	Pro	Pro			
42	Pro	Pro	62,798	27,606	177,276
43	8,342	115,571	61,192	30,360	173,046
44	8,018	120,145	56,609	27,293	176,788
45	7,583	102,562	43,366	Gly	172,141
46	7,772	121,041	57,061	37,934	173,584
47	8,587	116,539	66,777	65,553	
48	Pro	Pro	63,074	28,984	176,400
49	6,809	120,594	62,875	28,524	176,519
50	7,384	122,073	54,000	37,475	175,883
51	9,054	121,893	53,694	14,524	176,152
52	7,756	120,285	56,984	26,688	175,321
53	7,615	120,562	58,897	37,016	174,709
54	9,437	119,304	59,203	37,399	175,712
55	9,187	121,590	56,984	26,612	176,519
56	7,724	116,088	56,488	30,118	176,628
57	7,611	111,481	54,383	31,278	174,024
58	8,543	118,471	56,831	22,633	172,484
59	6,778	118,704	62,416	28,142	176,372
60	8,328	123,786	52,547	16,131	177,130
61	8,272	112,169	53,235	28,448	172,142
62	7,185	119,322	50,864	35,104	170,381
63	8,374	113,270	52,011	41,224	170,391
64	8,902	118,841	50,252	33,451	171,652
65	9,353	125,306	57,902	31,355	170,259
66	8,770	124,833	57,363	31,508	172,215
67	9,210	129,105	53,159	40,689	170,821
68	8,845	131,140	55,399	32,579	171,555
69	8,964	116,989	55,607	62,339	174,734
70	8,770	127,203	52,638	26,688	174,269
71	9,501	122,466	55,530	39,235	172,435
72	9,503	117,702	54,306	28,361	173,315
73	7,534	113,959	49,257	38,164	171,408
74	8,802	124,747	56,547	26,866	174,391
75	8,163	11,544	59,058	26,975	174,563
76	8,090	122,448	54,536	37,399	175,761
77	7,740	119,080	58,820	36,175	174,049
78	8,392	118,463	57,979	27,606	176,739
79	8,280	121,311	54,612	38,546	175,174
80	8,045	120,080	56,296	36,251	175,541
81	8,663	118,703	55,989	34,339	175,684
82	7,677	105,361	43,596	Gly	171,652

## 6 Anhang

83	6,846	117,089	52,853	29,519	173,389
84	7,412	118,224	49,716	28,983	172,215
85	Pro	Pro			172,563
86	5,292	117,525	52,870	24,386	171,579
87	8,455	121,113	52,394	41,989	175,394
88	8,601	118,537	49,103	18,538	172,949
89	8,159	125,666	49,819	40,459	171,359
90	Pro	Pro	61,115	29,748	174,543
91	7,943	125,242	58,900	35,942	172,117
92	8,147	112,238	52,317	36,710	174,880
93	7,240	121,662	51,170	23,169	174,562
94	7,545	122,279	55,913	29,060	177,179
95			63,133	65,952	174,298
96	7,637	118,987	63,332	65,776	172,739
97	7,318	120,905	65,323	28,830	176,421
98	7,615	115,265	58,667	59,662	174,771
99	8,131	122,518	56,678	26,688	176,788
100	8,857	120,811	55,224	40,459	176,698
101	8,100	104,881	45,049	Gly	173,780
102	7,576	120,836	56,219	29,519	176,886
103	8,595	118,597	63,911	66,054	172,949
104	7,748	114,507	54,842	36,787	172,313
105	7,556	111,482	44,667	Gly	172,388
106	8,382	120,017	60,580	28,065	172,406
107	8,447	126,448	53,242	28,682	173,193
108	7,678	112,926	53,771	62,569	168,718
109	7,897	113,613	55,530	37,705	169,403
110	Pro	Pro	58,667	33,727	173,089
111	8,069	116,711	60,427	70,602	169,109
112	8,836	127,321	50,711	43,825	172,582
113	8,867	125,295	55,950	36,049	171,555
114	8,492	125,075	59,050	65,323	171,041
115	9,387	126,121	56,143	39,770	172,019
116	8,625	124,605	50,558	37,093	173,022
117	8,006	128,677	53,082	17,278	174,807
118	8,413	115,265	54,077	38,011	175,834
119	7,936	107,148	58,820	68,077	174,587
120	8,695	112,033	42,754	Gly	169,672
121	7,924	122,847	50,099	16,437	173,853
122	8,590	121,382	58,473	34,554	174,293
123	8,759	131,889	59,968	36,481	173,535
124	7,490	104,300	42,984	Gly	169,378
125	8,711	107,496	58,963	67,423	172,802
126	7,959	119,735	52,011	26,153	174,514

127	9,167	122,462	52,853	16,207	174,049
128	8,076	116,295	56,525	26,841	173,707
129	6,973	109,107	61,421	66,088	173,707
130	7,153	120,062	54,459	24,852	174,660
131	7,435	116,059	61,727	28,524	173,413
132	6,265	116,329	59,891	34,721	175,027
133	6,996	116,572	54,383	27,912	173,266
134	7,869	118,429	48,875	38,546	170,503
135	Pro	Pro	62,339	29,136	175,594
136	8,543	115,127	51,323	38,164	173,853
137	8,789	109,934	45,279	Gly	172,973
138	9,900	126,943	52,776	15,442	177,497
139	10,349	114,391	48,921	36,863	172,044
140	6,669	122,830	53,235	36,863	170,332
141	Pro	Pro	61,039	27,530	169,042
142	8,429	118,062	55,148	22,174	169,280
143	Pro	Pro	60,427	29,060	174,526
144	8,175	123,554	52,929	37,322	176,543

Tabelle 6-2  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ -,  $^{13}\text{C}\alpha$ -,  $^{13}\text{C}\beta$ - und  $^{13}\text{C}'$ -Resonanzen der NMR-Spektroskopie von Tpx<sup>WT</sup> im reduzierten Zustand. Prolinreste sind durch grau unterlegte Zeilen gekennzeichnet und Glycine mit einem Gly in der C $\beta$ -Spalte. Alle Werte sind in ppm angegeben.<sup>[117]</sup>

AS-Nummer	H	N	C $\alpha$	C $\beta$	C'
1	8,44	110,098	42,466	Gly	170,894
2	8,052	114,192	55,485	61,591	172,982
3	8,306	112,717	43,783	Gly	172,209
4	8,268	120,402	54,153	39,617	175,052
5	7,748	119,732	51,21	15,212	175,656
6	7,245	116,263	55,53	29,289	174,394
7	7,336	115,315	54,995	37,016	171,56
8	7,516	117,669	48,569	39,847	170,454
9	Pro	Pro	60,993	28,634	175,323
10	8,716	110,996	43,355	Gly	171,432
11	7,927	122,097	49,161	15,868	174,342
12	7,971	114,457	60,427	67,236	170,943
13	8,154	121,608	49,41	38,087	171,604
14	8,941	118,025	50,175	41,058	173,658
15	9,108	119,217	52,547	40,23	172,924
16	7,958	115,296	53,924	65,859	172,802
17	8,833	117,812	54,23	28,142	175,076
18	8,181	112,135	54,466	60,934	170,992
19	7,465	110,968	42,142	Gly	170,674
20	8,507	122,23	53,694	29,442	174,196

## 6 Anhang

21	9,079	117,064	56,908	32,962	171,677
22	8,574	117,864	54,383	62,11	174,538
23	8,88	124,769	55,53	38,317	177,057
24	8,537	105,534	43,709	Gly	173,019
25	7,738	115,946	57,825	60,641	172,508
26	7,513	121,518	51,935	37,934	171,522
27	6,748	115,8	60,427	29,213	174,368
28	9,872	116,577	42,984	Gly	172,068
29	7,666	117,436	53,618	31,431	175,149
30	7,711	118,272	61,345	66,012	170,679
31	9,333	126,968	57,979	32,12	171,114
32	9,073	124,289	53,006	38,087	172,9
33	9,463	123,987	51,049	39,158	172,215
34	8,863	125,697	50,303	36,212	169,94
35	9,014	129,958	53,489	36,557	171,432
36	7,325	113,552	52,878	63,339	169,598
37			48,993	20,267	173,016
38	9,41	117,807	57,555	60,497	172,049
39	6,348	115,293	51,509	26,841	172,288
40	6,503	125,194	52,712	25,045	171,139
41	Pro	Pro			
42	Pro	Pro	63,969		178,255
43	7,93	120,595	50,914	26,704	174,318
44	7,847	118,566	56,609	27,293	177,252
45	7,823	102,26	43,201	Gly	172,105
46	7,934	122,087	57,061	37,934	174,331
47	8,862	117,529	66,777	65,553	175,076
48	Pro	Pro	63,074	28,335	176,4
49	6,856	120,666	62,875	28,859	176,519
50	7,511	122,295	54,098	37,475	176,011
51	9,095	121,927	53,694	14,524	176,152
52	7,706	120,181	57,058	26,688	175,367
53	7,643	120,657	58,966	37,016	174,709
54	9,477	119,324	59,284	37,514	175,712
55	9,2	121,72	56,984	26,612	176,519
56	7,736	116,052	56,546	30,118	176,619
57	7,612	111,369	54,383	31,342	174,024
58	8,587	118,09	56,711	22,633	172,364
59	6,837	118,674	62,416	28,142	176,372
60	8,344	123,822	52,547	16,131	177,13
61	8,242	112,045	53,179	28,448	172,142
62	7,185	119,322	50,864	35,104	170,381
63	8,362	113,156	52,011	41,224	170,391
64	8,936	119,047	50,252	33,451	171,606

65	9,351	125,411	57,902	31,355	170,339
66	8,77	124,833	57,52	31,508	172,215
67	9,215	129,154	53,331	40,689	170,821
68	8,946	131,232	55,399	32,297	171,652
69	8,918	116,921	56,49	62,339	174,84
70	8,744	127,684	53,037	26,688	174,538
71	9,451	122,545	55,53	39,235	172,142
72	9,456	116,987	54,306	28,56	173,387
73	7,526	113,591	49,257	38,164	171,408
74	8,806	124,31	56,386	26,821	174,391
75	8,19	115,491	59,058		174,563
76	8,057	122,412	54,536	37,399	175,932
77	7,649	119,354	58,82	36,175	173,693
78	8,479	118,495	57,865	27,336	176,739
79	8,21	120,978	54,612	38,546	175,061
80	8,034	120,544	55,938	36,612	175,541
81	8,835	118,906	55,989	34,339	175,907
82	7,643	105,464	43,596	Gly	171,652
83	6,888	117,178	52,853	29,519	173,389
84	7,423	118,27	49,716	28,983	172,215
85	Pro	Pro			
86			52,827	24,47	171,547
87	8,479	121,213	52,394	41,989	175,394
88	8,617	118,588	49,103	18,538	172,949
89	8,205	125,673	49,819	40,459	171,359
90	Pro	Pro	61,174	29,531	174,673
91	7,959	125,435	58,988	36,032	172,019
92	8,164	112,036	52,317	36,71	174,966
93	7,235	121,902	51,17	23,065	174,681
94	7,609	122,422	55,913	29,06	177,318
95			58,892		174,298
96	7,618	119,012	63,351	65,776	172,728
97	7,289	120,76	65,323	28,83	176,421
98	7,599	115,385	58,743	59,662	174,771
99	8,149	122,455	56,704	26,688	176,788
100	8,879	120,749	55,286	40,459	176,698
101	8,127	104,959	45,049	Gly	173,78
102	7,592	120,779	56,219	29,519	176,886
103	8,575	118,617	63,911	66,054	172,949
104	7,755	114,505	54,842	36,787	172,313
105	7,564	111,543	44,667	Gly	172,41
106	8,375	119,97	60,728	28,065	172,508
107	8,47	126,425	53,13	28,791	173,022
108	7,671	113,267	53,829	62,569	168,498

## 6 Anhang

109	7,881	114,322	55,53	37,705	168,987
110	Pro	Pro	58,667	33,727	173,98
111	8,089	117,066	60,642	70,818	169,351
112	8,818	127,073	50,635	43,825	172,826
113	8,905	125,166	55,794	35,844	171,652
114	8,508	125,193	59,133	65,269	171,041
115	9,402	126,347	56,143	39,64	172,019
116	8,625	124,605	50,689	37,093	173,022
117	8,006	128,677	53,082	17,278	174,807
118	8,413	115,265	54,166	38,011	175,834
119	7,936	107,148	58,82	68,077	174,587
120	8,715	112,089	42,754	Gly	169,672
121	7,924	122,847	50,099	16,437	173,853
122	8,59	121,382	58,473	34,554	174,293
123	8,779	131,873	59,968	36,481	173,535
124	7,47	104,149	42,984	Gly	169,378
125	8,711	107,496	58,963	67,423	172,924
126	7,913	119,565	52,011	26,153	174,636
127	9,247	122,503	52,853	16,207	174,049
128	8,027	116,242	56,525	26,841	173,845
129	6,988	109,372	61,539	66,088	173,798
130	7,136	120,022	54,459	24,852	174,66
131	7,462	116,051	61,857	28,524	173,413
132	6,261	116,135	59,891	34,721	175,027
133	7,014	116,706	54,383	27,912	173,336
134	7,91	118,416	48,875	38,546	170,503
135	Pro	Pro	62,339	29,136	175,594
136	8,543	115,127	51,323	38,164	173,853
137	8,801	109,969	45,279	Gly	172,973
138	9,896	126,901	52,776	15,442	177,497
139	10,349	114,391	48,921	36,863	172,044
140	6,669	122,83	53,235	36,863	170,332
141	Pro	Pro	61,039	27,53	169,042
142	8,439	118,078	55,148	22,174	169,28
143	Pro	Pro	60,427	29,06	174,526
144	8,191	123,592	52,929	37,322	176,543

Tabelle 6-3 NH-Verschiebungen der Aminosäuren (#) von Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten und reduzierten Zustand und die daraus resultierenden Unterschiede der chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$ . Alle Werte sind in ppm angegeben. Die grau unterlegten Zeilen repräsentieren Prolinreste.

#	Tpx <sup>WT</sup> oxidiert		Tpx <sup>WT</sup> reduziert		dH	dN	$\Delta\delta$
	H	N	H	N			
1			8,44	110,098			
2			8,052	114,192			
3	8,293	112,610	8,306	112,717	-0,013	-0,107	0,021
4	8,263	120,468	8,268	120,402	-0,005	0,066	0,011
5	7,748	119,670	7,748	119,732	0,000	-0,062	0,010
6	7,248	116,228	7,245	116,263	0,003	-0,035	0,006
7	7,326	115,332	7,336	115,315	-0,010	0,017	0,010
8	7,490	117,671	7,516	117,669	-0,026	0,002	0,026
9							
10			8,716	110,996			
11	7,904	122,144	7,927	122,097	-0,023	0,047	0,024
12	7,999	114,440	7,971	114,457	0,028	-0,017	0,028
13	8,132	121,458	8,154	121,608	-0,022	-0,150	0,032
14	8,940	117,852	8,941	118,025	-0,001	-0,173	0,027
15	9,088	119,201	9,108	119,217	-0,020	-0,016	0,020
16	7,947	115,301	7,958	115,296	-0,011	0,005	0,011
17	8,843	117,948	8,833	117,812	0,010	0,136	0,023
18	8,182	112,234	8,181	112,135	0,001	0,099	0,015
19	7,459	110,932	7,465	110,968	-0,006	-0,036	0,008
20	8,507	122,230	8,507	122,23	0,000	0,000	0,000
21	9,070	117,088	9,079	117,064	-0,009	0,024	0,010
22	8,569	117,778	8,574	117,864	-0,005	-0,086	0,014
23	8,867	124,853	8,88	124,769	-0,013	0,084	0,018
24			8,537	105,534			
25	7,738	115,946	7,738	115,946	0,000	0,000	0,000
26	7,498	121,522	7,513	121,518	-0,015	0,004	0,015
27	6,740	115,882	6,748	115,8	-0,008	0,082	0,015
28	9,869	116,589	9,872	116,577	-0,003	0,012	0,004
29	7,662	117,462	7,666	117,436	-0,004	0,026	0,006
30	7,709	118,292	7,711	118,272	-0,002	0,020	0,004
31	9,328	126,892	9,333	126,968	-0,005	-0,076	0,013
32	9,073	124,289	9,073	124,289	0,000	0,000	0,000
33	9,460	123,871	9,463	123,987	-0,003	-0,116	0,018
34	8,857	125,395	8,863	125,697	-0,006	-0,302	0,047
35	8,987	129,705	9,014	129,958	-0,027	-0,253	0,047
36	7,420	113,442	7,325	113,552	0,095	-0,110	0,096
37	6,778	119,250					
38	9,854	119,803	9,41	117,807	0,444	1,996	0,540
39	6,364	115,953	6,348	115,293	0,016	0,660	0,103

40	6,414	123,313	6,503	125,194	-0,089	-1,881	0,302
41							
42							
43	8,342	115,571	7,93	120,595	0,412	-5,024	0,875
44	8,018	120,145	7,847	118,566	0,171	1,579	0,297
45	7,583	102,562	7,823	102,26	-0,240	0,302	0,244
46	7,772	121,041	7,934	122,087	-0,162	-1,046	0,228
47	8,587	116,539	8,862	117,529	-0,275	-0,990	0,314
48							
49	6,809	120,594	6,856	120,666	-0,047	-0,072	0,048
50	7,384	122,073	7,511	122,295	-0,127	-0,222	0,131
51	9,054	121,893	9,095	121,927	-0,041	-0,034	0,041
52	7,756	120,285	7,706	120,181	0,050	0,104	0,052
53	7,615	120,562	7,643	120,657	-0,028	-0,095	0,032
54	9,437	119,304	9,477	119,324	-0,040	-0,020	0,040
55	9,187	121,590	9,2	121,72	-0,013	-0,130	0,024
56	7,724	116,088	7,736	116,052	-0,012	0,036	0,013
57	7,611	111,481	7,612	111,369	-0,001	0,112	0,017
58	8,543	118,471	8,587	118,09	-0,044	0,381	0,073
59	6,778	118,704	6,837	118,674	-0,059	0,030	0,059
60	8,328	123,786	8,344	123,822	-0,016	-0,036	0,017
61	8,272	112,169	8,242	112,045	0,030	0,124	0,036
62	7,185	119,322	7,185	119,322	0,000	0,000	0,000
63	8,374	113,270	8,362	113,156	0,012	0,114	0,021
64	8,902	118,841	8,936	119,047	-0,034	-0,206	0,046
65	9,353	125,306	9,351	125,411	0,002	-0,105	0,016
66	8,770	124,833	8,77	124,833	0,000	0,000	0,000
67	9,210	129,105	9,215	129,154	-0,005	-0,049	0,009
68	8,845	131,140	8,946	131,232	-0,101	-0,092	0,102
69	8,964	116,989	8,918	116,921	0,046	0,068	0,047
70	8,770	127,203	8,744	127,684	0,026	-0,481	0,078
71	9,501	122,466	9,451	122,545	0,050	-0,079	0,051
72	9,503	117,702	9,456	116,987	0,047	0,715	0,119
73	7,534	113,959	7,526	113,591	0,008	0,368	0,057
74	8,802	124,747	8,806	124,31	-0,004	0,437	0,067
75	8,163	115,436	8,19	115,491	-0,027	-0,055	0,028
76	8,090	122,448	8,057	122,412	0,033	0,036	0,033
77	7,740	119,080	7,649	119,354	0,091	-0,274	0,100
78	8,392	118,463	8,479	118,495	-0,087	-0,032	0,087
79	8,280	121,311	8,21	120,978	0,070	0,333	0,087
80	8,045	120,080	8,034	120,544	0,011	-0,464	0,072
81	8,663	118,703	8,835	118,906	-0,172	-0,203	0,175
82	7,677	105,361	7,643	105,464	0,034	-0,103	0,038
83	6,846	117,089	6,888	117,178	-0,042	-0,089	0,044

84	7,412	118,224	7,423	118,27	-0,011	-0,046	0,013
85							
86	5,292	117,525					
87	8,455	121,113	8,479	121,213	-0,024	-0,100	0,028
88	8,601	118,537	8,617	118,588	-0,016	-0,051	0,018
89	8,159	125,666	8,205	125,673	-0,046	-0,007	0,046
90							
91	7,943	125,242	7,959	125,435	-0,016	-0,193	0,034
92	8,147	112,238	8,164	112,036	-0,017	0,202	0,035
93	7,240	121,662	7,235	121,902	0,005	-0,240	0,037
94	7,545	122,279	7,609	122,422	-0,064	-0,143	0,068
95							
96	7,637	118,987	7,618	119,012	0,019	-0,025	0,019
97	7,318	120,905	7,289	120,76	0,029	0,145	0,037
98	7,615	115,265	7,599	115,385	0,016	-0,120	0,024
99	8,131	122,518	8,149	122,455	-0,018	0,063	0,020
100	8,857	120,811	8,879	120,749	-0,022	0,062	0,024
101	8,100	104,881	8,127	104,959	-0,027	-0,078	0,030
102	7,576	120,836	7,592	120,779	-0,016	0,057	0,018
103	8,595	118,597	8,575	118,617	0,020	-0,020	0,020
104	7,748	114,507	7,755	114,505	-0,007	0,002	0,007
105	7,556	111,482	7,564	111,543	-0,008	-0,061	0,012
106	8,382	120,017	8,375	119,97	0,007	0,047	0,010
107	8,447	126,448	8,47	126,425	-0,023	0,023	0,023
108	7,678	112,926	7,671	113,267	0,007	-0,341	0,053
109	7,897	113,613	7,881	114,322	0,016	-0,709	0,110
110							
111	8,069	116,711	8,089	117,066	-0,020	-0,355	0,058
112	8,836	127,321	8,818	127,073	0,018	0,248	0,042
113	8,867	125,295	8,905	125,166	-0,038	0,129	0,043
114	8,492	125,075	8,508	125,193	-0,016	-0,118	0,024
115	9,387	126,121	9,402	126,347	-0,015	-0,226	0,038
116	8,625	124,605	8,625	124,605	0,000	0,000	0,000
117	8,006	128,677	8,006	128,677	0,000	0,000	0,000
118	8,413	115,265	8,413	115,265	0,000	0,000	0,000
119	7,936	107,148	7,936	107,148	0,000	0,000	0,000
120	8,695	112,033	8,715	112,089	-0,020	-0,056	0,022
121	7,924	122,847	7,924	122,847	0,000	0,000	0,000
122	8,590	121,382	8,59	121,382	0,000	0,000	0,000
123	8,759	131,889	8,779	131,873	-0,020	0,016	0,020
124	7,490	104,300	7,47	104,149	0,020	0,151	0,031
125	8,711	107,496	8,711	107,496	0,000	0,000	0,000
126	7,959	119,735	7,913	119,565	0,046	0,170	0,053
127	9,167	122,462	9,247	122,503	-0,080	-0,041	0,080

128	8,076	116,295	8,027	116,242	0,049	0,053	0,050
129	6,973	109,107	6,988	109,372	-0,015	-0,265	0,043
130	7,153	120,062	7,136	120,022	0,017	0,040	0,018
131	7,435	116,059	7,462	116,051	-0,027	0,008	0,027
132	6,265	116,329	6,261	116,135	0,004	0,194	0,030
133	6,996	116,572	7,014	116,706	-0,018	-0,134	0,027
134	7,869	118,429	7,91	118,416	-0,041	0,013	0,041
135							
136	8,543	115,127	8,543	115,127	0,000	0,000	0,000
137	8,789	109,934	8,801	109,969	-0,012	-0,035	0,013
138	9,900	126,943	9,896	126,901	0,004	0,042	0,008
139	10,349	114,391	10,349	114,391	0,000	0,000	0,000
140	6,669	122,830	6,669	122,83	0,000	0,000	0,000
141							
142	8,429	118,062	8,439	118,078	-0,010	-0,016	0,010
143							
144	8,175	123,554	8,191	123,592	-0,016	-0,038	0,017

Tabelle 6-4 TALOS+-Vorhersage des  $\alpha$ -Helix-,  $\beta$ -Faltblatt-Anteil und der Anteil zufälliger Schleifen (engl. *random coil*) aller Aminosäuren (#) von Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten Zustand.

#	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	<i>Random coil</i>
1			
2	0,333	0,333	0,333
3	0,075	0,048	0,877
4	0,297	0,063	0,64
5	0,554	0,024	0,422
6	0,298	0,011	0,692
7	0,135	0,045	0,82
8	0,271	0,212	0,517
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0,029	0,029	0,943
12	0,002	0,045	0,953
13	0	0,18	0,82
14	0	0,602	0,398
15	0	0,56	0,44
16	0,017	0,134	0,849
17	0,005	0,029	0,966
18	0,009	0,077	0,915
19	0	0,379	0,621
20	0	0,676	0,324
21	0	0,8	0,2
22	0,017	0,672	0,311

23	0,186	0,099	0,714
24	0,291	0,033	0,676
25	0,169	0,056	0,774
26	0,13	0,053	0,817
27	0,03	0,065	0,906
28	0,003	0,056	0,941
29	0	0,05	0,95
30	0	0,314	0,686
31	0	0,858	0,142
32	0	0,983	0,017
33	0,003	0,98	0,017
34	0,012	0,988	0
35	0,008	0,951	0,04
36	0	0,583	0,417
37	0,001	0,246	0,753
38	0,013	0,09	0,898
39	0,021	0,155	0,824
40	0,271	0,212	0,517
41	0	0	0
42	0,279	0,203	0,518
43	0,895	0	0,104
44	0,73	0	0,27
45	0,267	0,012	0,721
46	0,088	0,035	0,878
47	0,385	0,025	0,59
48	0,946	0	0,054
49	0,997	0	0,003
50	0,985	0,002	0,013
51	0,99	0	0,01
52	0,99	0	0,01
53	0,988	0,003	0,009
54	0,991	0,001	0,008
55	0,958	0	0,042
56	0,773	0	0,227
57	0,7	0,005	0,296
58	0,915	0	0,085
59	0,947	0	0,053
60	0,713	0	0,287
61	0,218	0,003	0,779
62	0,038	0,058	0,904
63	0	0,531	0,469
64	0	0,91	0,09
65	0	0,984	0,016
66	0,002	0,99	0,007

---

67	0,004	0,977	0,019
68	0,002	0,86	0,138
69	0	0,401	0,599
70	0,005	0,138	0,857
71	0,004	0,053	0,943
72	0,018	0,048	0,934
73	0,032	0,051	0,917
74	0,64	0,038	0,322
75	0,954	0	0,046
76	0,987	0	0,013
77	0,992	0	0,008
78	0,989	0	0,011
79	0,959	0	0,041
80	0,794	0	0,206
81	0,335	0,012	0,653
82	0,058	0,011	0,931
83	0,018	0,019	0,963
84	0	0	1
85	0,01	0,013	0,978
86	0,038	0,015	0,947
87	0,006	0,147	0,846
88	0,003	0,594	0,403
89	0,012	0,163	0,825
90	0,035	0,171	0,793
91	0,317	0,176	0,508
92	0,231	0,02	0,749
93	0,162	0,032	0,806
94	0,787	0,016	0,197
95	0,975	0	0,025
96	0,996	0	0,004
97	0,998	0	0,002
98	0,99	0	0,01
99	0,98	0	0,02
100	0,944	0	0,056
101	0,88	0,001	0,119
102	0,839	0	0,161
103	0,673	0	0,327
104	0,175	0,012	0,813
105	0,015	0,046	0,939
106	0,009	0,063	0,928
107	0	0,153	0,847
108	0	0,222	0,778
109	0	0,179	0,821
110	0	0,437	0,563

111	0	0,838	0,162
112	0	0,977	0,023
113	0	0,978	0,022
114	0	0,944	0,056
115	0	0,898	0,102
116	0,015	0,727	0,258
117	0,134	0,143	0,723
118	0,144	0,022	0,834
119	0,049	0,019	0,932
120	0,007	0,056	0,936
121	0	0,229	0,771
122	0	0,635	0,365
123	0,015	0,372	0,613
124	0,008	0,067	0,926
125	0	0,037	0,963
126	0,029	0,047	0,923
127	0,469	0,052	0,479
128	0,653	0,004	0,342
129	0,547	0,006	0,447
130	0,424	0,015	0,56
131	0,616	0,018	0,366
132	0,38	0,007	0,613
133	0,106	0,013	0,881
134	0,016	0,006	0,978
135	0,005	0,024	0,971
136	0,011	0,027	0,962
137	0,049	0,049	0,902
138	0,036	0,024	0,941
139	0,023	0,061	0,916
140	0	0,034	0,966
141	0	0,043	0,957
142	0,003	0,024	0,973
143	0,032	0,049	0,919
144	0,333	0,333	0,333

Tabelle 6-5 TALOS+-Vorhersage des  $\alpha$ -Helix-,  $\beta$ -Faltblatt-Anteil und der Anteil zufälliger Schleifen (engl. *random coil*) aller Aminosäuren (#) von Tpx<sup>WT</sup> im reduzierten Zustand.

#	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	<i>Random coil</i>
1	0,008	0,041	0,951
2	0,018	0,051	0,93
3	0,189	0,066	0,745
4	0,789	0,012	0,199
5	0,856	0	0,144

---

6	0,664	0	0,336
7	0,283	0,024	0,693
8	0,036	0,023	0,941
9	0,005	0,053	0,942
10	0,011	0,027	0,962
11	0,002	0,028	0,97
12	0,001	0,064	0,935
13	0	0,308	0,692
14	0	0,74	0,26
15	0	0,75	0,25
16	0,014	0,194	0,792
17	0,013	0,036	0,951
18	0,018	0,059	0,923
19	0	0,226	0,774
20	0	0,596	0,404
21	0	0,761	0,239
22	0,065	0,338	0,597
23	0,817	0,041	0,143
24	0,813	0	0,187
25	0,625	0,002	0,373
26	0,404	0,024	0,572
27	0,078	0,068	0,854
28	0,019	0,083	0,898
29	0,008	0,071	0,921
30	0	0,275	0,725
31	0	0,849	0,151
32	0	0,99	0,01
33	0,006	0,985	0,009
34	0,011	0,989	0
35	0,005	0,968	0,028
36	0	0,81	0,19
37	0,003	0,485	0,512
38	0,027	0,128	0,844
39	0,044	0,121	0,835
40	0,334	0,227	0,438
41	0	0	0
42	0	0	0
43	0,06	0,027	0,913
44	0,148	0,027	0,825
45	0,475	0,044	0,482
46	0,864	0	0,135
47	0,971	0	0,029
48	0,996	0	0,004
49	0,995	0	0,005

50	0,994	0,002	0,004
51	0,995	0	0,005
52	0,994	0,001	0,005
53	0,996	0,003	0,001
54	0,995	0,001	0,003
55	0,985	0	0,015
56	0,92	0	0,08
57	0,904	0,004	0,092
58	0,973	0	0,027
59	0,984	0	0,016
60	0,84	0	0,16
61	0,342	0	0,658
62	0,056	0,057	0,887
63	0	0,653	0,347
64	0	0,949	0,051
65	0,002	0,987	0,01
66	0,004	0,989	0,007
67	0,005	0,981	0,014
68	0,007	0,876	0,117
69	0,005	0,349	0,646
70	0,023	0,104	0,873
71	0,025	0,045	0,929
72	0,055	0,056	0,889
73	0,068	0,043	0,889
74	0,787	0,023	0,19
75	0,981	0	0,019
76	0,991	0,001	0,008
77	0,995	0	0,005
78	0,994	0	0,006
79	0,98	0	0,02
80	0,914	0	0,086
81	0,671	0	0,329
82	0,227	0,012	0,761
83	0,087	0,033	0,88
84	0,334	0,227	0,438
85	0	0	0
86	0,343	0,206	0,451
87	0,019	0,667	0,314
88	0,01	0,757	0,233
89	0,003	0,212	0,785
90	0,082	0,161	0,757
91	0,627	0,117	0,256
92	0,516	0,008	0,476
93	0,702	0,01	0,287

---

94	0,857	0	0,143
95	0,949	0	0,051
96	0,995	0	0,005
97	0,994	0,002	0,004
98	0,995	0,001	0,005
99	0,991	0	0,009
100	0,985	0	0,015
101	0,97	0,001	0,029
102	0,955	0	0,045
103	0,818	0	0,182
104	0,295	0,016	0,689
105	0,047	0,047	0,906
106	0,031	0,101	0,869
107	0,001	0,294	0,705
108	0	0,354	0,646
109	0	0,26	0,74
110	0	0,592	0,408
111	0	0,87	0,13
112	0	0,979	0,021
113	0	0,982	0,018
114	0	0,951	0,049
115	0	0,91	0,09
116	0,033	0,705	0,262
117	0,586	0,136	0,278
118	0,476	0	0,524
119	0,158	0,017	0,825
120	0,028	0,035	0,936
121	0	0,18	0,82
122	0	0,575	0,425
123	0,016	0,475	0,509
124	0,014	0,074	0,912
125	0,009	0,041	0,95
126	0,07	0,05	0,881
127	0,795	0,022	0,183
128	0,928	0	0,072
129	0,874	0	0,126
130	0,859	0,001	0,14
131	0,902	0	0,098
132	0,744	0	0,256
133	0,275	0,006	0,72
134	0,036	0,004	0,96
135	0,011	0,029	0,96
136	0,063	0,048	0,889
137	0,287	0,071	0,642

138	0,169	0,018	0,813
139	0,047	0,051	0,902
140	0,012	0,047	0,942
141	0,011	0,04	0,949
142	0,013	0,021	0,966
143	0,052	0,056	0,893
144	0,333	0,333	0,333

Tabelle 6-6 Integrale der NH-Resonanzen der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -hetNOE- und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NONOE-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten Zustand aus zwei unabhängigen Messungen. Angegeben ist der Quotient aus diesen Messungen und der daraus resultierende Mittelwert  $\bar{\sigma}$ , sowie die Standardabweichung  $s$ . Prolinreste sind grau unterlegt.

#	hetNOE	hetNOE 2	NONOE	NONOE 2	hetNOE/ NONOE	hetNOE 2/HSQC 2	$\bar{\sigma}$	$s$
1								
2								
3	753970	797180	1209200	1170700	0,624	0,681	0,652	0,029
4	1126200	1020300	1686900	1710900	0,668	0,596	0,632	0,036
5	1459900	1398000	1765800	1822600	0,827	0,767	0,797	0,030
6	1144200	1106700	1601700	1569300	0,714	0,705	0,710	0,005
7	1072200	1087300	1391600	1470200	0,770	0,740	0,755	0,015
8	1169900	1258900	1706700	1692700	0,685	0,744	0,715	0,029
9								
10								
11	607770	636490	858510	919400	0,708	0,692	0,700	0,008
12	634720	641070	1391100	1297600	0,456	0,494	0,475	0,019
13	929020	956220	1566300	1592800	0,593	0,600	0,597	0,004
14	1801300	1790700	2353500	2472600	0,765	0,724	0,745	0,021
15	1255800	1212700	1538700	1477100	0,816	0,821	0,819	0,002
16	1321900	1298200	1732700	1692000	0,763	0,767	0,765	0,002
17	1130700	1130200	1558700	1660700	0,725	0,681	0,703	0,022
18	929370	905430	1214100	1181900	0,765	0,766	0,766	0,000
19	474630	355280	1409000	1362500	0,337	0,261	0,299	0,038
20	201380	162270	1337000	1456600	0,151	0,111	0,131	0,020
21	1169900	1111300	1439400	1540500	0,813	0,721	0,767	0,046
22	1164800	1240300	1581700	1657500	0,736	0,748	0,742	0,006
23	1218100	1184300	1536600	1582200	0,793	0,749	0,771	0,022
24								
25	1062900	1063200	1329300	1299600	0,800	0,818	0,809	0,009
26	1139100	1168700	1561100	1547400	0,730	0,755	0,742	0,013
27	1117200	1112200	1499700	1361100	0,745	0,817	0,781	0,036
28	966090	960310	1266600	1276100	0,763	0,753	0,758	0,005
29	1230400	1253300	1497900	1546300	0,821	0,811	0,816	0,005

## 6 Anhang

30	1211900	1157600	1492300	1560200	0,812	0,742	0,777	0,035
31	1355800	1384800	1762100	1743100	0,769	0,794	0,782	0,013
32	1354500	1377100	1661800	1602800	0,815	0,859	0,837	0,022
33	1285800	1312900	1478700	1525200	0,870	0,861	0,865	0,004
34	995950	988840	1274600	1371500	0,781	0,721	0,751	0,030
35	1146800	1140900	1322400	1424500	0,867	0,801	0,834	0,033
36	331280	345270	453190	535490	0,731	0,645	0,688	0,043
37	291100	271590	318070	353300	0,915	0,769	0,842	0,073
38	166930	196290	244060	224920	0,684	0,873	0,778	0,094
39	408750	456210	502140	486240	0,814	0,938	0,876	0,062
40	175310	156730	186840	221150	0,938	0,709	0,823	0,115
41								
42								
43	358670	354210	466070	437330	0,770	0,810	0,790	0,020
44	404890	462370	531340	571140	0,762	0,810	0,786	0,024
45	193130	211900	196660	137900	0,982	1,537	1,000	0,277
46	269660	327640	368240	385880	0,732	0,849	0,791	0,058
47	265750	268370	322450	341490	0,824	0,786	0,805	0,019
48								
49	413360	358350	495850	559080	0,834	0,641	0,737	0,096
50	301410	276160	356200	381990	0,846	0,723	0,785	0,062
51	1427800	1421200	1679200	1577900	0,850	0,901	0,875	0,025
52	483450	457400	621110	595330	0,778	0,768	0,773	0,005
53	1358700	1365800	1689900	1639300	0,804	0,833	0,819	0,015
54	1292300	1217300	1420100	1599700	0,910	0,761	0,835	0,075
55	1274500	1214400	1557700	1429900	0,818	0,849	0,834	0,016
56	1832100	1806800	2248000	2215000	0,815	0,816	0,815	0,000
57	1348700	1332800	1676200	1627000	0,805	0,819	0,812	0,007
58	848580	910080	1164000	1226500	0,729	0,742	0,736	0,006
59	1240800	1291500	1352800	1452200	0,917	0,889	0,903	0,014
60	1208100	1283900	1462100	1452700	0,826	0,884	0,855	0,029
61	1350700	1326200	1739800	1641300	0,776	0,808	0,792	0,016
62	1262800	1354700	1816200	1808900	0,695	0,749	0,722	0,027
63	1422700	1478900	1709900	1658100	0,832	0,892	0,862	0,030
64	1431500	1353300	1600600	1587900	0,894	0,852	0,873	0,021
65	1142000	1243500	1485500	1503700	0,769	0,827	0,798	0,029
66	1896000	1885800	2274000	2319200	0,834	0,813	0,823	0,010
67	1099500	1172900	1298900	1415100	0,846	0,829	0,838	0,009
68	311330	327960	378960	384270	0,822	0,853	0,838	0,016
69	397480	327800	441020	430900	0,901	0,761	0,831	0,070
70	771220	722750	925280	974720	0,833	0,741	0,787	0,046
71	214430	249250	293730	346380	0,730	0,720	0,725	0,005
72	144350	120180	193550	205320	0,746	0,585	0,666	0,080
73	1332900	1332800	1919400	1929900	0,694	0,691	0,693	0,002

74	1042300	1058500	1296100	1315200	0,804	0,805	0,805	0,000
75	1183200	1175500	1517500	1467800	0,780	0,801	0,790	0,011
76	2406800	2305700	2929300	2976900	0,822	0,775	0,798	0,024
77	254730	310420	297010	332260	0,858	0,934	0,896	0,038
78	537670	516570	636850	688270	0,844	0,751	0,797	0,047
79	306980	346680	434720	401060	0,706	0,864	0,785	0,079
80	388650	384250	428690	469430	0,907	0,819	0,863	0,044
81	341900	312500	351650	402680	0,972	0,776	0,874	0,098
82	1179500	1213700	1522900	1498500	0,775	0,810	0,792	0,018
83	193900	211240	323410	354150	0,600	0,596	0,598	0,002
84	1155400	1252300	1537900	1555900	0,751	0,805	0,778	0,027
85								
86	66340	20397	78346	119570	0,847	0,171	0,509	0,338
87	1083000	1143600	1316300	1405800	0,823	0,813	0,818	0,005
88	1821700	1819800	2241700	2180600	0,813	0,835	0,824	0,011
89	429930	444090	579710	592090	0,742	0,750	0,746	0,004
90								
91	1115700	1124800	1309900	1501400	0,852	0,749	0,800	0,051
92	1390000	1332000	1752800	1755400	0,793	0,759	0,776	0,017
93	1109000	1105100	1473100	1500500	0,753	0,736	0,745	0,008
94	1239700	1172800	1509200	1588900	0,821	0,738	0,780	0,042
95								
96	651620	709590	826850	804270	0,788	0,882	0,835	0,047
97	1057900	1067000	1325300	1394300	0,798	0,765	0,782	0,016
98	1223900	1245300	1549800	1449000	0,790	0,859	0,825	0,035
99	1225800	1254200	1532900	1631400	0,800	0,769	0,784	0,015
100	1089600	1061600	1291000	1407500	0,844	0,754	0,799	0,045
101	1139200	1166500	1343900	1364900	0,848	0,855	0,851	0,003
102	1459500	1470700	1884200	1919500	0,775	0,766	0,770	0,004
103	3033500	2987100	3816600	3812000	0,795	0,784	0,789	0,006
104	1271900	1350800	1622500	1619600	0,784	0,834	0,809	0,025
105	1406900	1402200	1751000	1817300	0,803	0,772	0,788	0,016
106	1198900	1230000	1465200	1576200	0,818	0,780	0,799	0,019
107	625700	648830	800060	812580	0,782	0,798	0,790	0,008
108	985830	947780	1303600	1345500	0,756	0,704	0,730	0,026
109	225090	227030	312990	317960	0,719	0,714	0,717	0,003
110								
111	331780	303230	416810	409600	0,796	0,740	0,768	0,028
112	244630	283450	327530	330030	0,747	0,859	0,803	0,056
113	582140	621110	739850	812980	0,787	0,764	0,775	0,011
114	1180800	1193000	1464100	1491700	0,807	0,800	0,803	0,003
115	1319200	1347800	1608900	1655000	0,820	0,814	0,817	0,003
116	1148000	1232900	1412100	1479900	0,813	0,833	0,823	0,010
117	1188200	1247500	1498100	1515800	0,793	0,823	0,808	0,015

118	1289800	1247500	1629600	1637000	0,791	0,762	0,777	0,015
119	1124300	1123500	1379500	1443100	0,815	0,779	0,797	0,018
120	1118400	1154800	1362300	1379700	0,821	0,837	0,829	0,008
121	1231500	1329000	1616100	1691900	0,762	0,786	0,774	0,012
122	1184400	1172200	1480900	1500200	0,800	0,781	0,791	0,009
123	936900	851890	1124900	1237500	0,833	0,688	0,761	0,072
124	1098900	1031000	1255500	1264100	0,875	0,816	0,845	0,030
125	599020	526220	619670	673290	0,967	0,782	0,874	0,093
126	983000	967580	1143600	1271300	0,860	0,761	0,810	0,049
127	239440	289700	327500	324040	0,731	0,894	0,813	0,081
128	372760	397060	514540	461050	0,724	0,861	0,793	0,068
129	976860	965980	1305700	1291300	0,748	0,748	0,748	0,000
130	946730	924080	1251100	1159900	0,757	0,797	0,777	0,020
131	1205400	1197100	1477100	1437300	0,816	0,833	0,824	0,008
132	1131000	1145600	1565300	1436300	0,723	0,798	0,760	0,038
133	994000	979490	1296600	1321600	0,767	0,741	0,754	0,013
134	2005700	1979200	2627100	2654900	0,763	0,745	0,754	0,009
135								
136	1124700	1128900	1556100	1535300	0,723	0,735	0,729	0,006
137	1079600	1112600	1359700	1348100	0,794	0,825	0,810	0,016
138	1192000	1228200	1572500	1593600	0,758	0,771	0,764	0,006
139	1172500	1220600	1409100	1465600	0,832	0,833	0,832	0,000
140	1107400	1088200	1405100	1418100	0,788	0,767	0,778	0,010
141								
142	1249000	1204400	1454900	1496200	0,858	0,805	0,832	0,027
143								
144	1138500	1235000	1741300	1781300	0,654	0,693	0,674	0,020

Tabelle 6-7 Integrale der NH-Resonanzen der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -hetNOE- und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NONOE-Spektren von Tpx<sup>WT</sup> im reduzierten Zustand aus zwei unabhängigen Messungen. Angegeben ist der Quotient aus diesen Messungen und der daraus resultierende Mittelwert  $\bar{\sigma}$ , sowie die Standardabweichung  $s$ . Prolinreste sind grau unterlegt.

#	hetNOE	hetNOE 2	NONOE	NONOE 2	hetNOE/ HSQC	hetNOE 2/HSQC	$\bar{\sigma}$	$s$
1	-73915	-172130	1335300	1537500	-0,055	-0,112	-0,084	0,028
2	510160	544740	1661300	1732200	0,307	0,314	0,311	0,004
3	1515700	1504800	2323600	2484400	0,652	0,606	0,629	0,023
4	1743200	1670800	2652300	2606700	0,657	0,641	0,649	0,008
5	2104700	2058600	2581000	2802700	0,815	0,735	0,775	0,040
6	1744400	1769600	2581500	2428900	0,676	0,729	0,702	0,026
7	1790000	1800600	2582300	2424500	0,693	0,743	0,718	0,025
8	1997200	1848100	2681700	2525800	0,745	0,732	0,738	0,007
9								
10	1052700	1170400	1434500	1553000	0,734	0,754	0,744	0,010

11	3459300	3535100	4909600	4867200	0,705	0,726	0,715	0,011
12	1444900	1395000	2827200	2677100	0,511	0,521	0,516	0,005
13	1637500	1635100	2768000	2775700	0,592	0,589	0,590	0,001
14	1826200	1742800	2432300	2409600	0,751	0,723	0,737	0,014
15	2081200	1936300	2608700	2541600	0,798	0,762	0,780	0,018
16	2135700	2029900	2953900	2726500	0,723	0,745	0,734	0,011
17	1958000	1850900	2786200	2766200	0,703	0,669	0,686	0,017
18	1536000	1623800	2098300	2275200	0,732	0,714	0,723	0,009
19	678320	723320	2499400	2548200	0,271	0,284	0,278	0,006
20	410120	411170	2669400	2745500	0,154	0,150	0,152	0,002
21	2025800	1942000	2660800	2667600	0,761	0,728	0,745	0,017
22	2269800	2339200	3070700	3077000	0,739	0,760	0,750	0,011
23	1708100	1697300	2302800	2224900	0,742	0,763	0,752	0,011
24	682100	847860	878940	953820	0,776	0,889	0,832	0,056
25	1729700	1642300	2126100	2051600	0,814	0,800	0,807	0,007
26	1881000	1883600	2494600	2414400	0,754	0,780	0,767	0,013
27	1724500	1709500	2394200	2375900	0,720	0,720	0,720	0,000
28	1539200	1508100	2143300	2089200	0,718	0,722	0,720	0,002
29	2134400	2025700	2664300	2550600	0,801	0,794	0,798	0,003
30	2237800	1975600	2751600	2461900	0,813	0,802	0,808	0,005
31	2333900	2280100	2873600	2840300	0,812	0,803	0,807	0,005
32	2113100	2134600	2468500	2482200	0,856	0,860	0,858	0,002
33	2103600	2078600	2628200	2561700	0,800	0,811	0,806	0,006
34	2155000	2212900	2773200	2701300	0,777	0,819	0,798	0,021
35	2050100	1922100	2470400	2374700	0,830	0,809	0,820	0,010
36	2125600	2075200	2734100	2714100	0,777	0,765	0,771	0,006
37								
38	1634500	1482900	1815100	1863800	0,901	0,796	0,848	0,052
39	2189900	2037600	2515400	2484100	0,871	0,820	0,845	0,025
40	735650	317740	987390	417930	0,745	0,760	0,753	0,008
41								
42								
43	401360	210270	469580	203340	0,855	1,034	0,944	0,090
44	1948300	1724900	2181500	2015400	0,893	0,856	0,874	0,019
45	1549700	1531200	1944100	1918600	0,797	0,798	0,798	0,000
46	3459300	3535100	4909600	4867200	0,705	0,726	0,715	0,011
47	1027500	810150	1180300	962340	0,871	0,842	0,856	0,014
48								
49	2033900	1876600	2454400	2444600	0,829	0,768	0,798	0,031
50	1955900	1839800	2472600	2432300	0,791	0,756	0,774	0,017
51	2436200	2250000	2944200	2627800	0,827	0,856	0,842	0,014
52	2973000	2748100	3859700	3456200	0,770	0,795	0,783	0,012
53	2404900	2189100	2996300	2792500	0,803	0,784	0,793	0,009
54	2029000	2072200	2612700	2653600	0,777	0,781	0,779	0,002

## 6 Anhang

55	2134400	1972400	2742200	2449900	0,778	0,805	0,792	0,013
56	2612200	2634600	3255200	3161700	0,802	0,833	0,818	0,015
57	1968700	1864500	2456900	2406100	0,801	0,775	0,788	0,013
58	2136000	2281300	2648600	2730800	0,806	0,835	0,821	0,014
59	2238800	2088900	2799900	2752300	0,800	0,759	0,779	0,020
60	2076900	2092200	2558400	2427600	0,812	0,862	0,837	0,025
61	1934900	1809100	2293100	2342800	0,844	0,772	0,808	0,036
62	2328900	2262700	3816200	4115600	0,610	0,550	0,580	0,030
63	2638000	2420000	3118600	2876000	0,846	0,841	0,844	0,002
64	2383300	2162200	2735800	2719100	0,871	0,795	0,833	0,038
65	1856000	1840600	2300700	2289100	0,807	0,804	0,805	0,001
66	2821200	2581800	3481600	3242300	0,810	0,796	0,803	0,007
67	1840800	1832800	2287200	2210200	0,805	0,829	0,817	0,012
68	1913800	1865400	2281400	2291500	0,839	0,814	0,826	0,012
69	2565900	2413900	3131800	3002600	0,819	0,804	0,812	0,008
70	1864800	1763800	2358800	2119900	0,791	0,832	0,811	0,021
71	1728400	1564500	1973900	2025600	0,876	0,772	0,824	0,052
72	1387300	1371900	2123700	2115200	0,653	0,649	0,651	0,002
73	1519200	1264300	2609800	2048700	0,582	0,617	0,600	0,018
74	1546100	1714900	1831700	1964500	0,844	0,873	0,859	0,014
75	2126900	2033600	2773200	2604200	0,767	0,781	0,774	0,007
76	1801400	1370400	2265500	1904000	0,795	0,720	0,757	0,038
77	2325400	2329900	2814800	2885900	0,826	0,807	0,817	0,009
78	2644900	2313700	3207900	2969400	0,824	0,779	0,802	0,023
79	2266300	2238100	2836200	2915300	0,799	0,768	0,783	0,016
80	2213900	2084800	2701100	2529800	0,820	0,824	0,822	0,002
81	2430700	2133500	2858100	2644500	0,850	0,807	0,829	0,022
82	1954300	2026700	2414100	2507200	0,810	0,808	0,809	0,001
83	1736200	1677000	2497300	2379000	0,695	0,705	0,700	0,005
84	2067400	1983200	2685000	2629000	0,770	0,754	0,762	0,008
85								
86								
87	1786700	1812700	2142800	2296500	0,834	0,789	0,812	0,022
88	2124900	2123800	2590500	2658400	0,820	0,799	0,810	0,011
89	2110600	2026900	2523900	2519500	0,836	0,804	0,820	0,016
90								
91	1925100	1793200	2377100	2330700	0,810	0,769	0,790	0,020
92	2138000	2133300	2884400	2863500	0,741	0,745	0,743	0,002
93	1839700	1806900	2539200	2488100	0,725	0,726	0,725	0,001
94	2088300	1896500	2653100	2614400	0,787	0,725	0,756	0,031
95								
96	1703000	1749400	2132100	2112100	0,799	0,828	0,814	0,015
97	1837400	1816700	2382700	2390500	0,771	0,760	0,766	0,006
98	2213400	2344200	3080500	2984700	0,719	0,785	0,752	0,033

99	2628800	2839000	3364800	3688600	0,781	0,770	0,775	0,006
100	1903200	1862000	2384000	2358700	0,798	0,789	0,794	0,004
101	2015000	2012500	2477100	2394600	0,813	0,840	0,827	0,013
102	2455300	2231700	3194300	3040300	0,769	0,734	0,751	0,017
103	2880500	2496200	3617000	3344000	0,796	0,746	0,771	0,025
104	2309000	2189300	2827800	2532600	0,817	0,864	0,840	0,024
105	2189700	2148200	2881000	2713500	0,760	0,792	0,776	0,016
106	2109800	2029900	2659800	2744500	0,793	0,740	0,766	0,027
107	1518200	1442900	2037900	1946800	0,745	0,741	0,743	0,002
108	2070300	1926200	2652100	2661400	0,781	0,724	0,752	0,028
109	2203000	2120600	2909600	2762000	0,757	0,768	0,762	0,005
110								
111	2381100	2160700	2805300	2680500	0,849	0,806	0,827	0,021
112	1758200	1760000	2411500	2262700	0,729	0,778	0,753	0,024
113	2837300	2739600	3593900	3538500	0,789	0,774	0,782	0,008
114	2008600	1972600	2529400	2282300	0,794	0,864	0,829	0,035
115	2282400	2088600	2838200	2634200	0,804	0,793	0,799	0,006
116	2097800	1881000	2600100	2364100	0,807	0,796	0,801	0,006
117	2040200	2024100	2668800	2336900	0,764	0,866	0,815	0,051
118	2102800	2133100	2926900	2693700	0,718	0,792	0,755	0,037
119	1915200	1898700	2473500	2411700	0,774	0,787	0,781	0,006
120	1850200	1752300	2261100	2252300	0,818	0,778	0,798	0,020
121	2118800	2015800	2629800	2475600	0,806	0,814	0,810	0,004
122	2103300	2001300	2683800	2658000	0,784	0,753	0,768	0,015
123	1672200	1650000	2175500	2164000	0,769	0,762	0,766	0,003
124	1793900	1730100	2227200	2167200	0,805	0,798	0,802	0,004
125	1497300	1503300	1802500	1843400	0,831	0,816	0,823	0,008
126	1863000	1820400	2237000	2354300	0,833	0,773	0,803	0,030
127	2009400	1856700	2368000	2371900	0,849	0,783	0,816	0,033
128	1972200	2011200	2273600	2281200	0,867	0,882	0,875	0,007
129	1767600	1700500	2223500	2135100	0,795	0,796	0,796	0,001
130	1630600	1557500	2019100	1975100	0,808	0,789	0,798	0,010
131	1993200	1994500	2496900	2466200	0,798	0,809	0,804	0,005
132	1941700	1875400	2457100	2332100	0,790	0,804	0,797	0,007
133	1754900	1704400	2190500	2118600	0,801	0,804	0,803	0,002
134	2132700	1974700	2719300	2460000	0,784	0,803	0,794	0,009
135								
136	1952000	1870200	2714400	2606200	0,719	0,718	0,718	0,001
137	2006800	1883300	2409200	2376400	0,833	0,793	0,813	0,020
138	2197200	2115400	2856200	2625100	0,769	0,806	0,788	0,018
139	2098400	2005400	2603900	2375300	0,806	0,844	0,825	0,019
140	1937400	1797000	2236200	2245900	0,866	0,800	0,833	0,033
141								
142	2305200	2129800	2774300	2714700	0,831	0,785	0,808	0,023

143								
144	1979200	1996400	2785800	2642700	0,710	0,755	0,733	0,022

Tabelle 6-8 NH-Verschiebungen der Aminosäuren (#) von Tpx<sup>WT</sup> im oxidierten Zustand und in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> (Tpx:T(SH)<sub>2</sub> 1:8) und die daraus resultierenden Unterschiede der chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$ . Alle Werte sind in ppm angegeben. Die grau unterlegten Zeilen repräsentieren Prolinreste.

#	Tpx <sup>WT</sup> oxidiert		Tpx <sup>WT</sup> :T(SH) <sub>2</sub> 1:8		dH	dN	$\Delta\delta$
	H	N	H	N			
1			8,4554	110,232			
2			8,0595	114,201			
3	8,293	112,610	8,30858	112,895	-0,016	-0,285	0,046
4	8,263	120,468	8,2708	120,521	-0,008	-0,053	0,011
5	7,748	119,670	7,75443	119,854	-0,006	-0,184	0,029
6	7,248	116,228	7,24592	116,347	0,002	-0,119	0,018
7	7,326	115,332	7,3339	115,435	-0,008	-0,103	0,018
8	7,490	117,671	7,51192	117,788	-0,022	-0,117	0,028
9							
10	8,723	110,988	8,729	111,082	-0,006	-0,094	0,016
11	7,904	122,144	7,927	122,188	-0,023	-0,044	0,024
12	7,999	114,440	7,97859	114,656	0,020	-0,216	0,039
13	8,132	121,458	8,15698	121,704	-0,025	-0,246	0,045
14	8,940	117,852	8,94541	118,122	-0,005	-0,270	0,042
15	9,088	119,201	9,09645	119,231	-0,008	-0,030	0,010
16	7,947	115,301	7,9658	115,366	-0,019	-0,065	0,021
17	8,843	117,948	8,8375	117,98	0,005	-0,032	0,007
18	8,182	112,234	8,1745	112,133	0,008	0,101	0,017
19	7,459	110,932	7,46505	111,0849	-0,006	-0,153	0,024
20	8,507	122,230	8,51076	122,363	-0,004	-0,133	0,021
21	9,070	117,088	9,084	117,113	-0,014	-0,025	0,015
22	8,569	117,778	8,5759	117,85	-0,007	-0,072	0,013
23	8,867	124,853	8,88885	124,784	-0,022	0,069	0,024
24			8,537	105,684			
25	7,738	115,946	7,738	115,946	0,000	0,000	0,000
26	7,498	121,522	7,50775	121,6857	-0,010	-0,164	0,027
27	6,740	115,882	6,7453	116,004	-0,005	-0,122	0,019
28	9,869	116,589	9,8929	116,805	-0,024	-0,216	0,041
29	7,662	117,462	7,67285	117,534	-0,011	-0,072	0,015
30	7,709	118,292	7,71542	118,372	-0,006	-0,080	0,014
31	9,328	126,892	9,3475	127,108	-0,020	-0,216	0,038
32	9,073	124,289	9,0798	124,31	-0,007	-0,021	0,008
33	9,460	123,871	9,4836	124,141	-0,024	-0,270	0,048
34	8,857	125,395	8,88913	125,467	-0,032	-0,072	0,034
35	8,987	129,705	9,0176	130,03	-0,031	-0,325	0,059

36	7,420	113,442					
37	6,778	119,250					
38	9,854	119,803					
39	6,364	115,953	6,3817	115,324	-0,018	0,629	0,098
40	6,414	123,313					
41							
42							
43	8,342	115,571					
44	8,018	120,145					
45	7,583	102,562					
46	7,772	121,041	7,787	121,563	-0,015	-0,522	0,082
47	8,587	116,539	8,627	116,841	-0,040	-0,302	0,061
48							
49	6,809	120,594	6,8158	120,724	-0,007	-0,130	0,021
50	7,384	122,073	7,4552	122,256	-0,071	-0,183	0,077
51	9,054	121,893	9,08743	122,052	-0,033	-0,159	0,041
52	7,756	120,285	7,7389	120,386	0,017	-0,101	0,023
53	7,615	120,562	7,624	120,684	-0,009	-0,122	0,021
54	9,437	119,304	9,4605	119,421	-0,024	-0,117	0,030
55	9,187	121,590	9,21756	121,932	-0,031	-0,342	0,061
56	7,724	116,088	7,724	116,088	0,000	0,000	0,000
57	7,611	111,481	7,62149	111,4958	-0,010	-0,015	0,011
58	8,543	118,471	8,5719	118,055	-0,029	0,416	0,070
59	6,778	118,704	6,8468	118,775	-0,069	-0,071	0,070
60	8,328	123,786	8,3598	123,954	-0,032	-0,168	0,041
61	8,272	112,169	8,24231	112,134	0,030	0,035	0,030
62	7,185	119,322	7,1834	119,395	0,002	-0,073	0,011
63	8,374	113,270	8,375	113,158	-0,001	0,112	0,017
64	8,902	118,841	8,94589	119,196	-0,044	-0,355	0,070
65	9,353	125,306	9,3651	125,547	-0,012	-0,241	0,039
66	8,770	124,833	8,7739	124,939	-0,004	-0,106	0,017
67	9,210	129,105	9,2292	129,281	-0,019	-0,176	0,033
68	8,845	131,140	8,876	131,147	-0,031	-0,007	0,031
69	8,964	116,989	8,942	117,057	0,022	-0,068	0,024
70	8,770	127,203	8,7647	127,538	0,005	-0,335	0,052
71	9,501	122,466	9,5305	122,913	-0,030	-0,447	0,075
72	9,503	117,702	9,5117	117,281	-0,009	0,421	0,065
73	7,534	113,959	7,534	113,959	0,000	0,000	0,000
74	8,802	124,747	8,80293	124,114	-0,001	0,633	0,097
75	8,163	115,436	8,1845	115,73	-0,021	-0,294	0,050
76	8,090	122,448					
77	7,740	119,080	7,69198	119,357	0,048	-0,277	0,064
78	8,392	118,463	8,4977	118,627	-0,106	-0,164	0,109
79	8,280	121,311	8,2673	121,112	0,013	0,199	0,033

80	8,045	120,080	8,0514	120,376	-0,006	-0,296	0,046
81	8,663	118,703	8,7689	119,011	-0,106	-0,308	0,116
82	7,677	105,361	7,6401	105,444	0,037	-0,083	0,039
83	6,846	117,089	6,86266	117,24	-0,017	-0,151	0,029
84	7,412	118,224	7,41032	118,332	0,002	-0,108	0,017
85							
86	5,292	117,525					
87	8,455	121,113	8,4743	121,27	-0,019	-0,157	0,031
88	8,601	118,537	8,5918	118,675	0,009	-0,138	0,023
89	8,159	125,666	8,19332	125,767	-0,034	-0,101	0,038
90							
91	7,943	125,242	7,95545	125,6508	-0,012	-0,409	0,064
92	8,147	112,238	8,1815	112,281	-0,034	-0,043	0,035
93	7,240	121,662	7,2143	121,987	0,026	-0,325	0,056
94	7,545	122,279	7,6131	122,678	-0,068	-0,399	0,092
95							
96	7,637	118,987	7,6371	119,15	0,000	-0,163	0,025
97	7,318	120,905	7,2774	120,861	0,041	0,044	0,041
98	7,615	115,265	7,57644	115,513	0,039	-0,248	0,054
99	8,131	122,518	8,16135	122,537	-0,030	-0,019	0,030
100	8,857	120,811	8,8891	120,803	-0,032	0,008	0,032
101	8,100	104,881	8,104	104,893	-0,004	-0,012	0,004
102	7,576	120,836	7,5849	120,913	-0,009	-0,077	0,015
103	8,595	118,597	8,6138	118,675	-0,019	-0,078	0,022
104	7,748	114,507	7,7503	114,538	-0,002	-0,031	0,005
105	7,556	111,482	7,55895	111,6315	-0,003	-0,150	0,023
106	8,382	120,017	8,3803	120,04	0,002	-0,023	0,004
107	8,447	126,448	8,4709	126,662	-0,024	-0,214	0,041
108	7,678	112,926	7,65734	113,273	0,021	-0,347	0,057
109	7,897	113,613					
110							
111	8,069	116,711	8,0713	117,061	-0,002	-0,350	0,054
112	8,836	127,321	8,8639	127,187	-0,028	0,134	0,035
113	8,867	125,295	8,89214	125,037	-0,025	0,258	0,047
114	8,492	125,075	8,51328	125,3853	-0,021	-0,310	0,052
115	9,387	126,121	9,40156	126,439	-0,015	-0,318	0,051
116	8,625	124,605	8,63098	124,826	-0,006	-0,221	0,034
117	8,006	128,677	8,01192	128,837	-0,006	-0,160	0,025
118	8,413	115,265	8,41429	115,349	-0,001	-0,084	0,013
119	7,936	107,148	7,942	107,284	-0,006	-0,136	0,022
120	8,695	112,033	8,7137	112,187	-0,019	-0,154	0,030
121	7,924	122,847	7,9308	122,946	-0,007	-0,099	0,017
122	8,590	121,382	8,60318	121,455	-0,013	-0,073	0,017
123	8,759	131,889	8,7752	132,055	-0,016	-0,166	0,030

124	7,490	104,300	7,47	104,098	0,020	0,202	0,037
125	8,711	107,496	8,7349	107,49	-0,024	0,006	0,024
126	7,959	119,735	7,9182	119,628	0,041	0,107	0,044
127	9,167	122,462	9,29549	122,9097	-0,128	-0,448	0,146
128	8,076	116,295	8,0826	116,42	-0,007	-0,125	0,020
129	6,973	109,107	7,0192	109,648	-0,046	-0,541	0,095
130	7,153	120,062	7,1909	120,174	-0,038	-0,112	0,042
131	7,435	116,059	7,4768	116,081	-0,042	-0,022	0,042
132	6,265	116,329	6,24834	116,211	0,017	0,118	0,025
133	6,996	116,572	6,93295	116,691	0,063	-0,119	0,066
134	7,869	118,429	7,84446	118,4	0,025	0,029	0,025
135							
136	8,543	115,127	8,55903	115,228	-0,016	-0,101	0,022
137	8,789	109,934	8,7838	109,96	0,005	-0,026	0,007
138	9,900	126,943	9,898	127,016	0,002	-0,073	0,011
139	10,349	114,391	10,3673	114,465	-0,018	-0,074	0,022
140	6,669	122,830	6,67491	122,868	-0,006	-0,038	0,008
141							
142	8,429	118,062	8,4551	118,207	-0,026	-0,145	0,034
143							
144	8,175	123,554	8,1928	123,665	-0,018	-0,111	0,025

Tabelle 6-9 NH-Verschiebungen der Aminosäuren (#) von Tpx<sup>WT</sup> im reduzierten Zustand und in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> (Tpx:T(SH)<sub>2</sub> 1:8) und die daraus resultierenden Unterschiede der chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$ . Alle Werte sind in ppm angegeben. Die grau unterlegten Zeilen repräsentieren Prolinreste.

#	Tpx <sup>WT</sup> reduziert		Tpx <sup>WT</sup> :T(SH) <sub>2</sub> 1:8		dH	dN	$\Delta\delta$
	H	N	H	N			
1	8,44	110,098	8,4554	110,232	-0,015	-0,134	0,026
2	8,052	114,192	8,0595	114,201	-0,008	-0,009	0,008
3	8,306	112,717	8,30858	112,895	-0,003	-0,178	0,027
4	8,268	120,402	8,2708	120,521	-0,003	-0,119	0,018
5	7,748	119,732	7,75443	119,854	-0,006	-0,122	0,020
6	7,245	116,263	7,24592	116,347	-0,001	-0,084	0,013
7	7,336	115,315	7,3339	115,435	0,002	-0,120	0,019
8	7,516	117,669	7,51192	117,788	0,004	-0,119	0,019
9							
10	8,716	110,996	8,729	111,082	-0,013	-0,086	0,019
11	7,927	122,097	7,927	122,188	0,000	-0,091	0,014
12	7,971	114,457	7,97859	114,656	-0,008	-0,199	0,031
13	8,154	121,608	8,15698	121,704	-0,003	-0,096	0,015
14	8,941	118,025	8,94541	118,122	-0,004	-0,097	0,016
15	9,108	119,217	9,09645	119,231	0,012	-0,014	0,012
16	7,958	115,296	7,9658	115,366	-0,008	-0,070	0,013

17	8,833	117,812	8,8375	117,98	-0,005	-0,168	0,026
18	8,181	112,135	8,1745	112,133	0,006	0,002	0,007
19	7,465	110,968	7,46505	111,0849	0,000	-0,117	0,018
20	8,507	122,23	8,51076	122,363	-0,004	-0,133	0,021
21	9,079	117,064	9,084	117,113	-0,005	-0,049	0,009
22	8,574	117,864	8,5759	117,85	-0,002	0,014	0,003
23	8,88	124,769	8,88885	124,784	-0,009	-0,015	0,009
24	8,537	105,534	8,537	105,684	0,000	-0,150	0,023
25	7,738	115,946	7,738	115,946	0,000	0,000	0,000
26	7,513	121,518	7,50775	121,6857	0,005	-0,168	0,026
27	6,748	115,8	6,7453	116,004	0,003	-0,204	0,031
28	9,872	116,577	9,8929	116,805	-0,021	-0,228	0,041
29	7,666	117,436	7,67285	117,534	-0,007	-0,098	0,017
30	7,711	118,272	7,71542	118,372	-0,004	-0,100	0,016
31	9,333	126,968	9,3475	127,108	-0,015	-0,140	0,026
32	9,073	124,289	9,0798	124,31	-0,007	-0,021	0,008
33	9,463	123,987	9,4836	124,141	-0,021	-0,154	0,031
34	8,863	125,697	8,88913	125,467	-0,026	0,230	0,044
35	9,014	129,958	9,0176	130,03	-0,004	-0,072	0,012
36	7,325	113,552					
37							
38	9,41	117,807					
39	6,348	115,293	6,3817	115,324	-0,034	-0,031	0,034
40	6,503	125,194					
41							
42							
43	7,93	120,595					
44	7,847	118,566					
45	7,823	102,26					
46	7,934	122,087	7,787	121,563	0,147	0,524	0,167
47	8,862	117,529	8,627	116,841	0,235	0,688	0,258
48							
49	6,856	120,666	6,8158	120,724	0,040	-0,058	0,041
50	7,511	122,295	7,4552	122,256	0,056	0,039	0,056
51	9,095	121,927	9,08743	122,052	0,008	-0,125	0,021
52	7,706	120,181	7,7389	120,386	-0,033	-0,205	0,046
53	7,643	120,657	7,624	120,684	0,019	-0,027	0,019
54	9,477	119,324	9,4605	119,421	0,017	-0,097	0,022
55	9,2	121,72	9,21756	121,932	-0,018	-0,212	0,037
56	7,736	116,052	7,724	116,088	0,012	-0,036	0,013
57	7,612	111,369	7,62149	111,4958	-0,009	-0,127	0,022
58	8,587	118,09	8,5719	118,055	0,015	0,035	0,016
59	6,837	118,674	6,8468	118,775	-0,010	-0,101	0,018
60	8,344	123,822	8,3598	123,954	-0,016	-0,132	0,026

61	8,242	112,045	8,24231	112,134	0,000	-0,089	0,014
62	7,185	119,322	7,1834	119,395	0,002	-0,073	0,011
63	8,362	113,156	8,375	113,158	-0,013	-0,002	0,013
64	8,936	119,047	8,94589	119,196	-0,010	-0,149	0,025
65	9,351	125,411	9,3651	125,547	-0,014	-0,136	0,025
66	8,77	124,833	8,7739	124,939	-0,004	-0,106	0,017
67	9,215	129,154	9,2292	129,281	-0,014	-0,127	0,024
68	8,946	131,232	8,876	131,147	0,070	0,085	0,071
69	8,918	116,921	8,942	117,057	-0,024	-0,136	0,032
70	8,744	127,684	8,7647	127,538	-0,021	0,146	0,031
71	9,451	122,545	9,5305	122,913	-0,079	-0,368	0,098
72	9,456	116,987	9,5117	117,281	-0,056	-0,294	0,072
73	7,526	113,591	7,534	113,959	-0,008	-0,368	0,057
74	8,806	124,31	8,80293	124,114	0,003	0,196	0,030
75	8,19	115,491	8,1845	115,73	0,005	-0,239	0,037
76	8,057	122,412					
77	7,649	119,354	7,69198	119,357	-0,043	-0,003	0,043
78	8,479	118,495	8,4977	118,627	-0,019	-0,132	0,028
79	8,21	120,978	8,2673	121,112	-0,057	-0,134	0,061
80	8,034	120,544	8,0514	120,376	-0,017	0,168	0,031
81	8,835	118,906	8,7689	119,011	0,066	-0,105	0,068
82	7,643	105,464	7,6401	105,444	0,003	0,020	0,004
83	6,888	117,178	6,86266	117,24	0,025	-0,062	0,027
84	7,423	118,27	7,41032	118,332	0,013	-0,062	0,016
85							
86							
87	8,479	121,213	8,4743	121,27	0,005	-0,057	0,010
88	8,617	118,588	8,5918	118,675	0,025	-0,087	0,029
89	8,205	125,673	8,19332	125,767	0,012	-0,094	0,019
90							
91	7,959	125,435	7,95545	125,6508	0,004	-0,216	0,033
92	8,164	112,036	8,1815	112,281	-0,018	-0,245	0,042
93	7,235	121,902	7,2143	121,987	0,021	-0,085	0,024
94	7,609	122,422	7,6131	122,678	-0,004	-0,256	0,040
95							
96	7,618	119,012	7,6371	119,15	-0,019	-0,138	0,029
97	7,289	120,76	7,2774	120,861	0,012	-0,101	0,019
98	7,599	115,385	7,57644	115,513	0,023	-0,128	0,030
99	8,149	122,455	8,16135	122,537	-0,012	-0,082	0,018
100	8,879	120,749	8,8891	120,803	-0,010	-0,054	0,013
101	8,127	104,959	8,104	104,893	0,023	0,066	0,025
102	7,592	120,779	7,5849	120,913	0,007	-0,134	0,022
103	8,575	118,617	8,6138	118,675	-0,039	-0,058	0,040
104	7,755	114,505	7,7503	114,538	0,005	-0,033	0,007

## 6 Anhang

105	7,564	111,543	7,55895	111,6315	0,005	-0,088	0,015
106	8,375	119,97	8,3803	120,04	-0,005	-0,070	0,012
107	8,47	126,425	8,4709	126,662	-0,001	-0,237	0,036
108	7,671	113,267	7,65734	113,273	0,014	-0,006	0,014
109	7,881	114,322					
110							
111	8,089	117,066	8,0713	117,061	0,018	0,005	0,018
112	8,818	127,073	8,8639	127,187	-0,046	-0,114	0,049
113	8,905	125,166	8,89214	125,037	0,013	0,129	0,024
114	8,508	125,193	8,51328	125,3853	-0,005	-0,192	0,030
115	9,402	126,347	9,40156	126,439	0,000	-0,092	0,014
116	8,625	124,605	8,63098	124,826	-0,006	-0,221	0,034
117	8,006	128,677	8,01192	128,837	-0,006	-0,160	0,025
118	8,413	115,265	8,41429	115,349	-0,001	-0,084	0,013
119	7,936	107,148	7,942	107,284	-0,006	-0,136	0,022
120	8,715	112,089	8,7137	112,187	0,001	-0,098	0,015
121	7,924	122,847	7,9308	122,946	-0,007	-0,099	0,017
122	8,59	121,382	8,60318	121,455	-0,013	-0,073	0,017
123	8,779	131,873	8,7752	132,055	0,004	-0,182	0,028
124	7,47	104,149	7,47	104,098	0,000	0,051	0,008
125	8,711	107,496	8,7349	107,49	-0,024	0,006	0,024
126	7,913	119,565	7,9182	119,628	-0,005	-0,063	0,011
127	9,247	122,503	9,29549	122,9097	-0,048	-0,407	0,079
128	8,027	116,242	8,0826	116,42	-0,056	-0,178	0,062
129	6,988	109,372	7,0192	109,648	-0,031	-0,276	0,053
130	7,136	120,022	7,1909	120,174	-0,055	-0,152	0,060
131	7,462	116,051	7,4768	116,081	-0,015	-0,030	0,016
132	6,261	116,135	6,24834	116,211	0,013	-0,076	0,017
133	7,014	116,706	6,93295	116,691	0,081	0,015	0,081
134	7,91	118,416	7,84446	118,4	0,066	0,016	0,066
135							
136	8,543	115,127	8,55903	115,228	-0,016	-0,101	0,022
137	8,801	109,969	8,7838	109,96	0,017	0,009	0,017
138	9,896	126,901	9,898	127,016	-0,002	-0,115	0,018
139	10,349	114,391	10,3673	114,465	-0,018	-0,074	0,022
140	6,669	122,83	6,67491	122,868	-0,006	-0,038	0,008
141							
142	8,439	118,078	8,4551	118,207	-0,016	-0,129	0,026
143							
144	8,191	123,592	8,1928	123,665	-0,002	-0,073	0,011

Tabelle 6-10 NH-Verschiebungen der Aminosäuren (#) von Tpx<sup>C40S</sup> im apo Zustand und in Anwesenheit von T(SH)<sub>2</sub> (Tpx:T(SH)<sub>2</sub> 1:4) und die daraus resultierenden Unterschiede der chemischen Verschiebungen Δδ. Alle Werte sind in ppm angegeben. Die grau unterlegten Zeilen repräsentieren Prolinreste.

#	Tpx <sup>C40S</sup> apo		Tpx <sup>C40S</sup> :T(SH) <sub>2</sub> 1:4		dH	dN	Δδ
	H	N	H	N			
1							
2							
3	8,310	112,931	8,31	112,934	0,000	-0,003	0,000
4	8,275	120,568	8,27857	120,518	-0,003	0,050	0,008
5	7,750	119,926	7,7531	119,901	-0,003	0,025	0,005
6	7,003	116,757	7,00337	116,897	0,000	-0,140	0,022
7	7,337	115,354	7,3399	115,37	-0,003	-0,016	0,004
8	7,522	117,770	7,51908	117,761	0,003	0,009	0,003
9							
10			8,730	111,000			
11							
12							
13	8,164	121,626	8,16922	121,681	-0,006	-0,055	0,010
14	8,959	118,194	8,9593	118,126	0,000	0,068	0,010
15	9,114	119,319	9,11245	119,26	0,001	0,059	0,009
16	7,956	115,355	7,95862	115,342	-0,003	0,013	0,003
17	8,842	117,854	8,8343	117,989	0,007	-0,135	0,022
18	8,172	112,122	8,171	112,159	0,001	-0,037	0,006
19	7,473	111,085	7,4729	111,0837	0,000	0,001	0,000
20	8,509	122,336	8,51753	122,472	-0,008	-0,136	0,022
21	9,088	117,251	9,0878	117,193	0,000	0,058	0,009
22	8,584	117,879	8,5838	117,853	0,000	0,026	0,004
23	8,897	124,962	8,8891	124,827	0,008	0,135	0,022
24							
25	7,739	115,937	7,742	116,117	-0,003	-0,180	0,028
26	7,515	121,709	7,51312	121,694	0,001	0,015	0,003
27	6,740	115,861	6,74168	115,85	-0,001	0,011	0,002
28	9,883	116,709	9,8979	116,761	-0,015	-0,052	0,017
29	7,670	117,487	7,67178	117,471	-0,002	0,016	0,003
30	7,708	118,333	7,7076	118,377	0,000	-0,044	0,007
31	9,343	127,082	9,34258	127,121	0,000	-0,039	0,006
32	9,082	124,417	9,0798	124,382	0,002	0,035	0,006
33	9,444	123,939	9,4524	123,939	-0,008	0,000	0,008
34	8,859	125,965	8,86085	125,92	-0,002	0,045	0,007
35	9,033	130,023	9,0219	129,984	0,011	0,039	0,013
36	7,198	112,741	7,19996	112,7782	-0,002	-0,037	0,006
37							
38	9,384	118,022	9,3972	117,991	-0,013	0,032	0,014
39	6,340	115,209	6,34629	115,0496	-0,007	0,160	0,025

40							
41							
42							
43							
44							
45	7,653	101,719	7,6762	101,7188	-0,023	0,000	0,023
46							
47							
48							
49	6,863	120,654	6,8581	120,678	0,005	-0,024	0,006
50	7,599	122,554	7,60264	122,5371	-0,004	0,017	0,005
51	9,115	121,991	9,10786	121,989	0,007	0,002	0,007
52	7,664	120,234	7,67612	120,296	-0,012	-0,062	0,015
53	7,670	120,652	7,66552	120,863	0,004	-0,211	0,033
54	9,484	119,426	9,484	119,426	0,000	0,000	0,000
55	9,171	121,649	9,18344	121,771	-0,013	-0,122	0,023
56	7,720	116,365	7,728	116,333	-0,007	0,032	0,009
57	7,607	111,523	7,6061	111,428	0,001	0,095	0,015
58	8,581	118,194	8,5774	118,16	0,003	0,034	0,006
59	6,797	118,689	6,8155	118,737	-0,019	-0,048	0,020
60	8,353	123,874	8,3561	123,952	-0,003	-0,078	0,012
61	8,263	112,179	8,25513	112,196	0,008	-0,017	0,008
62	7,187	119,388	7,1866	119,502	0,000	-0,114	0,018
63	8,361	113,271	8,3648	113,274	-0,004	-0,003	0,004
64	8,924	119,043	8,93919	119,126	-0,015	-0,083	0,020
65	9,376	125,666	9,35835	125,5783	0,018	0,088	0,022
66	8,793	125,075	8,7828	124,963	0,010	0,112	0,020
67	9,217	129,200	9,2133	129,161	0,004	0,039	0,007
68	9,014	131,666	8,9906	131,591	0,023	0,075	0,026
69	8,905	116,761	8,9201	116,961	-0,015	-0,200	0,034
70	8,739	127,667	8,74837	127,8399	-0,009	-0,173	0,028
71	9,446	122,722	9,45213	122,7078	-0,006	0,014	0,007
72	9,475	117,069	9,4836	117,104	-0,008	-0,035	0,010
73	7,489	113,986	7,489	113,986	0,000	0,000	0,000
74	8,813	124,392	8,82044	124,3283	-0,007	0,064	0,012
75	8,194	115,512	8,18849	115,553	0,005	-0,041	0,008
76	8,070	122,560	8,0952	122,641	-0,026	-0,081	0,029
77	7,663	119,392	7,669	119,204	-0,006	0,188	0,029
78	8,438	118,582	8,4508	118,606	-0,013	-0,024	0,014
79	8,216	121,172	8,23547	121,164	-0,019	0,008	0,019
80	8,027	120,519	8,04126	120,6873	-0,014	-0,168	0,029
81	8,807	118,923	8,7984	118,9295	0,009	-0,006	0,009
82	7,680	105,597	7,67209	105,5683	0,008	0,029	0,009
83	6,891	117,307	6,8914	117,369	-0,001	-0,062	0,010

84	7,408	118,354	7,4153	118,333	-0,007	0,021	0,008
85							
86							
87	8,490	121,333	8,48575	121,27	0,005	0,063	0,011
88	8,600	118,614	8,6004	118,614	0,000	0,000	0,000
89	8,236	125,763	8,23163	125,8518	0,004	-0,089	0,014
90							
91	7,966	125,577	7,96565	125,5108	0,000	0,066	0,010
92	8,213	112,381	8,2082	112,218	0,005	0,163	0,025
93	7,230	122,090	7,2309	122,049	-0,001	0,041	0,006
94	7,599	122,554	7,60264	122,5371	-0,004	0,017	0,005
95							
96							
97	7,273	120,807	7,27245	120,8069	0,000	0,000	0,000
98	7,589	115,439	7,5933	115,423	-0,005	0,016	0,005
99	8,159	122,567	8,1636	122,5548	-0,005	0,012	0,005
100	8,884	120,827	8,88701	120,8392	-0,003	-0,012	0,004
101	8,138	105,068	8,138	105,068	0,000	0,000	0,000
102	7,568	120,792	7,57046	120,905	-0,003	-0,113	0,018
103	8,576	118,608	8,5836	118,747	-0,008	-0,139	0,023
104	7,767	114,584	7,76749	114,5699	0,000	0,014	0,002
105	7,563	111,759	7,5645	111,904	-0,002	-0,145	0,022
106	8,366	120,091	8,36933	119,972	-0,003	0,119	0,019
107	8,490	126,511	8,4928	126,551	-0,003	-0,040	0,007
108	7,682	113,632	7,68077	113,6499	0,002	-0,018	0,003
109	8,099	114,641	8,1064	114,503	-0,008	0,138	0,023
110							
111	8,115	117,062	8,09068	116,996	0,025	0,066	0,027
112	8,806	127,317	8,8184	127,243	-0,012	0,074	0,017
113	8,928	125,173	8,9125	125,301	0,015	-0,128	0,025
114	8,498	125,373	8,494	125,239	0,004	0,134	0,021
115	9,405	126,602	9,4055	126,616	0,000	-0,014	0,002
116	8,631	124,757	8,6384	124,827	-0,008	-0,070	0,013
117	7,993	128,882	7,997	128,877	-0,004	0,005	0,004
118	8,412	115,324	8,4162	115,299	-0,004	0,025	0,006
119	7,946	107,207	7,94253	107,235	0,003	-0,028	0,005
120	8,722	112,170	8,7247	112,291	-0,002	-0,121	0,019
121	7,934	122,978	7,9311	122,903	0,003	0,075	0,012
122	8,603	121,418	8,60079	121,458	0,003	-0,040	0,007
123	8,787	132,110	8,7792	132,1	0,008	0,010	0,008
124	7,473	104,210	7,4696	104,1681	0,003	0,042	0,007
125	8,717	107,461	8,70888	107,393	0,008	0,067	0,013
126	7,904	119,745	7,90316	119,6998	0,001	0,045	0,007
127	9,269	122,709	9,2644	122,57	0,005	0,139	0,022

128	8,019	116,319	8,01792	116,3066	0,002	0,012	0,002
129	6,988	109,649	6,98681	109,6072	0,001	0,041	0,006
130	7,138	120,142	7,13839	119,9848	0,000	0,157	0,024
131	7,481	116,350	7,4727	116,144	0,008	0,206	0,033
132	6,260	115,971	6,2569	116,0765	0,003	-0,106	0,017
133	7,003	116,757	7,0032	116,897	0,000	-0,140	0,022
134	7,920	118,496	7,915	118,533	0,005	-0,037	0,008
135							
136	8,566	115,259	8,5655	115,349	0,000	-0,090	0,014
137	8,811	109,990	8,81057	109,9911	0,000	-0,001	0,000
138	9,886	126,838	9,8903	126,946	-0,004	-0,108	0,017
139	10,352	114,502	10,3519	114,3638	0,000	0,138	0,021
140	6,687	123,044	6,6818	122,9274	0,005	0,117	0,019
141							
142	8,435	118,260	8,4451	118,308	-0,010	-0,048	0,012
143							
144	8,198	123,732	8,20042	123,7087	-0,002	0,023	0,004

Tabelle 6-11 Aktivitäten von Tpx<sup>WT</sup> und verschiedenen Mutanten relativ zur Aktivität von Tpx<sup>WT</sup> bestimmt im gekoppelten Px-Assay.

	<i>Aktivität rel. zu Tpx<sup>WT</sup> / %</i>
Tpx <sup>WT</sup>	100 ± 3,7%
Tpx <sup>S38A</sup>	63,3 ± 10,5%
Tpx <sup>W39A</sup>	2,3 ± 0,8%
Tpx <sup>W39F</sup>	19,4 ± 1,5%
Tpx <sup>W39Y</sup>	24,2 ± 2,2%
Tpx <sup>C40S</sup>	0,4 ± 1,7%
Tpx <sup>C43S</sup>	0,5 ± 2,9%
Tpx <sup>C40/43S</sup>	-1,1 ± 0,7%
Tpx <sup>R44A</sup>	92,5 ± 4,1%
Tpx <sup>W70A</sup>	21,6 ± 1,9%
Tpx <sup>W70F</sup>	33,1 ± 2,2%
Tpx <sup>W70Y</sup>	20,4 ± 0,6%
Tpx <sup>Y81F</sup>	107,5 ± 3,5%
Tpx <sup>K102A</sup>	124,0 ± 2,2%
Tpx <sup>K102E</sup>	159,6 ± 12,2%
Tpx <sup>E107A</sup>	55,1 ± 2,1
Tpx <sup>E107K</sup>	46,5 ± 4,6%
Tpx <sup>I109A</sup>	32,4 ± 1,5%
Tpx <sup>T129A</sup>	93,6 ± 2,5%
Tpx <sup>W142A</sup>	35,2 ± 2,5%

Tabelle 6-12 NH-Verschiebungen der Aminosäuren (#) von Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>W39A</sup> im oxidierten Zustand und die daraus resultierenden Unterschiede der chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$ . Alle Werte sind in ppm angegeben. Die grau unterlegten Zeilen repräsentieren Prolinreste.

#	Tpx <sup>WT</sup> oxidiert		Tpx <sup>W39A</sup> oxidiert		dH	dN	$\Delta\delta$
	H	N	H	N			
1							
2							
3	8,293	112,610	8,29	112,73	0,003	-0,120	0,019
4	8,263	120,468	8,25	120,35	0,013	0,118	0,022
5	7,748	119,670	7,74	119,7	0,008	-0,030	0,009
6	7,248	116,228	7,24	116,21	0,008	0,018	0,008
7	7,326	115,332	7,31	115,29	0,016	0,042	0,017
8	7,490	117,671	7,48	117,58	0,010	0,091	0,017
9							
10	8,723	110,988	8,72	110,87	0,003	0,118	0,018
11	7,904	122,144	7,9	122,17	0,004	-0,026	0,006
12	7,999	114,440	8,02	114,43	-0,021	0,010	0,021
13	8,132	121,458	8,12	121,3	0,012	0,158	0,027
14	8,940	117,852	8,94	117,89	0,000	-0,038	0,006
15	9,088	119,201	9,06	119,15	0,028	0,051	0,029
16	7,947	115,301	7,93	115,05	0,017	0,251	0,042
17	8,843	117,948	8,88	118,22	-0,037	-0,272	0,056
18	8,182	112,234	8,19	112,27	-0,008	-0,036	0,010
19	7,459	110,932	7,45	110,88	0,009	0,052	0,012
20	8,507	122,230	8,5	122,09	0,007	0,140	0,023
21	9,070	117,088	9,06	117,19	0,010	-0,102	0,019
22	8,569	117,778	8,57	117,85	-0,001	-0,072	0,011
23	8,867	124,853	8,86	124,84	0,007	0,013	0,007
24							
25	7,738	115,946	7,74	116,05	-0,002	-0,104	0,016
26	7,498	121,522	7,5	121,52	-0,002	0,002	0,002
27	6,740	115,882	6,74	115,94	0,000	-0,058	0,009
28	9,869	116,589	9,89	116,69	-0,021	-0,101	0,026
29	7,662	117,462	7,68	117,44	-0,018	0,022	0,018
30	7,709	118,292	7,72	118,26	-0,011	0,032	0,012
31	9,328	126,892	9,33	126,87	-0,002	0,022	0,004
32	9,073	124,289	9,08	124,41	-0,007	-0,121	0,020
33	9,460	123,871	9,44	123,76	0,020	0,111	0,026
34	8,857	125,395	8,85	125,64	0,007	-0,245	0,038
35	8,987	129,705	9,01	129,54	-0,023	0,165	0,034
36	7,420	113,442	7,56	114,02	-0,140	-0,578	0,166
37	6,778	119,250	7,53	121,61	-0,752	-2,360	0,835
38	9,854	119,803	10	117,3	-0,146	2,503	0,411
39	6,364	115,953	8,26	123,11	-1,896	-7,157	2,192

40	6,414	123,313					
41							
42							
43	8,342	115,571	8,48	116,25	-0,138	-0,679	0,173
44	8,018	120,145	8,18	120,7	-0,162	-0,555	0,183
45	7,583	102,562	7,54	102,33	0,043	0,232	0,056
46	7,772	121,041	7,71	120,75	0,062	0,291	0,076
47	8,587	116,539	8,83	116,89	-0,243	-0,351	0,249
48							
49	6,809	120,594	6,88	119,83	-0,071	0,764	0,137
50	7,384	122,073	7,25	122,02	0,134	0,053	0,134
51	9,054	121,893	9,1	121,71	-0,046	0,183	0,054
52	7,756	120,285	7,76	120,21	-0,004	0,075	0,012
53	7,615	120,562	7,72	120,62	-0,105	-0,058	0,105
54	9,437	119,304	9,45	119,22	-0,013	0,084	0,018
55	9,187	121,590	9,13	121,72	0,057	-0,130	0,060
56	7,724	116,088	7,78	116,14	-0,056	-0,052	0,057
57	7,611	111,481	7,63	111,42	-0,019	0,061	0,021
58	8,543	118,471	8,5	118,33	0,043	0,141	0,048
59	6,778	118,704	6,79	118,6	-0,012	0,104	0,020
60	8,328	123,786	8,33	123,73	-0,002	0,056	0,009
61	8,272	112,169	8,28	112,18	-0,008	-0,011	0,008
62	7,185	119,322	7,18	119,29	0,005	0,032	0,007
63	8,374	113,270	8,38	113,27	-0,006	0,000	0,006
64	8,902	118,841	8,85	118,78	0,052	0,061	0,053
65	9,353	125,306	9,29	125,23	0,063	0,076	0,064
66	8,770	124,833	8,78	124,95	-0,010	-0,117	0,021
67	9,210	129,105	9,22	129,2	-0,010	-0,095	0,018
68	8,845	131,140	8,95	131,11	-0,105	0,030	0,105
69	8,964	116,989	8,81	117,08	0,154	-0,091	0,155
70	8,770	127,203	8,96	128,83	-0,190	-1,627	0,314
71	9,501	122,466	9,4	122,36	0,101	0,106	0,102
72	9,503	117,702	8,79	117,23	0,713	0,472	0,717
73	7,534	113,959	7,51	112,86	0,024	1,099	0,171
74	8,802	124,747	8,74	123,82	0,062	0,927	0,155
75	8,163	115,436	8,2	115,25	-0,037	0,186	0,047
76	8,090	122,448	7,88	122,23	0,210	0,218	0,213
77	7,740	119,080	7,34	119,35	0,400	-0,270	0,402
78	8,392	118,463	8,42	118,23	-0,028	0,233	0,045
79	8,280	121,311	8,04	120,31	0,240	1,001	0,285
80	8,045	120,080	8,1	120,33	-0,055	-0,250	0,067
81	8,663	118,703	8,85	118,68	-0,187	0,023	0,187
82	7,677	105,361	7,51	104,86	0,167	0,501	0,184
83	6,846	117,089	6,86	116,96	-0,014	0,129	0,024

84	7,412	118,224	7,38	118,53	0,032	-0,306	0,057
85							
86	5,292	117,525	5,32	117,65	-0,028	-0,125	0,034
87	8,455	121,113	8,48	121,13	-0,025	-0,017	0,025
88	8,601	118,537	8,56	118,33	0,041	0,207	0,052
89	8,159	125,666	8,13	125,44	0,029	0,226	0,045
90							
91	7,943	125,242	7,93	125,71	0,013	-0,468	0,073
92	8,147	112,238	8,17	112,04	-0,023	0,198	0,038
93	7,240	121,662	7,18	121,79	0,060	-0,128	0,063
94	7,545	122,279	7,62	122,69	-0,075	-0,411	0,098
95							
96	7,637	118,987	7,61	118,82	0,027	0,167	0,037
97	7,318	120,905	7,23	120,68	0,088	0,225	0,095
98	7,615	115,265	7,54	115,26	0,075	0,005	0,075
99	8,131	122,518	8,1	122,46	0,031	0,058	0,032
100	8,857	120,811	8,86	120,79	-0,003	0,021	0,004
101	8,100	104,881	8,1	104,86	0,000	0,021	0,003
102	7,576	120,836	7,55	120,81	0,026	0,026	0,026
103	8,595	118,597	8,55	118,53	0,045	0,067	0,046
104	7,748	114,507	7,77	114,54	-0,022	-0,033	0,023
105	7,556	111,482	7,54	111,49	0,016	-0,008	0,016
106	8,382	120,017	8,38	120,01	0,002	0,007	0,002
107	8,447	126,448	8,47	126,55	-0,023	-0,102	0,028
108	7,678	112,926	7,63	112,86	0,048	0,066	0,049
109	7,897	113,613	7,81	113,11	0,087	0,503	0,116
110							
111	8,069	116,711	8,2	116,62	-0,131	0,091	0,132
112	8,836	127,321	8,77	127,4	0,066	-0,079	0,067
113	8,867	125,295	8,89	125,67	-0,023	-0,375	0,062
114	8,492	125,075	8,46	124,82	0,032	0,255	0,051
115	9,387	126,121	9,36	125,99	0,027	0,131	0,034
116	8,625	124,605	8,63	124,55	-0,005	0,055	0,010
117	8,006	128,677	7,99	128,65	0,016	0,027	0,017
118	8,413	115,265	8,41	115,32	0,003	-0,055	0,009
119	7,936	107,148	7,95	107,12	-0,014	0,028	0,015
120	8,695	112,033	8,68	112,04	0,015	-0,007	0,015
121	7,924	122,847	7,92	122,84	0,004	0,007	0,004
122	8,590	121,382	8,58	121,41	0,010	-0,028	0,011
123	8,759	131,889	8,72	131,93	0,039	-0,041	0,040
124	7,490	104,300	7,52	104,52	-0,030	-0,220	0,045
125	8,711	107,496	8,68	107,6	0,031	-0,104	0,035
126	7,959	119,735	7,99	119,77	-0,031	-0,035	0,031
127	9,167	122,462	9,07	122,29	0,097	0,172	0,101

128	8,076	116,295	8,11	116,32	-0,034	-0,025	0,034
129	6,973	109,107	6,96	109,29	0,013	-0,183	0,031
130	7,153	120,062	7,17	119,72	-0,017	0,342	0,055
131	7,435	116,059	7,48	116,41	-0,045	-0,351	0,070
132	6,265	116,329	6,3	116,24	-0,035	0,089	0,038
133	6,996	116,572	7	116,35	-0,004	0,222	0,034
134	7,869	118,429	7,85	118,53	0,019	-0,101	0,025
135							
136	8,543	115,127	8,54	115,18	0,003	-0,053	0,009
137	8,789	109,934	8,79	109,99	-0,001	-0,056	0,009
138	9,900	126,943	9,9	126,93	0,000	0,013	0,002
139	10,349	114,391	10,34	114,36	0,009	0,031	0,010
140	6,669	122,830	6,67	122,79	-0,001	0,040	0,006
141							
142	8,429	118,062	8,41	117,99	0,019	0,072	0,022
143							
144	8,175	123,554	8,16	123,46	0,015	0,094	0,021

Tabelle 6-13 NH-Verschiebungen der Aminosäuren (#) von Tpx<sup>WT</sup> und Tpx<sup>W39A</sup> im reduzierten Zustand und die daraus resultierenden Unterschiede der chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$ . Alle Werte sind in ppm angegeben. Die grau unterlegten Zeilen repräsentieren Prolinreste.

#	Tpx <sup>WT</sup> oxidiert		Tpx <sup>W39A</sup> oxidiert		dH	dN	$\Delta\delta$
	H	N	H	N			
1	8,440	110,098	8,447	110,184	-0,007	-0,086	0,015
2	8,052	114,192	8,044	114,186	0,008	0,006	0,008
3	8,306	112,717	8,305	112,955	0,001	-0,238	0,037
4	8,268	120,402	8,260	120,454	0,008	-0,052	0,011
5	7,748	119,732	7,741	119,852	0,007	-0,120	0,020
6	7,245	116,263	7,234	116,297	0,011	-0,034	0,012
7	7,336	115,315	7,317	115,374	0,019	-0,059	0,021
8	7,516	117,669	7,487	117,704	0,029	-0,035	0,029
9							
10	8,716	110,996	8,713	111,076	0,003	-0,080	0,013
11	7,927	122,097	7,899	122,238	0,028	-0,141	0,036
12	7,971	114,457	7,993	114,625	-0,022	-0,168	0,034
13	8,154	121,608	8,142	121,596	0,012	0,012	0,012
14	8,941	118,025	8,939	118,097	0,002	-0,072	0,011
15	9,108	119,217	9,082	119,273	0,026	-0,056	0,028
16	7,958	115,296	7,940	115,241	0,018	0,055	0,020
17	8,833	117,812	8,854	118,142	-0,021	-0,330	0,055
18	8,181	112,135	8,165	112,078	0,016	0,057	0,019
19	7,465	110,968	7,454	111,023	0,011	-0,055	0,014
20	8,507	122,230	8,505	122,273	0,002	-0,043	0,007

21	9,079	117,064	9,066	117,175	0,013	-0,111	0,022
22	8,574	117,864	8,567	117,859	0,007	0,005	0,007
23	8,880	124,769	8,866	124,818	0,014	-0,049	0,016
24	8,537	105,534					
25	7,738	115,946	7,741	116,124	-0,003	-0,178	0,027
26	7,513	121,518	7,496	121,718	0,017	-0,200	0,035
27	6,748	115,800	6,744	115,977	0,004	-0,177	0,028
28	9,872	116,577	9,900	116,781	-0,028	-0,204	0,042
29	7,666	117,436	7,683	117,527	-0,017	-0,091	0,022
30	7,711	118,272	7,708	118,359	0,003	-0,087	0,014
31	9,333	126,968	9,336	127,019	-0,003	-0,051	0,008
32	9,073	124,289	9,070	124,295	0,003	-0,005	0,003
33	9,463	123,987	9,457	124,006	0,006	-0,019	0,007
34	8,863	125,697	8,852	125,658	0,011	0,039	0,013
35	9,014	129,958	8,970	129,921	0,044	0,037	0,044
36	7,325	113,552	7,567	114,011	-0,242	-0,459	0,252
37							
38	9,410	117,807	9,672	118,626	-0,262	-0,819	0,291
39	6,348	115,293	7,940	120,166			
40	6,503	125,194	6,885	120,867	-0,382	4,327	0,767
41							
42							
43	7,930	120,595	7,899	120,074	0,031	0,521	0,086
44	7,847	118,566					
45	7,823	102,260	7,832	102,234	-0,009	0,026	0,010
46	7,934	122,087	7,770	121,448	0,164	0,639	0,191
47	8,862	117,529	8,796	117,264	0,066	0,265	0,078
48							
49	6,856	120,666	6,844	120,339	0,012	0,327	0,052
50	7,511	122,295	7,421	122,272	0,090	0,023	0,090
51	9,095	121,927	9,086	122,008	0,009	-0,081	0,015
52	7,706	120,181	7,728	120,284	-0,022	-0,103	0,027
53	7,643	120,657	7,670	120,703	-0,027	-0,046	0,027
54	9,477	119,324	9,473	119,343	0,004	-0,019	0,005
55	9,200	121,720	9,178	121,922	0,022	-0,202	0,038
56	7,736	116,052	7,745	116,304	-0,009	-0,252	0,040
57	7,612	111,369	7,616	111,375	-0,004	-0,006	0,004
58	8,587	118,090	8,555	118,144	0,032	-0,054	0,033
59	6,837	118,674	6,832	118,726	0,005	-0,052	0,009
60	8,344	123,822	8,343	123,942	0,001	-0,120	0,018
61	8,242	112,045	8,234	112,139	0,008	-0,094	0,017
62	7,185	119,322	7,176	119,373	0,009	-0,051	0,012
63	8,362	113,156	8,356	113,177	0,007	-0,021	0,007
64	8,936	119,047	8,917	119,140	0,019	-0,093	0,024

65	9,351	125,411	9,336	125,505	0,015	-0,094	0,021
66	8,770	124,833	8,783	124,998	-0,013	-0,165	0,029
67	9,215	129,154	9,224	129,338	-0,009	-0,184	0,030
68	8,946	131,232	8,955	131,197	-0,009	0,035	0,011
69	8,918	116,921	8,838	117,302	0,080	-0,381	0,100
70	8,744	127,684	8,904	129,128	-0,160	-1,444	0,273
71	9,451	122,545	9,257	122,098	0,194	0,447	0,206
72	9,456	116,987	8,746	117,176	0,710	-0,189	0,711
73	7,526	113,591	7,575	113,342	-0,049	0,249	0,062
74	8,806	124,310	8,756	124,258	0,050	0,052	0,051
75	8,190	115,491	8,218	115,376	-0,028	0,115	0,034
76	8,057	122,412	7,816	122,312	0,241	0,100	0,242
77	7,649	119,354	7,359	119,677	0,290	-0,323	0,294
78	8,479	118,495	8,488	118,410	-0,009	0,085	0,016
79	8,210	120,978	8,073	120,429	0,137	0,549	0,161
80	8,034	120,544	8,046	120,627	-0,012	-0,083	0,017
81	8,835	118,906	8,917	119,140	-0,082	-0,234	0,089
82	7,643	105,464	7,542	105,223	0,102	0,241	0,108
83	6,888	117,178	6,890	117,215	-0,002	-0,037	0,006
84	7,423	118,270	7,387	118,632	0,036	-0,362	0,066
85							
86							
87	8,479	121,213	8,480	121,347	-0,001	-0,134	0,021
88	8,617	118,588	8,597	118,581	0,021	0,007	0,021
89	8,205	125,673	8,170	125,656	0,035	0,017	0,035
90							
91	7,959	125,435	7,965	125,789	-0,006	-0,354	0,055
92	8,164	112,036	8,181	112,429	-0,017	-0,393	0,063
93	7,235	121,902	7,184	122,010	0,051	-0,108	0,053
94	7,609	122,422	7,638	122,801	-0,029	-0,379	0,065
95							
96	7,618	119,012	7,600	118,973	0,018	0,039	0,019
97	7,289	120,760	7,234	120,603	0,055	0,157	0,060
98	7,599	115,385	7,542	115,331	0,057	0,054	0,058
99	8,149	122,455	8,106	122,535	0,043	-0,080	0,044
100	8,879	120,749	8,843	120,853	0,036	-0,104	0,040
101	8,127	104,959	8,106	104,959	0,021	0,000	0,021
102	7,592	120,779	7,550	120,867	0,042	-0,088	0,044
103	8,575	118,617	8,549	118,655	0,026	-0,038	0,027
104	7,755	114,505	7,744	114,596	0,011	-0,091	0,018
105	7,564	111,543	7,550	111,551	0,014	-0,008	0,014
106	8,375	119,970	8,350	120,033	0,025	-0,063	0,027
107	8,470	126,425	8,468	126,637	0,002	-0,212	0,033
108	7,671	113,267	7,639	113,194	0,032	0,073	0,034

109	7,881	114,322	7,882	114,099	-0,001	0,223	0,034
110							
111	8,089	117,066	8,065	116,910	0,024	0,156	0,034
112	8,818	127,073	8,798	127,076	0,020	-0,003	0,020
113	8,905	125,166	8,890	125,323	0,015	-0,157	0,028
114	8,508	125,193	8,485	125,262	0,023	-0,069	0,025
115	9,402	126,347	9,402	126,491	0,000	-0,144	0,022
116	8,625	124,605	8,626	124,821	-0,001	-0,216	0,033
117	8,006	128,677	7,994	128,866	0,012	-0,189	0,031
118	8,413	115,265	8,409	115,329	0,004	-0,064	0,010
119	7,936	107,148	7,932	107,157	0,004	-0,009	0,004
120	8,715	112,089	8,700	112,166	0,015	-0,077	0,019
121	7,924	122,847	7,927	122,957	-0,003	-0,110	0,017
122	8,590	121,382	8,588	121,483	0,002	-0,101	0,016
123	8,779	131,873	8,754	132,029	0,025	-0,156	0,034
124	7,470	104,149	7,483	104,256	-0,013	-0,107	0,021
125	8,711	107,496	8,713	107,552	-0,002	-0,056	0,009
126	7,913	119,565	7,824	118,759	0,089	0,806	0,153
127	9,247	122,503	9,230	122,599	0,017	-0,096	0,023
128	8,027	116,242	8,065	116,471	-0,038	-0,229	0,052
129	6,988	109,372	6,985	109,662	0,003	-0,290	0,045
130	7,136	120,022	7,135	119,987	0,001	0,035	0,006
131	7,462	116,051	7,479	116,241	-0,017	-0,190	0,034
132	6,261	116,135	6,258	116,235	0,003	-0,100	0,016
133	7,014	116,706	6,993	116,685	0,021	0,021	0,021
134	7,910	118,416	7,890	118,581	0,020	-0,165	0,032
135							
136	8,543	115,127	8,550	115,241	-0,007	-0,114	0,019
137	8,801	109,969	8,796	110,024	0,005	-0,055	0,010
138	9,896	126,901	9,900	127,019	-0,004	-0,118	0,019
139	10,349	114,391	10,341	114,450	0,008	-0,059	0,012
140	6,669	122,830	6,674	122,911	-0,005	-0,081	0,013
141							
142	8,439	118,078	8,430	118,140	0,009	-0,062	0,013
143							
144	8,191	123,592	8,181	123,637	0,010	-0,045	0,012

Tabelle 6-14 Zeitabhängige Inhibition der Px-Kaskade durch CFT oder MFT bei einem 1:1 molaren Verhältnis von Tpx:CFT bzw. Tpx:MFT (Tpx: 5  $\mu$ M; CFT: 5  $\mu$ M; MFT: 5  $\mu$ M). 0 min entspricht der DMSO-Kontroll-Messung. Die Werte wurden relativ zur DMSO-Kontrolle ermittelt.<sup>[111]</sup>

Zeit / min	Relative Aktivität / %	
	CFT	MFT
0 min	100,0% $\pm$ 7,5%	100% $\pm$ 7,1%
5 min	34,4% $\pm$ 3,6%	92,6% $\pm$ 8,5%
10 min	8,0% $\pm$ 2,1%	87,5% $\pm$ 11,1%
15 min	-5,3% $\pm$ 13,9%	84,9% $\pm$ 10,0%
25 min	-4,1% $\pm$ 2,5%	87,3% $\pm$ 5,3%
35 min	5,9% $\pm$ 1,6%	82,0% $\pm$ 6,2%

Tabelle 6-15 Zeit- und Konzentrationsabhängige relative Inhibition (%) der Px-Kaskade im gekoppelten Px-Assay. Die Werte der relativen Inhibitionen sind relativ zur Aktivität der DMSO-Kontrolle (100% Aktivität = 0% Inhibition) ermittelt worden. 0 min entspricht der relativen Inhibition der DMSO-Kontrolle in Abwesenheit von CFT.<sup>[111]</sup>

Zeit / [min]	Relative Inhibition / [%]									
	1 $\mu$ M CFT	2,5 $\mu$ M CFT	5 $\mu$ M CFT	7,5 $\mu$ M CFT	10 $\mu$ M CFT	15 $\mu$ M CFT	20 $\mu$ M CFT	25 $\mu$ M CFT	30 $\mu$ M CFT	50 $\mu$ M CFT
0,5	-3,1 $\pm$ 16,5	3,0 $\pm$ 3,8	11,9 $\pm$ 1,9	31,9 $\pm$ 2,5	41,3 $\pm$ 9,8	57,3 $\pm$ 7,6	67,0 $\pm$ 1,5	73,1 $\pm$ 3,1	73,1 $\pm$ 3,4	94,9 $\pm$ 5,5
1	0,0 $\pm$ 1,3	19,8 $\pm$ 2,6	35,1 $\pm$ 9,6	44,8 $\pm$ 5,6	55,9 $\pm$ 6,8	71,9 $\pm$ 3,9	83,3 $\pm$ 1,8	92,4 $\pm$ 1,3	92,8 $\pm$ 2,2	101,0 $\pm$ 3,3
2,5	6,0 $\pm$ 2,9	20,7 $\pm$ 9,7	34,2 $\pm$ 2,5	57,5 $\pm$ 0,3	74,3 $\pm$ 2,6	90,7 $\pm$ 5,3	98,3 $\pm$ 7,3	105,7 $\pm$ 2,8	99,3 $\pm$ 2,2	105,3 $\pm$ 3,3
5	1,3 $\pm$ 5,0	24,5 $\pm$ 15,9	56,9 $\pm$ 6,2	79,3 $\pm$ 0,9	93,2 $\pm$ 1,7	103,9 $\pm$ 2,1	95,7 $\pm$ 3,5	100,6 $\pm$ 6,2	100,0 $\pm$ 1,8	100,5 $\pm$ 4,6
7,5	3,9 $\pm$ 1,9	36,6 $\pm$ 11,6	69,0 $\pm$ 5,9	94,4 $\pm$ 1,0	104,7 $\pm$ 4,5	104,9 $\pm$ 4,1	99,6 $\pm$ 0,7	103,6 $\pm$ 2,8	98,8 $\pm$ 2,8	101,2 $\pm$ 4,1
10	11,3 $\pm$ 1,1	37,2 $\pm$ 11,9	76,0 $\pm$ 4,1	98,2 $\pm$ 0,7	101,7 $\pm$ 2,1	103,5 $\pm$ 0,1	98,0 $\pm$ 1,2	102,5 $\pm$ 4,4	99,4 $\pm$ 2,3	106,4 $\pm$ 3,7
15	12,7 $\pm$ 1,9	38,6 $\pm$ 13,1	84,6 $\pm$ 3,8	101,7 $\pm$ 2,0	103,1 $\pm$ 6,3	106,7 $\pm$ 6,8		108,7 $\pm$ 1,8		103,5 $\pm$ 2,4
20	11,3 $\pm$ 0,8	45,2 $\pm$ 14,6	90,1 $\pm$ 3,3	104,5 $\pm$ 1,9	101,1 $\pm$ 1,6	103,3 $\pm$ 1,0		104,3 $\pm$ 1,9		103,6 $\pm$ 3,1
25	13,3 $\pm$ 1,1	47,8 $\pm$ 15,6	92,2 $\pm$ 4,2	99,5 $\pm$ 2,3	103,4 $\pm$ 4,1	105,8 $\pm$ 4,4		103,7 $\pm$ 3,2		104,4 $\pm$ 3,9
30	17,7 $\pm$ 3,6	48,0 $\pm$ 11,9	94,7 $\pm$ 4,1	99,9 $\pm$ 2,4	104,5 $\pm$ 2,1	100,6 $\pm$ 2,5		106,6 $\pm$ 0,8		103,2 $\pm$ 3,1

Tabelle 6-16 Die ausgehend von Tabelle 6-15 mittels GraFit bestimmten  $k_{obs}$ -Werte in  $\text{min}^{-1}$ .<sup>[111]</sup>

$[I] / \mu\text{M}$	$k_{obs} / \text{min}^{-1}$				
	1	2	3	Mittelwert	Standardabw.
1,0	0,1097	0,1272	0,0327	0,0899	0,0410
2,5	0,1269	0,2584	0,0896	0,1583	0,0724
5,0	0,1988	0,1763	0,1417	0,1723	0,0235
7,5	0,5449	0,3591	0,3471	0,4170	0,0905
10,0	0,6539	1,0392	0,5880	0,7604	0,1990
15,0	1,1783	1,2393	1,6226	1,3467	0,1967
20,0	1,9928	2,1458	2,4421	2,1936	0,1865
25,0	2,1699	2,1408	2,5947	2,3018	0,2075
30,0	2,4392	2,4392	3,1476	2,6753	0,3339
50,0	5,9293	5,2203	4,0699	5,0732	0,7662

Tabelle 6-17 Inhibitionen von  $\text{Tp}^{\text{WT}}$ ,  $\text{Tp}^{\text{W70A}}$ ,  $\text{Tp}^{\text{K102E}}$  und  $\text{Tp}^{\text{I109A}}$  durch CFT im gekoppelten Px-Assay nach 5 min Inkubationszeit mit verschiedenen molaren  $\text{Tp}^{\text{x}}$ :CFT Verhältnissen. Die  $\text{Tp}^{\text{x}}$ -Konzentration entsprach in jeder Messung  $5 \mu\text{M}$ .<sup>[111]</sup>

$\text{Tp}^{\text{x}}:\text{CFT}$	$\text{Tp}^{\text{WT}}$	$\text{Tp}^{\text{W70A}}$	$\text{Tp}^{\text{K102E}}$	$\text{Tp}^{\text{I109A}}$
1:0	100,0% $\pm$ 5,6%	100,0% $\pm$ 18,6%	100,0% $\pm$ 7,7%	100,0% $\pm$ 15,6%
1:0,5	59,4% $\pm$ 6,6%	35,2% $\pm$ 10,5%	74,2% $\pm$ 4,7%	74,9% $\pm$ 19,8%
1:1	31,7% $\pm$ 4,5%	1,3% $\pm$ 6,0%	48,5% $\pm$ 5,1%	54,3% $\pm$ 15,9%
1:1,5	12,0% $\pm$ 2,8%	-11,8% $\pm$ 5,4%	23,7% $\pm$ 8,4%	41,6% $\pm$ 16,3%
1:2	0,4% $\pm$ 2,5%	-14,7% $\pm$ 6,1%	10,5% $\pm$ 6,0	26,5% $\pm$ 16,6%
1:3	-4,7% $\pm$ 1,1%	-2,9% $\pm$ 6,4%	-0,8% $\pm$ 1,6%	3,0% $\pm$ 13,7%
1:5	-4,7% $\pm$ 1,5%	0,2% $\pm$ 4,7%	-1,0% $\pm$ 1,0%	-0,9% $\pm$ 10,9%
1:10	-3,3% $\pm$ 3,1%	1,5% $\pm$ 7,6%	-0,2% $\pm$ 1,4	-6,9% $\pm$ 13,7%

Tabelle 6-18 Ausgehend von den SAXS-Daten berechnete Gyrationradien von  $\text{Tp}^{\text{WT}}$ ,  $\text{Tp}^{\text{W39A}}$ ,  $\text{Tp}^{\text{W70A}}$ ,  $\text{Tp}^{\text{K102E}}$  und  $\text{Tp}^{\text{I109A}}$  im oxidierten, reduzierten und CFT-gebundenen Zustand.<sup>[111]</sup>

	$R_g / \text{nm}$ oxidiert	$R_g / \text{nm}$ reduziert	$R_g / \text{nm}$ CFT-gebunden
$\text{Tp}^{\text{WT}}$	1,61 $\pm$ 0,12	1,58 $\pm$ 0,01	2,03 $\pm$ 0,03
$\text{Tp}^{\text{W39A}}$	1,56 $\pm$ 0,01	1,60 $\pm$ 0,02	1,60 $\pm$ 0,01
$\text{Tp}^{\text{W70A}}$	1,65 $\pm$ 0,01	1,60 $\pm$ 0,03	2,03 $\pm$ 0,03
$\text{Tp}^{\text{K102E}}$	1,56 $\pm$ 0,01	1,61 $\pm$ 0,01	1,80 $\pm$ 0,07
$\text{Tp}^{\text{I109A}}$	1,65 $\pm$ 0,11	1,58 $\pm$ 0,02	2,02 $\pm$ 0,01

### 6.3 Klonierung, Expression und Aufreinigung von *hsTRPML2* ELD-Konstrukten

Die im Folgenden beschriebene Klonierung, Expression und Aufreinigung von *hsTRPML2* ELD-Konstrukten wurde bereits von Viet\*, Wagner\*, Schwickert\* et al., 2019<sup>[178]</sup> veröffentlicht und die Beschreibung ist dieser Publikation entnommen.

Das Plasmid pET11a\_HisSUMO-*hsML2* loop1 (p043; Kapitel 6.4.1) wurde ausgehend von einem synthetischen Gen codierend für *hsTRPML2* ELD<sup>K94-V290</sup> von GenScript, Leiden Niederlande, von Dr. XXXXXXXXXX hergestellt. Die Veränderung der ELD-Gensequenz am 5'- oder 3'-Ende erfolgte durch eine Quik change PCR mit dem KAPA Hifi PCR Kit. Die verwendeten Oligonukleotide sind Tabelle 6-19 zu entnehmen. Die Klonierung wurde wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben durchgeführt.

Es wurden Rosetta-gami™ 2(DE3) *E. coli* Zellen entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.2.1.5 mit für ELD-Konstrukte codierenden Plasmiden (Tabelle 6-20) transformiert. Wie in Kapitel 2.2.2.1 und 2.2.2.2 aufgeführt wurden Vorkulturen hergestellt und die Proteinexpression der ELD-Konstrukte in LB-Medium durchgeführt. Abweichend von Kapitel 2.2.2.2 wurde die Proteinexpression bei OD<sub>600</sub> = 1,0 mit 0,1 mM IPTG induziert und die Bakterienzellen nach Induktion für 16 h bei 22 °C kultiviert.

#### Puffer I

- 50 mM NaP<sub>i</sub>
- 300 mM NaCl
- 2,5% Glycerol
- 5 mM Imidazol
- pH 8,0

#### Puffer II

- 50 mM NaP<sub>i</sub>
- 300 mM NaCl
- 2,5% Glycerol
- 500 mM Imidazol
- pH 8,0

#### Dialysepuffer

- 50 mM NaP<sub>i</sub>
- 150 mM NaCl
- 2,5% Glycerol
- pH 8,0

#### SEC-Puffer

- 10 mM HEPES
- 150 mM NaCl
- pH 7,5

Bakterienzellen, die bei -20 °C gelagert wurden, wurden auf Eis auftauen gelassen. Ein Zellpellet von 3 L Kulturvolumen wurde in 150 mL Puffer I resuspendiert und 1 mM Benzamidin, 1 mM PMSF, eine Proteaseinhibitor-Tablette sowie jeweils eine Spatelspitze DNase, RNase und Lysozym hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde ~10x für 1:30 min bei 5x 10% *cycle* mit einer Intensität von ~60% auf Eis mit Ultraschall aufgeschlossen. Um ein Überhitzen der Probe zu verhindern, die Suspension zu mischen und den Fortschritt des Zellaufschlusses zu beurteilen wurde zwischen den Ultraschalleinheiten jeweils etwa 1 min pausiert. Durch Zentrifugation für mindestens 45 min bei 4 °C und 20000 rpm wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt. Alle nachfolgenden Aufreinigungsschritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Der Überstand nach Zentrifugation wurde zweimal auf eine NiNTA Affinitätssäule mit einem Säulenvolumen von 4 mL aufgetragen, um das His<sub>6</sub>-SUMO-ELD-Fusionsprotein an die Säulenmatrix zu binden. Die Affinitätssäule wurde mit 20 CV Puffer I gewaschen. Das Fusionsprotein wurde in sechs Elutionsschritten mit je 2 CV Puffer II von der Affinitätssäule eluiert. Mittels Nanodrop wurde die Absorption der Elutionsfraktionen bei 280 nm bestimmt und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten der jeweiligen ELD-Konstrukte (siehe Tabelle 6-21) berechnet. Es wurden Elutionen, deren Abs<sub>280</sub> ≥ 0,01 AU waren vereinigt. Der His<sub>6</sub>-SUMO-Tag des Fusionsproteins wurde während einer Dialyse gegen Dialysepuffer über Nacht durch Ulp-1-His<sub>6</sub>-Protease von ELD abgespalten (molekulares Verhältnis His<sub>6</sub>-SUMO-ELD:Ulp-1-His<sub>6</sub> 15:1). Nach der Restriktion des Fusionsproteins wurde eine zweite NiNTA Affinitätssäule durchgeführt um His<sub>6</sub>-SUMO, Ulp-1-His<sub>6</sub> und ungeschnittenes Fusionsprotein von freier ELD abzutrennen. Die Proteinlösung wurde zweimal auf eine zweite NiNTA Affinitätssäule aufgetragen und der Durchfluss enthielt His<sub>6</sub>-SUMO-freie ELD. Die Affinitätssäule wurde in sechs Waschschritten mit je 1 CV Dialysepuffer gewaschen. Waschfraktionen, deren Abs<sub>280</sub> ≥ 0,01 AU waren, wurden mit dem Durchfluss der Affinitätssäule vereinigt und aufkonzentriert. In einem finalen Aufreinigungsschritt wurde eine SEC durchgeführt. Die Reinheit der ELD-Proteinlösung wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

Tabelle 6-19 Im Rahmen dieser Arbeit gestaltete und verwendete Oligonukleotide zur Generierung der Plasmide p262, p320 und p329 (siehe Tabelle 6-20). Die Oligonukleotide wurden von Sigma Aldrich, Darmstadt hergestellt.

Verwendung	AK-interne Nummerierung und Name	Sequenz 5'-3'
Beginn des <i>hsTRPML2</i> ELD-Konstrukts mit Gly84	P407 <i>hsTRPML2_G84toF93_for</i>	gagcaaccagctggtggtggcggttaaagaaga caatacggctgcatttaaacac
	P408 <i>hsTRPML2_G84toF93_rev</i>	gccaccaccagctggtgctcaggccaccaccaa tctgttcacgatgg
Beginn des <i>hsTRPML2</i> ELD-Konstrukts mit Ala92	P600 <i>hsTRPML2_A92toF93_for</i>	ggtggtgctggttaaagaagacaatacggctgcatt taaacac
	P601 <i>hsTRPML2_A92toF93_rev</i>	cttctttaaacgcaccaccaatctgttcacgatgg
Termination des <i>hsTRPML2</i> ELD-Konstrukts nach Lys285	P592 <i>hsTRPML2_toK285_for</i>	ggcagcacgcagaaataaggatccggctgctaa caaagcccg
	P593 <i>hsTRPML2_toK285_rev</i>	gcagccggatccttatttctgctgctgccgaaga tgttcagatcttac

Tabelle 6-20 Verwendete Plasmide für die Klonierung und Expression von ELD-Konstrukten. Die Plasmide sind nach der in der Arbeitsgruppe internen Nummerierung der Plasmide (#) sortiert

#	Vektor	Bezeichnung	Verwendung	Herkunft
p043	pET11a	HisSUMO- <i>hs</i> ML2 loop1	Expression des Fusionsproteins His <sub>6</sub> -SUMO-ELD <sup>K94-V290</sup> in <i>E. coli</i>	GenScript, Leiden, Niederlande; Dr. [REDACTED] [REDACTED]
p062	pET28a	Ulp-1	Expression von Ulp-1-His <sub>6</sub> in <i>E. coli</i>	Dr. [REDACTED], Goethe Universität Frankfurt am Main
p262	pET11a	<i>hs</i> ML2_Loop1_G84-V290_NtermHisSUMO	Expression des Fusionsproteins His <sub>6</sub> -SUMO-ELD <sup>G84-V290</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p320	pET11a	<i>hs</i> TRPML2_linkerI-II-G84-K285	Expression des Fusionsproteins His <sub>6</sub> -SUMO-ELD <sup>G84-K285</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
p329	pET11a	<i>hs</i> TRPML2_linkerI-II-A92-K285	Expression des Fusionsproteins His <sub>6</sub> -SUMO-ELD <sup>A92-K285</sup> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit

Tabelle 6-21 Ausgewählte Eigenschaften der verwendeten ELD-Proteinkonstrukte. Die Konstrukte sind nach der in der Arbeitsgruppe internen Nummerierung der Plasmide (#) sortiert, aus denen diese nach Expression und Aufreinigung resultieren. Angegeben ist der Name des Konstrukts, der Extinktionskoeffizient bei 280 nm in M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (mit ProtParam von ExpAsy bestimmt), das Molekulargewicht in Da und die Anzahl der Aminosäuren.

#	Konstrukt	Extinktionskoeffizient bei 280 nm [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	MW [Da]	Aminosäureanzahl
p043	His <sub>6</sub> -SUMO-ELD <sup>K94-V290</sup>	23630	34141,27	295
	ELD <sup>K94-V290</sup>	22140	22900,63	197
p062	Ulp-1-His <sub>6</sub>	30035	26712,4	229
p262	His <sub>6</sub> -SUMO-ELD <sup>G84-V290</sup>	23630	35170,47	305
	ELD <sup>G84-V290</sup>	22140	23929,84	207
p320	His <sub>6</sub> -SUMO-ELD <sup>G84-K285</sup>	22140	34594,85	300
	ELD <sup>G84-K285</sup>	20650	23354,22	202
p329	His <sub>6</sub> -SUMO-ELD <sup>A92-K285</sup>	22140	33783,90	292
	ELD <sup>A92-K285</sup>	20650	22543,27	194

## 6.4 Plasmidsequenzen

### 6.4.1 Plasmidsequenz p043 pET11a\_His<sub>6</sub>-SUMO-ELD<sup>K94-V290</sup>

Im Folgenden ist die Plasmidsequenz von pET11a mit dem ELD<sup>K94-V290</sup>-Konstrukt in dem offenen Leseraster aufgeführt.

```

ttcttgaagacgaaaggcctcgtgatacgcctatTTTTataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggt
ggcacttttcgggaaatgtgCGCGgaaccctatTTGTTatTTTTctaaatacattcaaataatgtatccgctcatgagac
aataaccctgataaaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagattcaacatttccgtgtcgcccttatccctt
TTTTgCGGCatTTTgCcttCctgTTTTgctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgca
cgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttCGCCCGaagaacgTTTTccaatgatga
gcactTTTaaagtctgctatgtggcgggtattatcccggtgtgacgCGGGcaagagcaactcggtcgCGcatacacta
ttctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagt
gctgccataaccatgagtgataaactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctTTTT
tgcaacaatgGGGGatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtga
caccacgatgctgcagcaatggcaacaacttgCGcaaaactattaactggcgaactacttactctagcttccgggcaaca
ttaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggttattgctgata
aatctggagcgggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggaagccctcccgatcgtagttat
ctacaCGacgggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattgg
taactgtcagaccaagtttactcatatatactTTAgattgatttAAAacttcatTTTTaatttAAAaggatctaggtgaaga
tcTTTTtgataatctcatgacaaaaatcccttaactgagtttCGTtccactgagcgtcagaccCGtagaaaagatcaa
aggatcttcttgagatcctTTTTctgCGcgtaatctgctgcttgcaaacAAAAaaccacCGctaccagcgggtggttgg
ttgCGCGatcaagagctaccaactTTTTccgaaggttaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtcctctag
tgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtgcc
tgctgccagtgccgataaagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaaggcgcagcggctcggctga
acggggggttctgTCacacagccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaa
gcGCCacgcttccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgagggagct
tccagggggaaacgcctggtatctttatagtctgtcgggttccGCCactctgacttgagcgtcgatTTTTgtgatgctcg
tcaggggggCGgagcctatggAAAAcGCCagcaacCGGcctTTTTacggttctggcctTTTTgctggcctTTTTgctcaca
tgtcttctcctgcttatccctgattctgtggaataccggtataccgctttagtgagctgataccgctcGCCcagcCG
aacgacCGagcgaCGagtcagtgagcGaggaagCGgaagagcCGctgatgCGgtatttctcctacgcatctgtcCGgt
atctcacaccgcatataggtgcaactctcagtaacaactctgctctgatgccgcatagttaaagccagtatacactccgctatcg
ctacgtgactgggtcatggctgCGccCGacaccCGcaaacaccCGctgacgCGcctgacgggcttctgctcCGcctat
ccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttaccgctcatcaccgaaacgCGcGagga
gctcCGgtaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcattcacagatgtctgctgttcatccgctccagctcgttgagttc
tccagaagcgttaatgtctggctctctgataaagcGGccatgtaaggcgggtTTTTcctgcttggctcactgatgctccg
tgtaaaggggatttctgcttcatggggtaatgataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatga
acatgcccggttactggaacgttgtgagggtaaaactggcggatggatgCGcgggaccagagaaaaatcactcaggggt
caatgccagcgttctgtaataacagatgtaggtgttccacagggtagccagcagcatcctgcgatgcagatccggaacataa
tggtgcagggcgtgacttccgcttccagactttacgaaacacggaaaccgaagaccattcatgttgttgctcaggtcgc
agcgttttgCagcagcagtcgcttcaGttcGctcGctatcggtagttcattctgctaaacagtaaggcaacccCGcag
cctagcCGgttctcaacgacagagcagcatcatcgcgaccctgGCCaggaaccaacgctcCGcagatgcCGcCGctgc
ggctgctggagatggcggacCGatggatgtctccaaaggttgggttgcgcatcacagttctccgcaagaattgatt
ggctccaattcttgagtggtgaatccggttagcagaggtgCGcCGcctccattcaggtcgaggtggccCGctccatgcac
cgcgacgcaacgCGgggagcagacaaggtataggcggcgcctacaatccatgccaaaccgcttccatgtgctcGcCGaggc
ggcataaatcGcCGtgacgatcagcggccagtgatcgaagttaggctggttaagagcCGcGagcagatccttgaagctgtccc
tgatggtcgtcatctacctgcctggacagcatggcctgcaacCGggcctcccgatgccgCGgaagcGagaagaatcataa
tggggaaggccatccagcctcGctcGcgaacGCCagcaagcgtagccagcGctcGgCGccatcCGcGgataaatggc
ctgcttctcGCGaaacgTTTTggtggCGggaccagtgacgaaggttgagcGagggcgtgcaagattccgaataccGcaagc
gacagggcGatcatcgtcGcGctccagCGaaagcGgtcctcGCGaaaatgaccagagcGctcGCGcaccctgtcctacga
gttgcatgataaaagaagacagtcataagtgCGgCGacgatagtcgccccGCGccaccCGgaaggagctgactgggttgaa
ggctctcaagggcatcggctcgagatccGGtgCctaatgagtgagctaaacttacctaatTTGcgttGcGctcactgcccGct
tccagtcGGgaaacctgtcgtGCCagctgattaatgaatCGGcaacCGcGCGgggagagggcgttGcGtattggcGcGc
aggtggTTTTcttccaccagtgagacGGGcaacagctgattGCCcttaccGctggcctgagagagttGcGcaagc
ggtccacgctggttggccccagcagCGaaaactcgtttgatggtggttaacCGcGGgataaactgagctgtctcGGt
atcgtcgtatcccactaccgagatccGcaccacCGcGcagccCGgactcggtaatggcGcGcattGcGcCGcagcGcctc
tgatcgttggcaaccagcatcGcagtggaacgatgccctcattcagcatttGcatggttGttgaaaacCGgacatggcac
tccagtcGccttccGtccGctatcggctgaatttGatTgcgagtgagatatttatGCCagccagccagacGcagacGcGc
CGagacagaacttaatgggccccGctaacagcGcGatTTgctggtgaccaatGcGaccagatgctccacGccagtcGcGta
ccgctctcatgggagaaaataactgTTgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacCGCGaacattagtgcaagg
cagcttccacagcaatggcatcctggtcatccagcGgatagttaatgatcagcccactgacgCGttGcGcGagaagattgtg
caccGcGcttaccagccttGcagcCGcctcGtctaccatGcacaaccacGctggcaaccagttgatcggcGcGagat
ttaatcGCGcGacaatttGcGacGCGcGctGcagggccagactggaggtggcaacGccaatcagcaacGactgttGcccc

```

ccagttgttgtgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatcgcgcttccactttttcccgcggttttcgcgaaac  
gtggctggcctggtcaccacgcgggaaacgggtctgataagagacaccggcactactctgcgacatcgtataacggttactggt  
ttcacattcaccaccctgaattgactctctccgggctatcatgccataaccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgt  
ccgggatctcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccggttgagcaccgccc  
ccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccggccaaggggcctgccaccatcccacgcccgaaca  
agcgtcatgagccgaagtggcgagcccgatcttcccacggtgatgctggcgatataaggcgcagcaaccgacctgtg  
gcgcccgtgatgcccggccacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaat<sup>taatac</sup>gactcactatagg  
ggaattgtgagcggataacaattcccctctagaataaattttgtttaactttaagaaggagatata<sup>catatg</sup>GCTAGCGGTC  
ATCACCATCATCATCACGGGTCCGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATC  
TTCAGAGATCTTCTTCAAGATCAAGAAAACACCCCACTGCGTCGGCTGATGGAAGCGTTCGCTAAACGTCAGGGTAAAGAG  
ATGGACAGCCTGCGCTTCTGTATGATGGCATTTCGCATTTCAGGCGGATCAGACCCCGAAGACCTGGACATGGAAGATAACG  
ATATCATTGAGGCCCATCGTGAACAGATTGGTGGTAAAGAAGACAATACGGTTCGCATTTAAACACCTGTTCTGAAAGGCTA  
CTCGGCACGGACGAAGACGATTACTCTGCTCAGTTTATACCCAGGAAGATGCGTACGAAAGTATTTTCTTTGCCATCAAC  
CAGTATCATCAACTGAAAGACATTACCTGGGCACGCTGGGCTACGGTGAAAACGAAGATAATCGTATCGGCCGTGAAAGTTT  
GCAACAACACTATAAGAAAGGCACCATGTTCCCGTCCAACGAAACGCTGAACATTGATAATGACGTGGAAGTGGACTGTGT  
TCAGCTGGATCTGCAAGACCTGAGCAAAAAACCGCCGATTGGAAAAATAGCAGCTTTTTCCGCTGGAATTTTACCGCTG  
CTCGAGGTCGAAATCTCATTCCATCTGAAAGGCATTGATGTGCAAAACCATCCACTCGCGCAACTGCCGGACTGCTATGTGT  
TCCAGAACACGATCATCTTCGATAACAAAGCACATGTTGTAATAAATAAATCTACTTCGATTCCGATTAATACTGAAGA  
ATGTAAGATCTGAACATCTTCGGCAGCACGCAAAAAACGCCAATATGTCTAA<sup>ggat</sup>ccggctgctaaacaaagcccga  
ggaagctgagttggtgctgcccaccgctgagcaataact<sup>agc</sup>ata<sup>acc</sup>cctt<sup>gggg</sup>cct<sup>ta</sup>aac<sup>cg</sup>ggt<sup>ctt</sup>g<sup>ag</sup>gggt<sup>ttt</sup>  
<sup>tt</sup>gctgaaaggaggaactat<sup>at</sup>ccggat<sup>at</sup>cccgaagaggcccggcagtagccgataaccaagcctatgcctacagc  
cagggtagcggtagccgagatgacgatgagcgcattgttagat<sup>tt</sup>cat<sup>ac</sup>aggtg<sup>c</sup>cctgactg<sup>cg</sup>ttagca<sup>at</sup>tt<sup>aa</sup>ctg<sup>t</sup>  
gataaactaccgcattaaagctt<sup>at</sup>cgatgataagctgtcaaacatgagaa

T7-Terminator; Lac-Operator; NdeI; His<sub>6</sub>-Tag; SUMO; ELD-Gensequenz; BamHI, T7-Terminator

## 6.4.2 Plasmidsequenz p108 pETtrx\_1b\_TbTpx

Nachfolgend ist die Plasmidsequenz von pETtrx\_1b mit dem Insert *TbTpx* dargestellt. Innerhalb der Gensequenz von *TbTpx* ist die NcoI Schnittstelle durch eine stille Mutation ersetzt:

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACACTTGCC  
AGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGTTTCTTCCCTTCTTTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATC  
GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAGTATTAGGGTGATGGTTCACGTAG  
TGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTGTTCCAACT  
GGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGTATTATAAGGGATTTGCGGATTTCCGCTATTGGTTAAAAATG  
AGCTGATTTAACAAAAATTAACCGGAATTTAACAAAAATATAACGTTTACAATTTTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGT  
GCGCGAACCCTATTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATTCTTAGAAAACTCATC  
GAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGA  
GAAAACACTCACCGAGGAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAAC  
CTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGTTATCAAGTGAAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAA  
AAGTTATGCAATTTCTTCCAGACTTGTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAATCACTCGCATCAACCAAACCG  
TTATTCATTCTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACCGGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCA  
ACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTT  
CCCGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGATACGGATAAAATGCTTGATGGTTCGGAAGAGGCATAAATCC  
GTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTTCAGAAACAACTCTGGCG  
CATCGGGCTTCCATACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATC  
AGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTG  
TTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA  
GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAG  
CGTGGTTTTGTTTCCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATAC  
TGCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGT  
TTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGC  
GGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA  
GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGC  
ACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT  
TGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCGCC  
TTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCT  
CGCCGAGCCGAACGAGCGAGCGAGTCACTGAGCGAGGAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGATTTTCTCCTTACCGC  
ATCTGTCCGGTATTTACACCCGATATATGGTGCACCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACA  
CTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCTAGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCT

GCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTCCCGTCATCACCGAAA  
 CGCGCAGGCAGCTGCGGTAAGCTCATCAGCGTGGTCTGTAAGCGATTACAGATGCTGCCTGTTTCATCCGCGTCCAGCT  
 CGTTGAGTTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTGTTTGGTTCAC  
 TGATGCCTCCGTGTAAGGGGATTCTGTTTCATGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGTT  
 ACTGATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAA  
 TCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTCGATGCAGAT  
 CCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTT  
 GCTCAGGTGCGCAGACGTTTTGTCAGCAGCAGTGCCTTACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTTCATTCTGCTAACAGTAAGGC  
 AACCCCGCCAGCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGATCATGCGCACCCGTTGGGGCCGATGCCGGCGATAATGGC  
 CTGCTTCTCGCCGAAACGTTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGAAGATTCCGAATACCGCAAGC  
 GACAGGCCGATCATCGTTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGA  
 GTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCAGCATAGTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAA  
 GGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCAATGAGTGAGTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCT  
 TTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGTTTGGCTATTGGGGCC  
 AGGGTGGTTTTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGC  
 GGTCACGCTGGTTTGGCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGTT  
 ATCGTGTATCCCACTACCGAGATATCCGACCAACGCGCAGCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTCGCCCCAGCCCATC  
 TGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTAGCATTTGATGTTTGTGAAAACCGGACATGGCAC  
 TCCAGTCGCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCGAGCCGCG  
 CGAGACAGAATTAAATGGGCCCGTAACAGCGGATTTGCTGGTGACCAATGCGACCAGATGCTCCAGCCAGTCGCGTA  
 CCTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGTGTCTGGTTCAGAGACATCAAGAAAATAACCCGGAACATTAGTGCAGG  
 CAGCTTCCACAGCAATGGCATCTGGTTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTG  
 CACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCAGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGGAGAT  
 TTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTCCCG  
 CCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGAGAAA  
 GTGGCTGGCCTGGTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCGGACATCGTATAACGTTACTGGT  
 TTCACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGCGCTATCATGCCATACCGGAAAAGGTTTTGCGCCATTTCATGGTGT  
 CCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCGGTTGAGCACCGCCG  
 CCGAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCAAACAGTCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATAACCACGCGGAAACA  
 AGCGCTCATGAGCCGAAAGTGGCGAGCCGATCTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTG  
 GCGCCGGTGTGCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGG  
 SGAAT TGTGAGCGGATAACAATCCCTCTAGAAATAATTTGTTAACTTTAAATATATACCATGAGCGATAAAAAT  
 TATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGG  
 TGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACTGA  
 ACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGT  
 GGCGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGTAACCTGGCCGGATCTGGCAGTGGT  
 TCTGGTCATCACCATCACCATCACCTCCGCGGGTAGCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCGCCATGGGTTCTGGCCTCGTAAGT  
 ATCTTCCTGGCGCAACCAACCTGTGTCCAAGTCCGGTGAAGTTTCACTGGGATCCCTCGTTGGGAAAACCTGTGTTTCTTTA  
 CTTTTCTGCCTCCTGGTGGCCCCCATGCCGGGTTTTACACCGTCTCGCCGAGTTCTACGAGAAGCATCATGTGGCGAAA  
 AACTTCGAAGTCTGCTGATTTCTGGGATGAAAACGAGAGCGACTTCCATGATTACTACGGCAAGATGCCGTTGGCTCGCTC  
 TCCATTGACCAACGCTCGACAGTTTCGGAATGGGCAAGACATTTGGCGTGGAAATCCATTCCGACTCTTATCACAAATCAA  
 TGCTGATACCGGTGCCATCATTGGCACTCAGGCCCGTACCCGTGTCATTGAGGATCCCGATGGTGCCAACTTTCCGTGGCCC  
 AACTGACTCGAGCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCA  
 CCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACATATC  
 CGGAT

T7/lacO promotor; *trp*; Trx-Löslichkeitstag; His<sub>6</sub>-Tag; TEV-Schnittstelle; NcoI; Insert *TbTpx* mit stiller  
 Mutation um die NcoI Schnittstelle innerhalb des Gens zu entfernen; G Punktmutation; XhoI; Pet-RP

### 6.4.3 Plamidsequenz p220 pETtrx\_1b\_TbPxIII

Die Gensequenz des Plasmids pETtrx\_1b mit integrierter Sequenz von *TbPxIII* ohne mitochondriale Zielsequenz ist nachfolgend aufgelistet:

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTACCCTACACTTGCC  
 AGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTTCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATC  
 GGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGTTACAGTAG  
 TGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGACTCTTGTCCAACT  
 GGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTCCGGCTATTGGTTAAAAAATG

AGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGT  
GCGCGGAACCCCTATTGTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATTCCTTAGAAAACTCATC  
GAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTTCTGTAATGAAGGA  
GAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAAC  
CTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAA  
AAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCG  
TTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCA  
ACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTT  
CCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTC  
GTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAAACACTCTGGCG  
CATCGGGCTTCCATAACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCGACATATCGCGAGCCATTTATAACCCATATAAATC  
AGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCTTAGAGCAAGACGTTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTG  
TTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA  
GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCCGCTACCAG  
CGGTGGTTTTGTTTCCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAATC  
TGCTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCATTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTGCTAATCTGTA  
TTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGC  
GGTCGGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGCAACGACCTACACCGAATGAGATACACAGCGTGA  
GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGC  
ACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCCGCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT  
TGTAATGCTCGTCAGGGGGCGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCTGGCTTTTGCTGGCC  
TTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCT  
CGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGGAGTCAAGTGTAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGC  
ATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATAACA  
CTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCTAGGCTGCGCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCT  
GCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTACCGTCATACCCGAAA  
CGCGCGAGGCAGCTCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTATCCGCGTCCAGCT  
CGTTGAGTTTTCTCCAGAAGCGTTAATGCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCTGTTTGGTCAC  
TGATGCCCTCCGTGTAAGGGGATTTCTGTTTATGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTT  
ACTGATGATGAACATGCCCGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAA  
TCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTGCGATGCAGAT  
CCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTATGTTGTT  
GCTCAGGTGCGCAGCAGTTTTGTCAGCAGCAGTCTGCTTACGTTCTGCTCGGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGC  
AACCCCGCCAGCCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGCATATGCGCACCCGTTGGGCGCCCATGCCGGCGATAATGGC  
CTGCTTCTCGCCGAAACGTTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTCAAGATTCCGAATACCGCAAGC  
GACAGGCCGATCATCGTCCGCTCCAGCGAAAGCGGCTCTCGCCGAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTTACGA  
GTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGGCGGACGATAGTCATGCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAA  
GGCTCTCAAGGGCATCGTGCAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAAGTTACATTAATGCGTTGCGCTCACTGCCCGCT  
TTCCAGTCGGGAAACCTGCTCGTCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGCGCC  
AGGGTGGTTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCTTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGC  
GGTCCACGCTGGTTTTGCCCGCAGCGGCAAAATCCTGTTTGTATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGT  
ATCGTCGTATCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCCCGCAGCGCCATC  
TGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACGATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCAC  
TCCAGTCGCCTTCCCCTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGC  
CGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCCGCTA  
CCGTCTTCATGGGAGAAAAATAACTGTTGATGGGTGCTGGTGCAGAGACATCAAGAAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGG  
CAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTG  
CACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCGCCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGAT  
TTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCG  
CCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCTTTTTGCGAGAAAC  
GTGGCTGGCCTGGTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCCGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGT  
TTCACATTCACCACCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATAACCGGAAAGGTTTTGCGCCATTTCGATGGTGT  
CCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCTGCTATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCG  
CCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCTGCCACCATAACCCAGCCGAAACA  
AGCCCTCATGAGCCGAAGTGGCGAGCCGATCTTCCCATCGGTATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCCGACTCTGTG  
GCGCCGGTATGCCGGCCAGATCGTCCGGCTAGAGGATCGAGATTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGG  
GGAAATGTGAGCGGATAACAATCCCTCTAGAAAATAATTTTTGTTAACTTTAAATATATACCATGAGCGATAAAAAAT  
TATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACCGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGG  
TGCGGTCGGTGCAAAATGATCGCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACTGACCTTGCAAAACTGA  
ACATCGATCAAAACCCCTGGCACTGCGCGGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAACGGTGAAGT  
GGCGGCAACCAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCTCGACGCTAACCTGGCCGGATCTGGCAGTGGT

TCTGGT**CATCACCATCACCATCAC**TCCGCGGGTAGCGAGAA**TCTTTATTTTCAGGGCGCCATGGG**TCGTCAATCTTTGACT  
 TTGAGGTGCTTGACGCCACCATAAGCCATATAATCTCGTGCAACACAAGGGCTCTCCGCTACTGATATACAATGTGGCAAG  
 TAAATGCGGTTACACAAAGGGTGGTTATGAAACGGCGACAACACTCTACAACAAGTACAAGTCACAGGGCTTCACTGTTCTG  
 GCGTTCCCGTGTAA**CCAATTTGGTGGTCAGGAACCCGGAAACGAGGAGGAAATCAAGGAGTTTGTATGCACCAAGTTCAAGG**  
 CTGAGTTTCCAATTATGGCGAAAAATTAACGTAAATGGTGAAAACGCACACCCATTGTATGAGTACATGAAAAAACTAAACC  
 TGGTATCCTTGCACGAAGGCTATCAAA**TGGA**CTTTACATCCTTCTCATTGATCGAGATGGCGTACCCCGTGGAGCGCTTC  
 TCACCTGGTGCCCTGTGAAGGATATTGAGGAAAACTCATTCCGCTGCTCGGGAGTGCAGC**ACTT**GAAAGAAGAATACGT  
 CTCTGGACGGTACC**GGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGAC**AGCTT**GCGGCCGCACTCGAG**CACCACCACCACCACCCTGAG  
 ATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCA**CCGCTGAGCAATAACTAG**CATAACCCCTTGGGGC  
 CTCTAAACGGGCTTGGAGGGTTTTTTGGCTGAAAGGAGGA**ACTATATCCGGAT**

**T7/lacO promotor**; **lac**; Trx-Löslichkeitstag; **His<sub>6</sub>-tag**; **TEV-Schnittstelle**; **NcoI**; **TbPxIII Sequenz ohne mitochondriale Zielsequenz**; **Acc65I**; **BamHI**; **EcoRU**; **SacI**; **Sall**; **HindIII**; **NotI**; **XhoI**; **Pet-RP**

#### 6.4.4 Plasmidsequenz p166 pHD1700\_dTRPML

Die Gensequenz des Plasmids pHD1700 mit integrierter Sequenz von dTRPML ist nachfolgend aufgelistet:

GAATTCGAGCTCATATAGTTGGTATGTATTCTAATTCAGACTACTGGCGTGGGATAAAACATGTCCCCTGATTA**AAAGGAA**  
 AGATTCCATAGCCATTAGTGCAAAGATAATTGGTACACCGTCAAAAAACATGGGAGACCACACGATACGACACTGTGACC  
 GTAGCATCAATTCGCACACTCGATATAACTCTATCGAAGAACTTCCATGGTACAAACTGGTCCGACCGTCTGCTCCACACGG  
 AGATCATCGTATCATTTTTATCGATAGCGGCCGCTATCGATGTATGCCTTGGCCCTGATGGCATGCCAATTTCACTACAACG  
 GACTATGTGGACCCCGTTATCATGGAAATGCGCTAGTTGGAGGAAGTTAGACCGCGCCGAAAAGAGAGGGGTAGAGAAAAAT  
 GACAACCTGGAAGATATCCACACACGCACCGGTGAAACGTTAGCAACAATTATTAGGGAAGCAGCGTTGCCCTAGTCCCACGA  
 GTAACCAAGACTCCAAAAGCCTTTCTGGCACAGAGAGCGAGCCGAAATGGAAAAGAGAAACAATGCCTGACTAACACTACT  
 GAGCGATTGCGCTCGCCGGGAGGACCGAATACTAATAACGACACTTGGCGTCAAAAAGTAGAAGAACAATGCTCAACGAT  
 GAGTGAATCAGGTTAGGGTAGTTGGAAAATTATACAGAATGTCTTTGGCAACACACCCGGTACCG**TCATTGGGGTTAAGCGGA**  
**AAGTGTGTGTCAGTAGGTTGTGAGGTGAAAGCGTTTT**CAGATGCATAGT**GAGCTTAATGTCTTTT**CACAGTATATCGT**GT**  
**CTGATAGGTATCTCTTATTAGTATAGT**CGAATACTAGTCAATAGT**GCGTTTT**GTGCAAAATGTCCATTT**GTGGCAGTGATG**  
**GGTGTTTTTATGCTATTCCGTGCTCTGGGTGGCGTGCATTGAAAATAGGGGTTATCGGGT****agggatctccctatcagtg**  
**atagagatctccctatcagtgatagagatccc**tGAGTACTGAGTTA**ACATGTTCTCGTCCC**GGGC**TGCACGCGCCTTCGAG**  
**TTTTTTTTCTTTTCCCAATTTTTT**CAACTTGAAGACTTCAATTACACC**AAAAGTAAAATTCAC****agccttatgcagagct**  
 acgccccggagcccagacagctccggccgtcaagcgcgcacggacagctacgaggctgccagcaacagcagcagctcgcc  
 ggagagcagcaggagtagctgaacaccaggatactcggcgccaagtgcagctgcagctccactccggtggccccggtggtg  
 cccatgcccatatccgcccgttagtggcactgccccaccctccgtggatggccgcgaggagcagccogaattccccggatcct  
 cggctgcactctaccaggaggagcgaatgcgcaggaagcttcagttctctttatgaacccattgagaaatggcagggccaa  
 gcggaaatctcgtacaagttcgttgtgcagattgtaaaaatcttctggtgacgatgcaattgtgccttttggccactcg  
 cgtataaccacatcaactacacgggtgataaccgatttgcctctcacatctattcctgcgcggtgggattcttcccggg  
 aggtggagagttatccgctgctgtgggtcccttctgctctatacctcaaatcggagttcttcgacactgtgcagtagcagt  
 caatggctacgcgaatgaagccgatctattggaccatcagactaccgcagcccaataacacaatgccgccactaaagctt  
 tgctgcagaactatagagagggcaccatatttggcttaatgagtcctacatttctgatccacatctcgacgaggtgtgtg  
 agcgactacctccgaacgtaaccaccattgggggtggagaattacctcaggcagcgcgatgtggaggtcaatttgcactct  
 tgtctccgcacagttgacgttcaagataaagacgggttaatttcaaggcaaatggtggacctcttctgctcctgattgtttt  
 cggtttgacatttccataacgtttaacaaccgagaccatgacgggcaaatgctgctctcactggatgaggaggcagcgcggc  
 tgaagtgccacggagcaacggacttcatatcagacgccaatttctgattccatgctgcgaagcgtacttaatatattcgtcct  
 actaacatgcgcaactatcctttgcaactctgtacaagggtctgtggagagcatatctgctgagatgtacaactgtcaacttt  
 ttccgctcgcaattcggcaaggagctgagctttgacggccgactggaattcgttaacttttggtagatcatgatcattttca  
 atgacgtccttttgatcattggatcagctctaaaagagcaaatcgagggaaggtacttgggtggtggaccaatgggatacctg  
 ctgccttttctgggaattggcaacctgcttgtttggttcggagtgctgcgctacctcggctctctcaaacctacaacgtt  
 gtgatactgacgtgaaaaagcggcaccacaagattctgcgcttcttctatcgccgcttctgctgatctatgctggatttgtg  
 tttgcggtggctgatcttgggacctatcacatgaagttccgatcgctggctacaacgtcagagtgcttgtttgcgctgat  
 aaocggtgatgatgttcgccacctttgccacgctttccagcaaggccacctggctgtggtggtctgcccagatctacttg  
 tactcgttcataatccttgcactttatgtggtcctgtgcgctgttcttgcgctcataatggatgctcagcagcagataaagg  
 cgtattacaagtaggctttcccaccacagctctcaagcatttgcggaacgcgcactgcagaggaacattagttctggtg  
 ctctcatgaccgacctggacgacttcgaccagacgactccttgcgctggtgaagagcatttgcgctgtggtgagcgggt  
 cggcatcaggagcccggccagccaacagtggttacaccagccttctagattatgaag**ggatcc**AAC**GAGCAAAAGCTCA**  
**TTCTGAAGAGGACTTGTAAATTAACGAGC**AAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTT**GTAACACCGGGTGTGTGGCCAAAAT**  
**GTCTGTAGTCGCTGTGAGTTGACACGGCTAGTGCTTATGATTTTTCTCGCGTGTGGTGCTGTACTCAGCCCTATGCCTTA**

TTTGCAACACATTTACGTACAGCGCACAAAGAGAAGAGAAGATCACTTGAAGATAATAAATATAGGGTTGTAGGCATCTTGT  
TAACTCAAATTTTCTCGTCTTGGTGTGTCGACATGATTGAAATAGTGCCACCAGTTGTGTTTATGATGCGTTTGTATCTATGC  
AGTATTCTGCAGTTTAAATTTGTTGGATGAGCTATTTCAATAATTTTTTGCCTTCTCTCTTTTGGGTTTCGCTCGAGTTTCC  
ACCCAGCGCGGGTGCATTCTGGCTCTTATATATACTTATTGTCATGACAGAGTATATTGTACTGTGTTGATAAGGGACGGGT  
AACTGTAATTGAAGAGCCGATGCTTTTACATGTTAGATATAATATGTTTATTGTAAGTCAATACAACACACAATAGGATA  
ATAATGATAAAGTTAAAAAGTATATATAGTAATAGAAATATATCTTATATAGGAAAGATTAAGCAGTAAAAAGTAGCGCTTA  
CGGCGTACGGAGCAGGAGAGCAACTGACCCTCTCAGAgcccGGGCACAGCAAGGTCTTCTGAAATTCATGTTTTTTTTTTT  
TTTACTCTGCATTGCAGTCTCCGCTCTTATTTAGTTTTGCTTTACGTAAGGTCTCGTTGCTGCCATAAAATTAAGCTctagaA  
CTAGTGATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGCTGTGCGAGAAGTTTTCTGATCGAAAAGTTTCGACAGCGTCTCCGACCTGA  
TGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGTCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTG  
CGCCGATGGTTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATT  
GGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAAC  
TGCCCGCTGTTCTGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCC  
ATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCATGTGTACTCTGG  
CAAATGTGATGGACGACACCGTCACTGCGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGG  
AAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTTCCGCTCCAACAATGTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCATTGACTG  
CAGCGAGCGATGTTTCGGGGATTTCCCAATACGAGGTCGCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTGTATGGAGCAG  
CAGACCGCTACTTTCGAGCGGAGGCCATCCGAGCTTCAGGATCGCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGATTGGTCTTG  
ACCACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTTTCGATGATGACGCTTGGCGCAGGGTTCGATGCGACGCAATCGTCCGATC  
CGGAGCCGGGACTGTCCGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGCCGCTTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCC  
GATAGTGGAAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGGGATCGATCCCCCGATCCT  
AACACCGGGTTGTGTGCCAAAATTTCTGTAGTCGCTGTGAGTTGACACGGCTAGTGCTTATGATTTTCTCGCGTGTGG  
TGCCGTACTCAGCCCTATGCCTTATTGCAACACATTTACGTACAGCGCACAAAGAGAAGAGATCACTTGAAGATAATA  
AATATAGGGTTGTAGGCATCTTGTTTAACTCAAATTTTCTCGTCTTGGTGTGTCGACATGATTGAAATAGTCCACCAGTTG  
TGTTTGTATGCGTTTGTATCTATGCAGTATTCTGCAAGGCCTTGCAAGGCCTTGCAAGGCCTTGCAAGGCATGCAAGCTAGCTTGTATTCTAT  
AGTGTACCTAAATCGTATGTGATGATACATAAGGTTATGTATTAATTGTAGCCGCTTCTAACGACAATATGTACAAGCC  
TAATGTGTAGCATCTGGCTTACTGAAGCAGACCCTATCATCTCTCTCGTAAACTGCCGTCAGAGTCGGTTTGGTTGGACGA  
ACCTTCTGAGTTTCTGGTAACGCCGTTCGCGACCCCGGAAATGGTCAGCGAACCAATCAGCAGGGTCATCGCTAGCCAGATC  
CTCTACGCCGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGGCCCTATATCGCCGACATCACCGATG  
GGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCCGTGGCCGGGGGACT  
GTTGGGCGCCATCTCCTTGACCATTCCTTGCGGCGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGC  
AGGAGTCGATAAGGGAGAGCGTGCATATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCCGA  
CACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCG  
GGAGTGCATGTGTGAGAGTTTCCACCGTCATCACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCTCGTGATACGCTATTTTTATA  
GGTTAATGTGATGATAAATAGTTTCTTAGACGTGAGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTA  
TTTTTCTAAATACAATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTCAATAATATTGAAAAAGGAAGA  
GTATGATATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTACCCAGAAAC  
GCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAATGGATCTCAACAGCGGTAAGATC  
CTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTA  
TTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGGCATACACTATTCTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAA  
GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTT  
CTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGG  
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACT  
ATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAAGGACCACTT  
CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAAGGCTGCGCGTATCATTGCAG  
CACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAGCAGGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAG  
ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGAT  
TTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGT  
TTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGTAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG  
CTTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC  
GGCTTACGACAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCAC  
CGCTTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTC  
AAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACC  
TACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGG  
TAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTT  
TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACCGCAGAACGCGCC  
TTTTTACGGTTTCTGGCCTTTTGGCTGGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGT  
TTACCGCTTTGAGTGAAGTGTATACCGCTCGCCGACGGCAACGACCGAGCGAGTCAAGTGAAGCGGAAAGCGGAAGA  
GCGCCCAATACGAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGCAGCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC  
TATAGGGAGACCG

---

RRNA\_SPACER, GPEET\_promoter, TET\_OP, EP\_5UTR, *HindIII*, dTRPML, *BamHI*, MYCTAG, MYCTAG, ACT\_3UTR, EP\_intergen, ACT\_5UTR, HygroR, ACT\_3UTR, SP6, Amp prom, AmpR, ColE1 origin, T7

## 6.5 Aminosäure- und Proteinsequenzen der Proteinkonstrukte

### PxIII (ohne mitochondriale Targetingsequenz)

tcgtcaatctttgactttgaggtgcttgacgccgaccataagccatataatctcgtgcaa  
 S S I F D F E V L D A D H K P Y N L V Q  
 cacaagggctctccgctactgatatacaatgtggcaagtaaatgacggttacacaaaggt  
 H K G S P L L I Y N V A S K C G Y T K G  
 ggttatgaaacggcgacaacactctacaacaagtacaagtcacagggcttcactgttctg  
 G Y E T A T T L Y N K Y K S Q G F T V L  
 gcggtcccgtgtaaccaatttgggtggcaggaacccggaaacgaggaggaaatcaaggag  
 A F P C N Q F G G Q E P G N E E E I K E  
 tttgatgcaccaagttcaaggctgagtttccaattatggcgaaaattaacgtaaatggt  
 F V C T K F K A E F P I M A K I N V N G  
 gaaaacgcacaccattgtatgagtacatgaaaaaaactaaacctggtatccttgcaacg  
 E N A H P L Y E Y M K K T K P G I L A T  
 aaggctatcaaatggaactttacatccttcctcattgatcgagatggcgtaccctgaggag  
 K A I K W N F T S F L I D R D G V P V E  
 cgcttctcacctgggtgcctctgtgaaggatattgaggaaaaactcattccgctgctcggg  
 R F S P G A S V K D I E E K L I P L L G  
 agtgcgcgactttga  
 S A R L -

### Tpx<sup>WT</sup>

ggttctggcctcgtaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcggtgaa  
 G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
 gtttactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctggtgc  
 V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
 cccccatgcccgggttttacaccggctcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
 P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
 aaaaacttcgaagtcgtgctgatttctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
 K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
 tacggcaagatgccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
 Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
 ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
 G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
 gccatcattggcactcaggcccgtaccctggtcattgaggatcccgatggtgccaacttt  
 A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
 ccgtggcccaactga  
 P W P N -

### Tpx<sup>S38A</sup>

ggttctggcctcgtaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcggtgaa  
 G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
 gtttactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcccgcgtgggtgc  
 V S L G S L V G K T V F L Y F S A **A** W C  
 cccccatgcccgggttttacaccggctcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
 P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
 aaaaacttcgaagtcgtgctgatttctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
 K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
 tacggcaagatgccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
 Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
 ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
 G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
 gccatcattggcactcaggcccgtaccctggtcattgaggatcccgatggtgccaacttt  
 A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
 ccgtggcccaactga  
 P W P N -

Tpx<sup>W39A</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcgggtgaa  
 G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
 gtttactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctccgcggtgc  
 V S L G S L V G K T V F L Y F S A S A C  
 ccccatgcccggggttttacaccgggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
 P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
 aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
 K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
 tacggcaagatgcccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
 Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
 ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
 G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
 gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgtcattgaggatcccgatggtgccaacttt  
 A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
 ccgtggcccaactga  
 P W P N -

Tpx<sup>W39F</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcgggtgaa  
 G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
 gtttactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcccttttgc  
 V S L G S L V G K T V F L Y F S A S F C  
 ccccatgcccggggttttacaccgggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
 P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
 aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
 K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
 tacggcaagatgcccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
 Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
 ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
 G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
 gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgtcattgaggatcccgatggtgccaacttt  
 A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
 ccgtggcccaactga  
 P W P N -

Tpx<sup>W39Y</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcgggtgaa  
 G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
 gtttactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctccctatttgc  
 V S L G S L V G K T V F L Y F S A S Y C  
 ccccatgcccggggttttacaccgggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
 P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
 aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
 K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
 tacggcaagatgcccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
 Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
 ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
 G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
 gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgtcattgaggatcccgatggtgccaacttt  
 A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
 ccgtggcccaactga  
 P W P N -

Tpx<sup>C40S</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcggtgaa  
G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
gtttcactgggatccctcggttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctggtcc  
V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W S  
cccccatgccccgggttttacaccggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
tacggcaagatgcccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
gccatcattggcactcaggccccgtaccggtgtcattgaggatccccgatggtgccaacttt  
A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
ccgtggcccaactga  
P W P N -

Tpx<sup>C43S</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcggtgaa  
G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
gtttcactgggatccctcggttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctggtgc  
V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
cccccatcccggggttttacaccggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
P P S R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
tacggcaagatgcccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
gccatcattggcactcaggccccgtaccggtgtcattgaggatccccgatggtgccaacttt  
A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
ccgtggcccaactga  
P W P N -

Tpx<sup>C40/43S</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcggtgaa  
G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
gtttcactgggatccctcggttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctggtcc  
V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W S  
cccccatcccggggttttacaccggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
P P S R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
tacggcaagatgcccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
gccatcattggcactcaggccccgtaccggtgtcattgaggatccccgatggtgccaacttt  
A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
ccgtggcccaactga  
P W P N -

Tpx<sup>R44A</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcgggtgaa  
 G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
 gtttactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctgggtgc  
 V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
 ccccatgcccggggttttacaccggctcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
 P P C A G F T P V L A E F Y E K H H V A  
 aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
 K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
 tacggcaagatgcccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
 Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
 ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
 G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
 gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgtcattgaggatcccgatgggtgccaacttt  
 A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
 ccgtggcccaactga  
 P W P N -

Tpx<sup>W70A</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcgggtgaa  
 G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
 gtttactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctgggtgc  
 V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
 ccccatgcccggggttttacaccggctcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
 P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
 aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcggcgatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
 K N F E V V L I S A D E N E S D F H D Y  
 tacggcaagatgcccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
 Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
 ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
 G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
 gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgtcattgaggatcccgatgggtgccaacttt  
 A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
 ccgtggcccaactga  
 P W P N -

Tpx<sup>W70F</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcgggtgaa  
 G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
 gtttactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctgggtgc  
 V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
 ccccatgcccggggttttacaccggctcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
 P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
 aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcctttgatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
 K N F E V V L I S F D E N E S D F H D Y  
 tacggcaagatgcccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
 Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
 ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
 G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
 gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgtcattgaggatcccgatgggtgccaacttt  
 A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
 ccgtggcccaactga  
 P W P N -

Tpx<sup>W70Y</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagt cgggtgaa  
G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
gtttcactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctggtgc  
V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
cccccatgccgggggttttacaccggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcttatgatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
K N F E V V L I S A D E N E S D F H D Y  
tacggcaagatgccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgtcattgaggatcccgatggtgccaacttt  
A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
ccgtggcccaactga  
P W P N -

Tpx<sup>Y81F</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagt cgggtgaa  
G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
gtttcactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctggtgc  
V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
cccccatgccgggggttttacaccggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
aaaaacttcgaagtcgtgctgatttctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
ttcggcaagatgccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
F G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgtcattgaggatcccgatggtgccaacttt  
A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
ccgtggcccaactga  
P W P N -

Tpx<sup>W86A</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagt cgggtgaa  
G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
gtttcactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctggtgc  
V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
cccccatgccgggggttttacaccggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
aaaaacttcgaagtcgtgctgatttctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
tacggcaagatgccggcgctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
Y G K M P A L A L P F D Q R S T V S E L  
ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgtcattgaggatcccgatggtgccaacttt  
A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
ccgtggcccaactga  
P W P N -

Tpx<sup>K102A</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcgggtgaa  
 G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
 gtttactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctgggtgc  
 V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
 cccccatgccgggggttttacaccgggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
 P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
 aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
 K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
 tacggcaagatgccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
 Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
 ggcgacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
 G A T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
 gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgctcattgaggatcccgatgggtgccaacttt  
 A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
 ccgtggcccaactga  
 P W P N -

Tpx<sup>K102E</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcgggtgaa  
 G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
 gtttactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctgggtgc  
 V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
 cccccatgccgggggttttacaccgggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
 P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
 aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
 K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
 tacggcaagatgccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
 Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
 ggcgacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
 G E T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
 gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgctcattgaggatcccgatgggtgccaacttt  
 A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
 ccgtggcccaactga  
 P W P N -

Tpx<sup>E107A</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcgggtgaa  
 G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
 gtttactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctgggtgc  
 V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
 cccccatgccgggggttttacaccgggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
 P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
 aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
 K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
 tacggcaagatgccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
 Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
 ggcaagacatttggcgtgacggtccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
 G K T F G V A S I P T L I T I N A D T G  
 gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgctcattgaggatcccgatgggtgccaacttt  
 A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
 ccgtggcccaactga  
 P W P N -

Tpx<sup>E107K</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagt cgggtgaa  
G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
gtttcactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctgggtgc  
V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
cccccatgcccgggttttacaccgggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
aaaaacttcgaagtcgctgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
tacggcaagatgcccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
ggcaagacatttggcgtgaaaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
G K T F G V K S I P T L I T I N A D T G  
gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgtcattgaggatcccgatggtgccaacttt  
A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
ccgtggccaactga  
P W P N -

Tpx<sup>I109A</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagt cgggtgaa  
G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
gtttcactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctgggtgc  
V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
cccccatgcccgggttttacaccgggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
aaaaacttcgaagtcgctgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
tacggcaagatgcccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
ggcaagacatttggcgtggaatccgcccgcgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
G K T F G V E S A P T L I T I N A D T G  
gccatcattggcactcaggcccgtaccggtgtcattgaggatcccgatggtgccaacttt  
A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
ccgtggccaactga  
P W P N -

Tpx<sup>T129A</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagt cgggtgaa  
G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
gtttcactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctgggtgc  
V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
cccccatgcccgggttttacaccgggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
aaaaacttcgaagtcgctgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
tacggcaagatgcccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
gccatcattggcactcaggcccgtgcccggtgtcattgaggatcccgatggtgccaacttt  
A I I G T Q A R A R V I E D P D G A N F  
ccgtggccaactga  
P W P N -

Tpx<sup>W142A</sup>

ggttctggcctcgctaagtatcttcctggcgcaaccaacctgctgtccaagtcgggtgaa  
 G S G L A K Y L P G A T N L L S K S G E  
 gtttactgggatccctcgttgggaaaactgtgtttctttacttttctgcctcctgggtgc  
 V S L G S L V G K T V F L Y F S A S W C  
 cccccatgccggggttttacaccgggtcctcgccgagttctacgagaagcatcatgtggcg  
 P P C R G F T P V L A E F Y E K H H V A  
 aaaaacttcgaagtcgtgctgatttcctgggatgaaaacgagagcgacttccatgattac  
 K N F E V V L I S W D E N E S D F H D Y  
 tacggcaagatgccgtggctcgctctcccatttgaccaacgctcgacagtttcggaattg  
 Y G K M P W L A L P F D Q R S T V S E L  
 ggcaagacatttggcgtggaatccattccgactcttatcacaatcaatgctgataccggt  
 G K T F G V E S I P T L I T I N A D T G  
 gccatcattggcactcaggcccgtaaccggtgctattgaggatcccgatggtgccaacttt  
 A I I G T Q A R T R V I E D P D G A N F  
 ccggcgcccaactga  
 P A P N -

hsTRPML2 ELD<sup>K94-V290</sup>

aaagaagacaatacgggtcgcatttaaacacctgttcctgaaaggctactcgggcacggac  
 K E D N T V A F K H L F L K G Y S G T D  
 gaagacgattactcctgctcagtttataaccaggaagatgctgacgaaagtattttcttt  
 E D D Y S C S V Y T Q E D A Y E S I F F  
 gccatcaaccagtatcatcaactgaaagacattaccctgggcacgctgggctacggtgaa  
 A I N Q Y H Q L K D I T L G T L G Y G E  
 aacgaagataatcgatcggcctgaaagtttgcaaacaacactataagaaaggcaccatg  
 N E D N R I G L K V C K Q H Y K K G T M  
 ttcccgctccaacgaaacgctgaacattgataatgacgtggaactggactgtgttcagctg  
 F P S N E T L N I D N D V E L D C V Q L  
 gatctgcaagacctgagcaaaaaaccgcccggattggaaaaatagcagctttttccgctcg  
 D L Q D L S K K P P D W K N S S F F R L  
 gaattttaccgctgctgcaggctgaaatctcattccatctgaaaggcattgatctgcaa  
 E F Y R L L Q V E I S F H L K G I D L Q  
 accatccactcgccggaactgccggactgctatgtgttccagaacacgatcatcttcgat  
 T I H S R E L P D C Y V F Q N T I I F D  
 aaaaagcacatagtggtaaaatcaaatctacttcgattccgacgctaaaatcgaagaa  
 N K A H S G K I K I Y F D S D A K I E E  
 tgtaaagatctgaacatcttcggcagcagcagaaaaacgcccataatgtctaa  
 C K D L N I F G S T Q K N A Q Y V -

hsTRPML2 ELD<sup>G84-V290</sup>

ggctgagcaaccagctggtggtggcgtttaagaagacaatacgggtcgcatttaaacac  
 G L S N Q L V V A F K E D N T V A F K H  
 ctgttcctgaaaggctactcgggcacggacgaagacgattactcctgctcagtttataacc  
 L F L K G Y S G T D E D D Y S C S V Y T  
 caggaagatgctgacgaaagtattttctttgccatcaaccagtatcatcaactgaaagac  
 Q E D A Y E S I F F A I N Q Y H Q L K D  
 attaccctgggcacgctgggctacggtgaaaacgaagataatcgatcggcctgaaagtt  
 I T L G T L G Y G E N E D N R I G L K V  
 tgcaaacaacactataagaaaggcaccatgttcccgctccaacgaaacgctgaacattgat  
 C K Q H Y K K G T M F P S N E T L N I D  
 aatgacgtggaactggactgtgttcagctggatctgcaagacctgagcaaaaaaccgccc  
 N D V E L D C V Q L D L Q D L S K K P P  
 gattggaaaaatagcagctttttccgctctggaattttaccgctgctgcaggctgaaatc  
 D W K N S S F F R L E F Y R L L Q V E I  
 tcattccatctgaaaggcattgatctgcaaacatccactcgccggaactgccggactgc  
 S F H L K G I D L Q T I H S R E L P D C

tatgtgttccagaacacgatcatcttcgataacaaagcacatagtggtaaaatcaaaatc  
Y V F Q N T I I F D N K A H S G K I K I  
tacttcgattccgacgctaaaatcgaagaatgtaaagatctgaacatcttcggcagcagc  
Y F D S D A K I E E C K D L N I F G S T  
cagaaaaacgccaatatgtctaa  
Q K N A Q Y V -

hsTRPML2 ELD<sup>G84-K285</sup>

ggcctgagcaaccagctgggtggggtggttttaagaagacaatacggctcgcatTTaaacac  
G L S N Q L V V A F K E D N T V A F K H  
ctgttcctgaaaggctactcgggcacggacgaagacgattactcctgctcagtttatacc  
L F L K G Y S G T D E D D Y S C S V Y T  
caggaagatgcgtacgaaagtatTTTctttgccatcaaccagtatcatcaactgaaagac  
Q E D A Y E S I F F A I N Q Y H Q L K D  
attaccctgggcacgctgggctacggtgaaaacgaagataatcgatcggcctgaaagtt  
I T L G T L G Y G E N E D N R I G L K V  
tgcaaacacactataagaaaggcaccatgTtcccgtccaacgaaacgctgaacattgat  
C K Q H Y K K G T M F P S N E T L N I D  
aatgacgtggaactggactgtgttcagctggatctgcaagacctgagcaaaaaaccgccc  
N D V E L D C V Q L D L Q D L S K K P P  
gattggaaaaatagcagctTTTTccgtctggaatTTaccgcctgctgcaggTcgaaatc  
D W K N S S F F R L E F Y R L L Q V E I  
tcattccatctgaaaggcattgatctgcaaaccatccactcgcgcgaaactgccggactgc  
S F H L K G I D L Q T I H S R E L P D C  
tatgtgttccagaacacgatcatcttcgataacaaagcacatagtggtaaaatcaaaatc  
Y V F Q N T I I F D N K A H S G K I K I  
tacttcgattccgacgctaaaatcgaagaatgtaaagatctgaacatcttcggcagcagc  
Y F D S D A K I E E C K D L N I F G S T  
cagaaataa  
Q K -

hsTRPML2 ELD<sup>A92-K285</sup>

gcgTtttaagaagacaatacggctcgcatTTaaacacctgttcctgaaaggctactcgggc  
A F K E D N T V A F K H L F L K G Y S G  
acggacgaagacgattactcctgctcagtttataccaggaagatgcgtacgaaagtatt  
T D E D D Y S C S V Y T Q E D A Y E S I  
ttctttgccatcaaccagtatcatcaactgaaagacattaccctgggcacgctgggctac  
F F A I N Q Y H Q L K D I T L G T L G Y  
ggtgaaaacgaagataatcgatcggcctgaaagTttgcaaacacactataagaaaggc  
G E N E D N R I G L K V C K Q H Y K K G  
accatgttcccgtccaacgaaacgctgaacattgataatgacgtggaactggactgtgtt  
T M F P S N E T L N I D N D V E L D C V  
cagctggatctgcaagacctgagcaaaaaaccgcccgattggaaaaatagcagctTTTTc  
Q L D L Q D L S K K P P D W K N S S F F  
cgtctggaatTTaccgcctgctgcaggTcgaaatctcattccatctgaaaggcattgat  
R L E F Y R L L Q V E I S F H L K G I D  
ctgcaaaccatccactcgcgcgaaactgccggactgctatgtgttccagaacacgatcatc  
L Q T I H S R E L P D C Y V F Q N T I I  
ttcgataacaaagcacatagtggtaaaatcaaaatctacttcgattccgacgctaaaatc  
F D N K A H S G K I K I Y F D S D A K I  
gaagaatgtaaagatctgaacatcttcggcagcagcagaaataa  
E E C K D L N I F G S T Q K -

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Steverding, D. The history of African trypanosomiasis. *Parasites & vectors* **2008**, *1*, 3. DOI: 10.1186/1756-3305-1-3.
- [2] World Health Organization. Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness), Key facts: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)).
- [3] World Health Organization. Sustained decline in sleeping sickness cases puts elimination within reach: <https://www.who.int/news-room/detail/23-06-2020-sustained-decline-in-sleeping-sickness-cases-puts-elimination-within-reach>.
- [4] World Health Organization. Togo is first African country to end sleeping sickness as a public health problem: <https://www.who.int/news/item/27-08-2020-togo-is-first-african-country-to-end-sleeping-sickness-as-a-public-health-problem>.
- [5] Büscher, P.; Cecchi, G.; Jamonneau, V.; Priotto, G. Human African trypanosomiasis. *The Lancet* **2017**, *390*, 2397–2409. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31510-6.
- [6] Kennedy, P. G. E.; Rodgers, J. Clinical and Neuropathogenetic Aspects of Human African Trypanosomiasis. *Frontiers in immunology* **2019**, *10*, 39. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00039.
- [7] Kennedy, P. G. E. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *The Lancet Neurology* **2013**, *12*, 186–194. DOI: 10.1016/S1474-4422(12)70296-X.
- [8] Nok, A. J. Arsenicals (melarsoprol), pentamidine and suramin in the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitology research* **2003**, *90*, 71–79. DOI: 10.1007/s00436-002-0799-9.
- [9] Fairlamb, A. H. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in parasitology* **2003**, *19*, 488–494. DOI: 10.1016/j.pt.2003.09.002.
- [10] Willson, M.; Callens, M.; Kuntz, D. A.; Perié, J.; Opperdoes, F. R. Synthesis and activity of inhibitors highly specific for the glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* **1993**, *59*, 201–210. DOI: 10.1016/0166-6851(93)90218-m.
- [11] Shapiro, T. A.; Englund, P. T. Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, *87*, 950–954. DOI: 10.1073/pnas.87.3.950.
- [12] Alghamdi, A. H.; Munday, J. C.; Campagnaro, G. D.; Gurvic, D.; Svensson, F.; Okpara, C. E.; Kumar, A.; Quintana, J.; Martin Abril, M. E.; Milić, P.; *et al.* Positively selected modifications in the pore of TbAQP2 allow pentamidine to enter *Trypanosoma brucei*. *eLife* **2020**, *9*. DOI: 10.7554/eLife.56416.
- [13] Capela, R.; Moreira, R.; Lopes, F. An Overview of Drug Resistance in Protozoal Diseases. *International journal of molecular sciences* **2019**, *20*. DOI: 10.3390/ijms20225748.
- [14] Fairlamb, A. H.; Horn, D. Melarsoprol Resistance in African Trypanosomiasis. *Trends in parasitology* **2018**, *34*, 481–492. DOI: 10.1016/j.pt.2018.04.002.
- [15] Bellofatto, V.; Fairlamb, A. H.; Henderson, G. B.; Cross, G. A. Biochemical changes associated with  $\alpha$ -difluoromethylornithine uptake and resistance in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* **1987**, *25*, 227–238. DOI: 10.1016/0166-6851(87)90086-7.
- [16] Hall, B. S.; Bot, C.; Wilkinson, S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286*, 13088–13095. DOI: 10.1074/jbc.M111.230847.
- [17] Castro, J. A.; Mecca, M. M. de; Bartel, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & experimental toxicology* **2006**, *25*, 471–479. DOI: 10.1191/0960327106het653oa.
- [18] Deeks, E. D. Fexinidazole: First Global Approval. *Drugs* **2019**, *79*, 215–220. DOI: 10.1007/s40265-019-1051-6.

- [19] Tarral, A.; Blesson, S.; Mordt, O. V.; Torreele, E.; Sassella, D.; Bray, M. A.; Hovsepian, L.; Evène, E.; Gualano, V.; Felices, M.; *et al.* Determination of an optimal dosing regimen for fexinidazole, a novel oral drug for the treatment of human African trypanosomiasis: first-in-human studies. *Clinical pharmacokinetics* **2014**, *53*, 565–580. DOI: 10.1007/s40262-014-0136-3.
- [20] European Medicines Agency EMA. Summary of product characteristics: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/medicine-outside-eu/fexinidazole-winthrop-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/medicine-outside-eu/fexinidazole-winthrop-product-information_en.pdf).
- [21] Fueller, F.; Jehle, B.; Putzker, K.; Lewis, J. D.; Krauth-Siegel, R. L. High throughput screening against the peroxidase cascade of African trypanosomes identifies antiparasitic compounds that inactivate trypanothione. *The Journal of biological chemistry* **2012**, *287*, 8792–8802. DOI: 10.1074/jbc.M111.338285.
- [22] Maiorana, S.; Ettari, R.; Previti, S.; Amendola, G.; Wagner, A.; Cosconati, S.; Hellmich, U. A.; Schirmeister, T.; Zappalà, M. Peptidyl Vinyl Ketone Irreversible Inhibitors of Rhodocytin Modifications of the P2 Fragment. *ChemMedChem* **2020**. DOI: 10.1002/cmdc.202000360.
- [23] Klein, P.; Barthels, F.; Johe, P.; Wagner, A.; Tenzer, S.; Distler, U.; Le, T. A.; Schmid, P.; Engel, V.; Engels, B.; *et al.* Naphthoquinones as Covalent Reversible Inhibitors of Cysteine Proteases—Studies on Inhibition Mechanism and Kinetics. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2020**, *25*. DOI: 10.3390/molecules25092064.
- [24] Diederich, K.; Krauth-Siegel, R. L. Trypanothione – Wunderwaffe und Achillesferse der Trypanosomatiden. *Biospektrum* **2016**, *22*, 344–347. DOI: 10.1007/s12268-016-0693-0.
- [25] Liu, B.; Liu, Y.; Motyka, S. A.; Agbo, E. E. C.; Englund, P. T. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in parasitology* **2005**, *21*, 363–369. DOI: 10.1016/j.pt.2005.06.008.
- [26] Duszenko, M. Afrikanische Trypanosomen: Die Erreger der Schlafkrankheit. *Biologie in unserer Zeit* **1998**, *28*, 72–81. DOI: 10.1002/biuz.960280209.
- [27] Daniels, J.-P.; Gull, K.; Wickstead, B. Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **2010**, *74*, 552–569. DOI: 10.1128/MMBR.00024-10.
- [28] Clayton, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open biology* **2019**, *9*, 190072. DOI: 10.1098/rsob.190072.
- [29] Duszenko, M. Trypanosoma brucei - Ein Beispiel parasitärer Lebensweise -. *Biologie in unserer Zeit* **1984**, *14*, 33–41. DOI: 10.1002/biuz.19840140202.
- [30] Matthews, K. R.; McCulloch, R.; Morrison, L. J. The within-host dynamics of African trypanosome infections. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **2015**, *370*. DOI: 10.1098/rstb.2014.0288.
- [31] Horn, D. Antigenic variation in African trypanosomes. *Molecular and biochemical parasitology* **2014**, *195*, 123–129. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2014.05.001.
- [32] Engstler, M.; Thilo, L.; Weise, F.; Grünfelder, C. G.; Schwarz, H.; Boshart, M.; Overath, P. Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in Trypanosoma brucei. *Journal of cell science* **2004**, *117*, 1105–1115. DOI: 10.1242/jcs.00938.
- [33] Acosta-Serrano, A.; Vassella, E.; Liniger, M.; Kunz Renggli, C.; Brun, R.; Roditi, I.; Englund, P. T. The surface coat of procyclic Trypanosoma brucei: programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 1513–1518. DOI: 10.1073/pnas.041611698.
- [34] Roditi, I.; Liniger, M. Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites. *Trends in Microbiology* **2002**, *10*, 128–134. DOI: 10.1016/s0966-842x(02)02309-0.
- [35] Michels, P. A. M.; Bringaud, F.; Herman, M.; Hannaert, V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochimica et biophysica acta* **2006**, *1763*, 1463–1477. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.019.

- [36] van Hellemond, J. J.; Opperdoes, F. R.; Tielens, A. G. M. The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Society transactions* **2005**, *33*, 967–971. DOI: 10.1042/BST20050967.
- [37] Zíková, A.; Verner, Z.; Nenarokova, A.; Michels, P. A. M.; Lukeš, J. A paradigm shift: The mitoproteomes of procyclic and bloodstream *Trypanosoma brucei* are comparably complex. *PLoS pathogens* **2017**, *13*, e1006679. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006679.
- [38] Krüger, T.; Schuster, S.; Engstler, M. Beyond Blood: African Trypanosomes on the Move. *Trends in parasitology* **2018**, *34*, 1056–1067. DOI: 10.1016/j.pt.2018.08.002.
- [39] Smith, T. K.; Bringaud, F.; Nolan, D. P.; Figueiredo, L. M. Metabolic reprogramming during the *Trypanosoma brucei* life cycle. *F1000Research* **2017**, *6*. DOI: 10.12688/f1000research.10342.2.
- [40] Reuner, B.; Vassella, E.; Yutzy, B.; Boshart, M. Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture. *Molecular and biochemical parasitology* **1997**, *90*, 269–280. DOI: 10.1016/s0166-6851(97)00160-6.
- [41] Mony, B. M.; Matthews, K. R. Assembling the components of the quorum sensing pathway in African trypanosomes. *Molecular microbiology* **2015**, *96*, 220–232. DOI: 10.1111/mmi.12949.
- [42] Rojas, F.; Silvester, E.; Young, J.; Milne, R.; Tettey, M.; Houston, D. R.; Walkinshaw, M. D.; Pérez-Pi, I.; Auer, M.; Denton, H.; *et al.* Oligopeptide Signaling through TbGPR89 Drives Trypanosome Quorum Sensing. *Cell* **2019**, *176*, 306–317.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2018.10.041.
- [43] Dyer, N. A.; Rose, C.; Ejeh, N. O.; Acosta-Serrano, A. Flying tryps: survival and maturation of trypanosomes in tsetse flies. *Trends in parasitology* **2013**, *29*, 188–196. DOI: 10.1016/j.pt.2013.02.003.
- [44] Ponte-Sucre, A. An Overview of *Trypanosoma brucei* Infections: An Intense Host-Parasite Interaction. *Frontiers in microbiology* **2016**, *7*, 2126. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02126.
- [45] Brun, R.; Blum, J.; Chappuis, F.; Burri, C. Human African trypanosomiasis. *The Lancet* **2010**, *375*, 148–159. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60829-1.
- [46] Vickerman, K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *British medical bulletin* **1985**, *41*, 105–114. DOI: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072036.
- [47] Fairlamb, A. H.; Cerami, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual review of microbiology* **1992**, *46*, 695–729. DOI: 10.1146/annurev.mi.46.100192.003403.
- [48] Krauth-Siegel, R. L.; Comini, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et biophysica acta* **2008**, *1780*, 1236–1248. DOI: 10.1016/j.bbagen.2008.03.006.
- [49] Fernandes, A. P.; Holmgren, A. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants & redox signaling* **2004**, *6*, 63–74. DOI: 10.1089/152308604771978354.
- [50] Lu, J.; Holmgren, A. The thioredoxin antioxidant system. *Free radical biology & medicine* **2014**, *66*, 75–87. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036.
- [51] Berriman, M.; Ghedin, E.; Hertz-Fowler, C.; Blandin, G.; Renauld, H.; Bartholomeu, D. C.; Lennard, N. J.; Caler, E.; Hamlin, N. E.; Haas, B.; *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science (New York, N.Y.)* **2005**, *309*, 416–422. DOI: 10.1126/science.1112642.
- [52] Fairlamb, A. H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B. T.; Cerami, A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science (New York, N.Y.)* **1985**, *227*, 1485–1487. DOI: 10.1126/science.3883489.
- [53] Penketh, P. G.; Klein, R. A. Hydrogen peroxide metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* **1986**, *20*, 111–121. DOI: 10.1016/0166-6851(86)90023-x.
- [54] Henderson, G. B.; Fairlamb, A. H.; Cerami, A. Trypanothione dependent peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* **1987**, *24*, 39–45. DOI: 10.1016/0166-6851(87)90113-7.
- [55] Leroux, A. E.; Haanstra, J. R.; Bakker, B. M.; Krauth-Siegel, R. L. Dissecting the catalytic mechanism of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase by kinetic analysis and

- computational modeling. *The Journal of biological chemistry* **2013**, *288*, 23751–23764. DOI: 10.1074/jbc.M113.483289.
- [56] Manta, B.; Comini, M.; Medeiros, A.; Hugo, M.; Trujillo, M.; Radi, R. Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochimica et biophysica acta* **2013**, *1830*, 3199–3216. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.01.013.
- [57] MOUTIEZ, M.; MEZIANE-CHERIF, D.; AUMERCIER, M.; SERGHERAERT, C.; TARTAR, A. Compared Reactivities of Trypanothione and Glutathione in Conjugation Reactions. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 2641–2644. DOI: 10.1248/cpb.42.2641.
- [58] Fraser-L'Hostis, C.; Defrise-Quertain, F.; Coral, D.; Deshusses, J. Regulation of the intracellular pH in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei brucei*. *Biological chemistry* **1997**, *378*, 1039–1046. DOI: 10.1515/bchm.1997.378.9.1039.
- [59] Gilbert, H. F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **1990**, *63*, 69–172. DOI: 10.1002/9780470123096.ch2.
- [60] Ebersoll, S.; Bogacz, M.; Günter, L. M.; Dick, T. P.; Krauth-Siegel, R. L. A tryparedoxin-coupled biosensor reveals a mitochondrial trypanothione metabolism in trypanosomes. *eLife* **2020**, *9*. DOI: 10.7554/eLife.53227.
- [61] Ulrich, K.; Finkenzeller, C.; Merker, S.; Rojas, F.; Matthews, K.; Ruppert, T.; Krauth-Siegel, R. L. Stress-Induced Protein S-Glutathionylation and S-Trypanothionylation in African Trypanosomes-A Quantitative Redox Proteome and Thiol Analysis. *Antioxidants & redox signaling* **2017**, *27*, 517–533. DOI: 10.1089/ars.2016.6947.
- [62] Krauth-Siegel, R. L.; Schöneck, R. Flavoprotein structure and mechanism. 5. Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **1995**, *9*, 1138–1146. DOI: 10.1096/fasebj.9.12.7672506.
- [63] Schmidt, H.; Krauth-Siegel, R. L. Functional and physicochemical characterization of the thioredoxin system in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278*, 46329–46336. DOI: 10.1074/jbc.M305338200.
- [64] Ceylan, S.; Seidel, V.; Ziebart, N.; Berndt, C.; Dirdjaja, N.; Krauth-Siegel, R. L. The dithiol glutaredoxins of african trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285*, 35224–35237. DOI: 10.1074/jbc.M110.165860.
- [65] Lüdemann, H.; Dormeyer, M.; Sticherling, C.; Stallmann, D.; Follmann, H.; Krauth-Siegel, R. *Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. *FEBS Letters* **1998**, *431*, 381–385. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00793-5.
- [66] Krauth-Siegel, R.; Lüdemann, H. Reduction of dehydroascorbate by trypanothione. *Molecular and biochemical parasitology* **1996**, *80*, 203–208. DOI: 10.1016/0166-6851(96)02689-8.
- [67] Comini, M. A.; Krauth-Siegel, R. L.; Bellanda, M. Mono- and dithiol glutaredoxins in the trypanothione-based redox metabolism of pathogenic trypanosomes. *Antioxidants & redox signaling* **2013**, *19*, 708–722. DOI: 10.1089/ars.2012.4932.
- [68] Comini, M. A.; Rettig, J.; Dirdjaja, N.; Hanschmann, E.-M.; Berndt, C.; Krauth-Siegel, R. L. Monothiol glutaredoxin-1 is an essential iron-sulfur protein in the mitochondrion of African trypanosomes. *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283*, 27785–27798. DOI: 10.1074/jbc.M802010200.
- [69] Currier, R. B.; Ulrich, K.; Leroux, A. E.; Dirdjaja, N.; Deambrosi, M.; Bonilla, M.; Ahmed, Y. L.; Adrian, L.; Antelmann, H.; Jakob, U.; *et al.* An essential thioredoxin-type protein of *Trypanosoma brucei* acts as redox-regulated mitochondrial chaperone. *PLoS pathogens* **2019**, *15*, e1008065. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008065.
- [70] Hanschmann, E.-M.; Godoy, J. R.; Berndt, C.; Hudemann, C.; Lillig, C. H. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins—molecular mechanisms and health significance: from

- cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxidants & redox signaling* **2013**, *19*, 1539–1605. DOI: 10.1089/ars.2012.4599.
- [71] Napolitano, S.; Reber, R. J.; Rubini, M.; Glockshuber, R. Functional analyses of ancestral thioredoxins provide insights into their evolutionary history. *The Journal of biological chemistry* **2019**, *294*, 14105–14118. DOI: 10.1074/jbc.RA119.009718.
- [72] Gommel, D. U.; Nogoceke, E.; Morr, M.; Kiess, M.; Kalisz, H. M.; Flohé, L. Catalytic characteristics of tryparedoxin. *European journal of biochemistry* **1997**, *248*, 913–918. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00913.x.
- [73] González-Chávez, Z.; Vázquez, C.; Mejia-Tlachi, M.; Márquez-Dueñas, C.; Manning-Cela, R.; Encalada, R.; Rodríguez-Enríquez, S.; Michels, P. A. M.; Moreno-Sánchez, R.; Saavedra, E. Gamma-glutamylcysteine synthetase and tryparedoxin 1 exert high control on the antioxidant system in *Trypanosoma cruzi* contributing to drug resistance and infectivity. *Redox biology* **2019**, *26*, 101231. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101231.
- [74] Dormeyer, M.; Reckenfelderbäumer, N.; Ludemann, H.; Krauth-Siegel, R. L. Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 10602–10606. DOI: 10.1074/jbc.M010352200.
- [75] Trujillo, M.; Budde, H.; Piñeyro, M. D.; Stehr, M.; Robello, C.; Flohé, L.; Radi, R. *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxyxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279*, 34175–34182. DOI: 10.1074/jbc.M404317200.
- [76] Schlecker, T.; Schmidt, A.; Dirdjaja, N.; Voncken, F.; Clayton, C.; Krauth-Siegel, R. L. Substrate specificity, localization, and essential role of the glutathione peroxidase-type tryparedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280*, 14385–14394. DOI: 10.1074/jbc.M413338200.
- [77] Nogoceke, E.; Gommel, D. U.; Kiess, M.; Kalisz, H. M.; Flohé, L. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biological chemistry* **1997**, *378*, 827–836. DOI: 10.1515/bchm.1997.378.8.827.
- [78] Hillebrand, H.; Schmidt, A.; Krauth-Siegel, R. L. A second class of peroxidases linked to the trypanothione metabolism. *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278*, 6809–6815. DOI: 10.1074/jbc.M210392200.
- [79] Guerrero, S. A.; Arias, D. G.; Cabeza, M. S.; Law, M. C. Y.; D'Amico, M.; Kumar, A.; Wilkinson, S. R. Functional characterisation of the methionine sulfoxide reductase repertoire in *Trypanosoma brucei*. *Free radical biology & medicine* **2017**, *112*, 524–533. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.023.
- [80] Arias, D. G.; Cabeza, M. S.; Erben, E. D.; Carranza, P. G.; Lujan, H. D.; Téllez Iñón, M. T.; Iglesias, A. A.; Guerrero, S. A. Functional characterization of methionine sulfoxide reductase A from *Trypanosoma* spp. *Free radical biology & medicine* **2011**, *50*, 37–46. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.695.
- [81] Reckenfelderbäumer, N.; Ludemann, H.; Schmidt, H.; Steverding, D.; Krauth-Siegel, R. L. Identification and Functional Characterization of Thioredoxin from *Trypanosoma brucei* *brucei*. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275*, 7547–7552. DOI: 10.1074/jbc.275.11.7547.
- [82] Docampo, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemico-Biological Interactions* **1990**, *73*, 1–27. DOI: 10.1016/0009-2797(90)90106-w.
- [83] Hiller, C.; Nissen, A.; Benítez, D.; Comini, M. A.; Krauth-Siegel, R. L. Cytosolic peroxidases protect the lysosome of bloodstream African trypanosomes from iron-mediated membrane damage. *PLoS pathogens* **2014**, *10*, e1004075. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004075.
- [84] Diechtierow, M.; Krauth-Siegel, R. L. A tryparedoxin-dependent peroxidase protects African trypanosomes from membrane damage. *Free radical biology & medicine* **2011**, *51*, 856–868. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.014.

- [85] Schaffroth, C.; Bogacz, M.; Dirdjaja, N.; Nißen, A.; Krauth-Siegel, R. L. The cytosolic or the mitochondrial glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidase is sufficient to protect procyclic *Trypanosoma brucei* from iron-mediated mitochondrial damage and lysis. *Molecular microbiology* **2016**, *99*, 172–187. DOI: 10.1111/mmi.13223.
- [86] Tetaud, E.; Giroud, C.; Prescott, A. R.; Parkin, D. W.; Baltz, D.; Biteau, N.; Baltz, T.; Fairlamb, A. H. Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent trypanothione peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* **2001**, *116*, 171–183. DOI: 10.1016/s0166-6851(01)00320-6.
- [87] Wilkinson, S. R.; Horn, D.; Prathalingam, S. R.; Kelly, J. M. RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the african trypanosome. *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278*, 31640–31646. DOI: 10.1074/jbc.M303035200.
- [88] Bogacz, M.; Dirdjaja, N.; Wimmer, B.; Habich, C.; Krauth-Siegel, R. L. The mitochondrial peroxidoredoxin displays distinct roles in different developmental stages of African trypanosomes. *Redox biology* **2020**, *34*, 101547. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101547.
- [89] Budde, H.; Flohé, L.; Hecht, H.-J.; Hofmann, B.; Stehr, M.; Wissing, J.; Lünsdorf, H. Kinetics and redox-sensitive oligomerisation reveal negative subunit cooperativity in trypanothione peroxidase of *Trypanosoma brucei*. *Biological chemistry* **2003**, *384*, 619–633. DOI: 10.1515/BC.2003.069.
- [90] Gasparo, R. de; Brodbeck-Persch, E.; Bryson, S.; Hentzen, N. B.; Kaiser, M.; Pai, E. F.; Krauth-Siegel, R. L.; Diederich, F. Biological Evaluation and X-ray Co-crystal Structures of Cyclohexylpyrrolidine Ligands for Trypanothione Reductase, an Enzyme from the Redox Metabolism of *Trypanosoma*. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 957–967. DOI: 10.1002/cmdc.201800067.
- [91] Gasparo, R. de; Halgas, O.; Harangozo, D.; Kaiser, M.; Pai, E. F.; Krauth-Siegel, R. L.; Diederich, F. Targeting a Large Active Site: Structure-Based Design of Nanomolar Inhibitors of *Trypanosoma brucei* Trypanothione Reductase. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2019**, *25*, 11416–11421. DOI: 10.1002/chem.201901664.
- [92] Medeiros, A.; Benítez, D.; Korn, R. S.; Ferreira, V. C.; Barrera, E.; Carrión, F.; Pritsch, O.; Pantano, S.; Kunick, C.; Oliveira, C. I. de; *et al.* Mechanistic and biological characterisation of novel N5-substituted paullones targeting the biosynthesis of trypanothione in *Leishmania*. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **2020**, *35*, 1345–1358. DOI: 10.1080/14756366.2020.1780227.
- [93] Orban, O. C. F.; Korn, R. S.; Benítez, D.; Medeiros, A.; Preu, L.; Loaëc, N.; Meijer, L.; Koch, O.; Comini, M. A.; Kunick, C. 5-Substituted 3-chloropenpaullone derivatives are potent inhibitors of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2016**, *24*, 3790–3800. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.06.023.
- [94] Romao, S.; Castro, H.; Sousa, C.; Carvalho, S.; Tomás, A. M. The cytosolic trypanothione peroxidase of *Leishmania infantum* is essential for parasite survival. *International Journal for Parasitology* **2009**, *39*, 703–711. DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.11.009.
- [95] Levick, M. P.; Tetaud, E.; Fairlamb, A. H.; Blackwell, J. M. Identification and characterisation of a functional peroxidoredoxin from *Leishmania major*1Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the EMBL, GenBank™ and DDJB databases under the accession number AF069386.1. *Molecular and biochemical parasitology* **1998**, *96*, 125–137. DOI: 10.1016/s0166-6851(98)00122-4.
- [96] Lopez, J. A.; Carvalho, T. U.; Souza, W. de; Flohé, L.; Guerrero, S. A.; Montemartini, M.; Kalisz, H. M.; Nogoceke, E.; Singh, M.; Alves, M. J. M.; *et al.* Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radical Biology and Medicine* **2000**, *28*, 767–772. DOI: 10.1016/s0891-5849(00)00159-3.

- [97] Motyka, S. A.; Drew, M. E.; Yildirim, G.; Englund, P. T. Overexpression of a cytochrome b5 reductase-like protein causes kinetoplast DNA loss in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281*, 18499–18506. DOI: 10.1074/jbc.M602880200.
- [98] Comini, M. A.; Krauth-Siegel, R. L.; Flohé, L. Depletion of the thioredoxin homologue tryparedoxin impairs antioxidative defence in African trypanosomes. *The Biochemical journal* **2007**, *402*, 43–49. DOI: 10.1042/BJ20061341.
- [99] Holmgren, A. Thioredoxin. *Annual review of biochemistry* **1985**, *54*, 237–271. DOI: 10.1146/annurev.bi.54.070185.001321.
- [100] Mössner, E.; Huber-Wunderlich, M.; Glockshuber, R. Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein science : a publication of the Protein Society* **1998**, *7*, 1233–1244. DOI: 10.1002/pro.5560070519.
- [101] Gan, Z.-R.; Sardana, M. K.; Jacobs, J. W.; Polokoff, M. A. Yeast thioltransferase—The active site cysteines display differential reactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1990**, *282*, 110–115. DOI: 10.1016/0003-9861(90)90093-e.
- [102] Holmgren, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of biological chemistry* **1989**, *264*, 13963–13966.
- [103] Chivers, P. T.; Prehoda, K. E.; Raines, R. T. The CXXC motif: a rheostat in the active site. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4061–4066. DOI: 10.1021/bi9628580.
- [104] Reckenfelderbäumer, N.; Krauth-Siegel, R. L. Catalytic properties, thiol pK value, and redox potential of *Trypanosoma brucei* tryparedoxin. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, 17548–17555. DOI: 10.1074/jbc.M112115200.
- [105] Alphey, M. S.; Leonard, G. A.; Gourley, D. G.; Tetaud, E.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N. The high resolution crystal structure of recombinant *Crithidia fasciculata* tryparedoxin-I. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, 25613–25622. DOI: 10.1074/jbc.274.36.25613.
- [106] Alphey, M. S.; Gabrielsen, M.; Micossi, E.; Leonard, G. A.; McSweeney, S. M.; Ravelli, R. B. G.; Tetaud, E.; Fairlamb, A. H.; Bond, C. S.; Hunter, W. N. Tryparedoxins from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*: photoreduction of the redox disulfide using synchrotron radiation and evidence for a conformational switch implicated in function. *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278*, 25919–25925. DOI: 10.1074/jbc.M301526200.
- [107] Hofmann, B.; Budde, H.; Bruns, K.; Guerrero, S. A.; Kalisz, H. M.; Menge, U.; Montemartini, M.; Nogoceke, E.; Steinert, P.; Wissing, J. B.; *et al.* Structures of tryparedoxins revealing interaction with trypanothione. *Biological chemistry* **2001**, *382*, 459–471. DOI: 10.1515/BC.2001.056.
- [108] Schlecker, T.; Comini, M. A.; Melchers, J.; Ruppert, T.; Krauth-Siegel, R. L. Catalytic mechanism of the glutathione peroxidase-type tryparedoxin peroxidase of *Trypanosoma brucei*. *The Biochemical journal* **2007**, *405*, 445–454. DOI: 10.1042/BJ20070259.
- [109] Micossi, E.; Hunter, W. N.; Leonard, G. A. De novo phasing of two crystal forms of tryparedoxin II using the anomalous scattering from S atoms: a combination of small signal and medium resolution reveals this to be a general tool for solving protein crystal structures. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2002**, *58*, 21–28. DOI: 10.1107/s09074444901016808.
- [110] Krumme, D.; Budde, H.; Hecht, H.-J.; Menge, U.; Ohlenschläger, O.; Ross, A.; Wissing, J.; Wray, V.; Flohé, L. NMR studies of the interaction of tryparedoxin with redox-inactive substrate homologues. *Biochemistry* **2003**, *42*, 14720–14728. DOI: 10.1021/bi030112d.
- [111] Wagner, A.; Le, T. A.; Brennich, M.; Klein, P.; Bader, N.; Diehl, E.; Paszek, D.; Weickmann, A. K.; Dirdjaja, N.; Krauth-Siegel, R. L.; *et al.* Inhibitor-Induced Dimerization of an Essential Oxidoreductase from African Trypanosomes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2019**, *58*, 3640–3644. DOI: 10.1002/anie.201810470.
- [112] Micsonai, A.; Wien, F.; Kernya, L.; Lee, Y.-H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112*, E3095-103. DOI: 10.1073/pnas.1500851112.
- [113] Keller, R. *The computer aided resonance assignment tutorial*, 1. ed.; Cantina Verl.: Goldau, 2004.
- [114] Artimo, P.; Jonnalagedda, M.; Arnold, K.; Baratin, D.; Csardi, G.; Castro, E. de; Duvaud, S.; Flegel, V.; Fortier, A.; Gasteiger, E.; *et al.* ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research* **2012**, *40*, W597-603. DOI: 10.1093/nar/gks400.
- [115] Cunningham, M. P.; Vickerman, K. Antigenic analysis in the *Trypanosoma brucei* group, using the agglutination reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1962**, *56*, 48–59. DOI: 10.1016/0035-9203(62)90088-3.
- [116] Biebinger, S.; Elizabeth Wirtz, L.; Lorenz, P.; Clayton, C. Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* **1997**, *85*, 99–112. DOI: 10.1016/s0166-6851(96)02815-0.
- [117] Wagner, A.; Diehl, E.; Krauth-Siegel, R. L.; Hellmich, U. A. Backbone NMR assignments of trypanothione, the central protein in the hydroperoxide detoxification cascade of African trypanosomes, in the oxidized and reduced form. *Biomolecular NMR assignments* **2017**, *11*, 193–196. DOI: 10.1007/s12104-017-9746-7.
- [118] Dietschreit, J. C. B.; Wagner, A.; Le, T. A.; Klein, P.; Schindelin, H.; Opatz, T.; Engels, B.; Hellmich, U. A.; Ochsenfeld, C. Predicting 19 F NMR Chemical Shifts: A Combined Computational and Experimental Study of a Trypanosomal Oxidoreductase-Inhibitor Complex. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2020**. DOI: 10.1002/anie.202000539.
- [119] Gibson, D. G.; Young, L.; Chuang, R.-Y.; Venter, J. C.; Hutchison, C. A.; Smith, H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* **2009**, *6*, 343–345. DOI: 10.1038/nmeth.1318.
- [120] Bergmans, H. E.; van Die, I. M.; Hoekstra, W. P. Transformation in *Escherichia coli*: stages in the process. *Journal of bacteriology* **1981**, *146*, 564–570. DOI: 10.1128/JB.146.2.564-570.1981.
- [121] Froger, A.; Hall, J. E. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2007**, 253. DOI: 10.3791/253.
- [122] Muchmore, D. C.; McIntosh, L. P.; Russell, C. B.; Anderson, D. E.; Dahlquist, F. W. [3] Expression and nitrogen-15 labeling of proteins for proton and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance. *Nuclear Magnetic Resonance Part B Structure and Mechanism*; Elsevier, 1989; pp 44–73.
- [123] Mulder, F. A.; Schipper, D.; Bott, R.; Boelens, R. Altered flexibility in the substrate-binding site of related native and engineered high-alkaline *Bacillus subtilis*ins. *Journal of molecular biology* **1999**, *292*, 111–123. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3034.
- [124] Farrow, N. A.; Muhandiram, R.; Singer, A. U.; Pascal, S. M.; Kay, C. M.; Gish, G.; Shoelson, S. E.; Pawson, T.; Forman-Kay, J. D.; Kay, L. E. Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by 15N NMR relaxation. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5984–6003. DOI: 10.1021/bi00185a040.
- [125] Schumann Burkard, G.; Jutzi, P.; Roditi, I. Genome-wide RNAi screens in bloodstream form trypanosomes identify drug transporters. *Molecular and biochemical parasitology* **2011**, *175*, 91–94. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2010.09.002.
- [126] Caffrey, C. R.; Hansell, E.; Lucas, K. D.; Brinen, L. S.; Alvarez Hernandez, A.; Cheng, J.; Gwaltney, S. L.; Roush, W. R.; Stierhof, Y.-D.; Bogoyo, M.; *et al.* Active site mapping, biochemical properties and subcellular localization of rhodesain, the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei* rhodesiense. *Molecular and biochemical parasitology* **2001**, *118*, 61–73. DOI: 10.1016/S0166-6851(01)00368-1.
- [127] Meiering, S.; Inhoff, O.; Mies, J.; Vincek, A.; Garcia, G.; Kramer, B.; Dormeyer, M.; Krauth-Siegel, R. L. Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase revealed by virtual screening and parallel synthesis. *Journal of medicinal chemistry* **2005**, *48*, 4793–4802. DOI: 10.1021/jm050027z.

- [128] Previti, S.; Ettari, R.; Cosconati, S.; Amendola, G.; Chouchene, K.; Wagner, A.; Hellmich, U. A.; Ulrich, K.; Krauth-Siegel, R. L.; Wich, P. R.; *et al.* Development of Novel Peptide-Based Michael Acceptors Targeting Rhodesain and Falcipain-2 for the Treatment of Neglected Tropical Diseases (NTDs). *Journal of medicinal chemistry* **2017**, *60*, 6911–6923. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00405.
- [129] Ettari, R.; Previti, S.; Maiorana, S.; Amendola, G.; Wagner, A.; Cosconati, S.; Schirmeister, T.; Hellmich, U. A.; Zappalà, M. Optimization Strategy of Novel Peptide-Based Michael Acceptors for the Treatment of Human African Trypanosomiasis. *Journal of medicinal chemistry* **2019**, *62*, 10617–10629. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00908.
- [130] Klein, P.; Johe, P.; Wagner, A.; Jung, S.; Kühnborn, J.; Barthels, F.; Tenzer, S.; Distler, U.; Waigel, W.; Engels, B.; *et al.* New Cysteine Protease Inhibitors: Electrophilic (Het)arenes and Unexpected Prodrug Identification for the Trypanosoma Protease Rhodesain. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2020**, *25*. DOI: 10.3390/molecules25061451.
- [131] Di Chio, C.; Previti, S.; Amendola, G.; Cosconati, S.; Schirmeister, T.; Zappalà, M.; Ettari, R. Development of Novel Benzodiazepine-Based Peptidomimetics as Inhibitors of Rhodesain from *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 995–1001. DOI: 10.1002/cmdc.202000158.
- [132] Eric Schwegler. *Masterarbeit*; Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2019.
- [133] Marco Preuß. *Masterarbeit*; Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2019.
- [134] Williamson, M. P. Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* **2013**, *73*, 1–16. DOI: 10.1016/j.pnmrs.2013.02.001.
- [135] National Institutes of Health. TALOS+: Prediction of Protein Backbone Torsion Angles from NMR Chemical Shifts: <https://spin.niddk.nih.gov/bax/software/TALOS/>.
- [136] Follmann, H.; Häberlein, I. Thioredoxins: universal, yet specific thiol-disulfide redox cofactors. *BioFactors (Oxford, England)* **1995**, *5*, 147–156.
- [137] Cree, I. A.; Andreotti, P. E. Measurement of cytotoxicity by ATP-based luminescence assay in primary cell cultures and cell lines. *Toxicology in Vitro* **1997**, *11*, 553–556. DOI: 10.1016/S0887-2333(97)00060-X.
- [138] Crouch, S.; Kozlowski, R.; Slater, K. J.; Fletcher, J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* **1993**, *160*, 81–88. DOI: 10.1016/0022-1759(93)90011-u.
- [139] Strelow, J. M. A Perspective on the Kinetics of Covalent and Irreversible Inhibition. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D* **2017**, *22*, 3–20. DOI: 10.1177/1087057116671509.
- [140] Copeland, R. A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*; Wiley, 2013.
- [141] *Computational soft matter: From synthetic polymers to proteins*; Winter School, 29 February - 6 March 2004, Gustav-Stresemann-Institut, Bonn, Germany, Gustav-Stresemann-Institut e.V. für Übernationale Bildung und Europäische Zusammenarbeit; John von Neumann-Institut für Computing; Johannes Gutenberg-Universität Mainz; Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie; Max-Planck-Institut für Polymerforschung; Winter School. Gustav-Stresemann-Institut; NIC: Jülich, 2004.
- [142] Neel, A. J.; Hilton, M. J.; Sigman, M. S.; Toste, F. D. Exploiting non-covalent  $\pi$  interactions for catalyst design. *Nature* **2017**, *543*, 637–646. DOI: 10.1038/nature21701.
- [143] Egli, M.; Sarkhel, S. Lone pair-aromatic interactions: to stabilize or not to stabilize. *Accounts of chemical research* **2007**, *40*, 197–205. DOI: 10.1021/ar068174u.
- [144] Chawla, M.; Chermak, E.; Zhang, Q.; Bujnicki, J. M.; Oliva, R.; Cavallo, L. Occurrence and stability of lone pair- $\pi$  stacking interactions between ribose and nucleobases in functional RNAs. *Nucleic acids research* **2017**, *45*, 11019–11032. DOI: 10.1093/nar/gkx757.
- [145] Svergun, D. I.; Petoukhov, M. V.; Koch, M. H. Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering. *Biophysical Journal* **2001**, *80*, 2946–2953. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)76260-1.

- [146] Petoukhov, M. V.; Franke, D.; Shkumatov, A. V.; Tria, G.; Kikhney, A. G.; Gajda, M.; Gorba, C.; Mertens, H. D. T.; Konarev, P. V.; Svergun, D. I. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of applied crystallography* **2012**, *45*, 342–350. DOI: 10.1107/S0021889812007662.
- [147] Petoukhov, M. V.; Svergun, D. I. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophysical Journal* **2005**, *89*, 1237–1250. DOI: 10.1529/biophysj.105.064154.
- [148] Franke, D.; Petoukhov, M. V.; Konarev, P. V.; Panjkovich, A.; Tuukkanen, A.; Mertens, H. D. T.; Kikhney, A. G.; Hajizadeh, N. R.; Franklin, J. M.; Jeffries, C. M.; *et al.* ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *Journal of applied crystallography* **2017**, *50*, 1212–1225. DOI: 10.1107/S1600576717007786.
- [149] Kang, C. B. 19F-NMR in target-based drug discovery. *Current medicinal chemistry* **2019**. DOI: 10.2174/0929867326666190610160534.
- [150] Rose-Sperling, D.; Tran, M. A.; Lauth, L. M.; Goretzki, B.; Hellmich, U. A. 19F NMR as a versatile tool to study membrane protein structure and dynamics. *Biological chemistry* **2019**, *400*, 1277–1288. DOI: 10.1515/hsz-2018-0473.
- [151] Grimme, S.; Bannwarth, C.; Dohm, S.; Hansen, A.; Pisarek, J.; Pracht, P.; Seibert, J.; Neese, F. Fully Automated Quantum-Chemistry-Based Computation of Spin-Spin-Coupled Nuclear Magnetic Resonance Spectra. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2017**, *56*, 14763–14769. DOI: 10.1002/anie.201708266.
- [152] Stoychev, G. L.; Auer, A. A.; Izsák, R.; Neese, F. Self-Consistent Field Calculation of Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shielding Constants Using Gauge-Including Atomic Orbitals and Approximate Two-Electron Integrals. *Journal of chemical theory and computation* **2018**, *14*, 619–637. DOI: 10.1021/acs.jctc.7b01006.
- [153] Teale, A. M.; Lutnæs, O. B.; Helgaker, T.; Tozer, D. J.; Gauss, J. Benchmarking density-functional theory calculations of NMR shielding constants and spin-rotation constants using accurate coupled-cluster calculations. *The Journal of chemical physics* **2013**, *138*, 24111. DOI: 10.1063/1.4773016.
- [154] Krauth-Siegel, R. L.; Schmidt, H. Trypanothione and Tryparedoxin in Ribonucleotide Reduction. *Protein Sensors and Reactive Oxygen Species - Part A: Selenoproteins and Thioredoxin*; Elsevier, 2002; pp 259–266.
- [155] Alphey, M. S.; Tetaud, E.; Gourley, D. G.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N. Crystallization of recombinant Crithidia fasciculata tryparedoxin. *Journal of structural biology* **1999**, *126*, 76–79. DOI: 10.1006/jsbi.1999.4091.
- [156] Noguera, M. E.; Vazquez, D. S.; Ferrer-Sueta, G.; Agudelo, W. A.; Howard, E.; Rasia, R. M.; Manta, B.; Cousido-Siah, A.; Mitschler, A.; Podjarny, A.; *et al.* Structural variability of E. coli thioredoxin captured in the crystal structures of single-point mutants. *Scientific reports* **2017**, *7*, 42343. DOI: 10.1038/srep42343.
- [157] Amorim, G. C.; Pinheiro, A. S.; Netto, L. E. S.; Valente, A. P.; Almeida, F. C. L. NMR solution structure of the reduced form of thioredoxin 2 from Saccharomyces cerevisiae. *Journal of biomolecular NMR* **2007**, *38*, 99–104. DOI: 10.1007/s10858-007-9144-z.
- [158] Goretzki, B.; Glogowski, N. A.; Diehl, E.; Duchardt-Ferner, E.; Hacker, C.; Gaudet, R.; Hellmich, U. A. Structural Basis of TRPV4 N Terminus Interaction with Syndapin/PACSIN1-3 and PIP2. *Structure (London, England : 1993)* **2018**, *26*, 1583-1593.e5. DOI: 10.1016/j.str.2018.08.002.
- [159] Steinert, P.; Plank-Schumacher, K.; Montemartini, M.; Hecht, H. J.; Flohé, L. Permutation of the active site motif of tryparedoxin 2. *Biological chemistry* **2000**, *381*, 211–219. DOI: 10.1515/BC.2000.028;
- [160] Melchers, J.; Diechtierow, M.; Fehér, K.; Sinning, I.; Tews, I.; Krauth-Siegel, R. L.; Muhle-Goll, C. Structural basis for a distinct catalytic mechanism in Trypanosoma brucei tryparedoxin

- peroxidase. *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283*, 30401–30411. DOI: 10.1074/jbc.M803563200.
- [161] Plevin, M. J.; Bryce, D. L.; Boisbouvier, J. Direct detection of CH/ $\pi$  interactions in proteins. *Nature chemistry* **2010**, *2*, 466–471. DOI: 10.1038/nchem.650.
- [162] Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. The resurgence of covalent drugs. *Nature reviews. Drug discovery* **2011**, *10*, 307–317. DOI: 10.1038/nrd3410.
- [163] Spencer, D. M.; Wandless, T. J.; Schreiber, S. L.; Crabtree, G. R. Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science (New York, N.Y.)* **1993**, *262*, 1019–1024. DOI: 10.1126/science.7694365.
- [164] DeRose, R.; Miyamoto, T.; Inoue, T. Manipulating signaling at will: chemically-inducible dimerization (CID) techniques resolve problems in cell biology. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **2013**, *465*, 409–417. DOI: 10.1007/s00424-012-1208-6.
- [165] Voß, S.; Klewer, L.; Wu, Y.-W. Chemically induced dimerization: reversible and spatiotemporal control of protein function in cells. *Current opinion in chemical biology* **2015**, *28*, 194–201. DOI: 10.1016/j.cbpa.2015.09.003.
- [166] Bogacz, M.; Krauth-Siegel, R. L. Tryparedoxin peroxidase-deficiency commits trypanosomes to ferroptosis-type cell death. *eLife* **2018**, *7*. DOI: 10.7554/eLife.37503.
- [167] Kariuki, C. K.; Stijlemans, B.; Magez, S. The Trypanosomal Transferrin Receptor of Trypanosoma Brucei-A Review. *Tropical medicine and infectious disease* **2019**, *4*. DOI: 10.3390/tropicalmed4040126.
- [168] Breidbach, T.; Scory, S.; Krauth-Siegel, R.; Steverding, D. Growth inhibition of bloodstream forms of Trypanosoma brucei by the iron chelator deferoxamine. *International Journal for Parasitology* **2002**, *32*, 473–479. DOI: 10.1016/s0020-7519(01)00310-1.
- [169] Taylor, M. C.; Kelly, J. M. Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology* **2010**, *137*, 899–917. DOI: 10.1017/S0031182009991880.
- [170] Theil, E. C. Iron homeostasis and nutritional iron deficiency. *The Journal of nutrition* **2011**, *141*, 724S–728S. DOI: 10.3945/jn.110.127639.
- [171] Dong, X.-P.; Cheng, X.; Mills, E.; Delling, M.; Wang, F.; Kurz, T.; Xu, H. The type IV mucopolidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel. *Nature* **2008**, *455*, 992–996. DOI: 10.1038/nature07311.
- [172] 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. *Molecular microbiology* **2013**, *89*, 420–432. DOI: 10.1111/mmi.12285.
- [173] Cheng, X.; Shen, D.; Samie, M.; Xu, H. Mucolipins: Intracellular TRPML1-3 channels. *FEBS Letters* **2010**, *584*, 2013–2021. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.12.056.
- [174] Venkatachalam, K.; Wong, C.-O.; Zhu, M. X. The role of TRPMLs in endolysosomal trafficking and function. *Cell calcium* **2015**, *58*, 48–56. DOI: 10.1016/j.ceca.2014.10.008.
- [175] Dong, X.-P.; Shen, D.; Wang, X.; Dawson, T.; Li, X.; Zhang, Q.; Cheng, X.; Zhang, Y.; Weisman, L. S.; Delling, M.; *et al.* PI(3,5)P(2) controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca(2+) release channels in the endolysosome. *Nature communications* **2010**, *1*, 38. DOI: 10.1038/ncomms1037.
- [176] Li, M.; Zhang, W. K.; Benveniste, N. M.; Zhou, X.; Su, D.; Li, H.; Wang, S.; Michailidis, I. E.; Tong, L.; Li, X.; *et al.* Structural basis of dual Ca<sup>2+</sup>/pH regulation of the endolysosomal TRPML1 channel. *Nature structural & molecular biology* **2017**, *24*, 205–213. DOI: 10.1038/nsmb.3362.
- [177] Zhou, X.; Li, M.; Su, D.; Jia, Q.; Li, H.; Li, X.; Yang, J. Cryo-EM structures of the human endolysosomal TRPML3 channel in three distinct states. *Nature structural & molecular biology* **2017**, *24*, 1146–1154. DOI: 10.1038/nsmb.3502.
- [178] Viet, K. K.; Wagner, A.; Schwickert, K.; Hellwig, N.; Brennich, M.; Bader, N.; Schirmeister, T.; Morgner, N.; Schindelin, H.; Hellmich, U. A. Structure of the Human TRPML2 Ion Channel

Extracytosolic/Luminal Domain. *Structure (London, England : 1993)* **2019**, 27, 1246-1257.e5. DOI: 10.1016/j.str.2019.04.016.

[179] Venkatachalam, K.; Montell, C. TRP channels. *Annual review of biochemistry* **2007**, 76, 387–417. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.

[180] Feng, X.; Huang, Y.; Lu, Y.; Xiong, J.; Wong, C.-O.; Yang, P.; Xia, J.; de Chen; Du, G.; Venkatachalam, K.; *et al.* Drosophila TRPML forms PI(3,5)P<sub>2</sub>-activated cation channels in both endolysosomes and plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* **2014**, 289, 4262–4272. DOI: 10.1074/jbc.m113.506501.

## 8 Curriculum vitae



### ADRESSE

Martin-Luther-Str. 59  
55131 Mainz

### TELEFON

+49-170-8215603

### E-MAIL

wagnerannika389@gmail.com

### GEBURTSTAG

30. Dezember 1989

### NATIONALITÄT

Deutsch

### SPRACHEN

Deutsch: Muttersprache  
Englisch: Sehr gute  
Kenntnisse

### IT KENNTNISSE

MS Word, Excel und  
Powerpoint  
CorelDraw  
TopSpin  
PyMOL

### Ausbildung

03/2016 – (12/2020)	<b>Johannes Gutenberg-Universität Mainz</b> Promotionsstudentin, Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe Jun. Prof. Dr. [REDACTED]
05/2017 – 06/2017	<b>Universität Heidelberg Biochemie Zentrum BZH</b> Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] <b>Gefördert durch ein Promotionsstipendium der Prof. Rochelmeyer Stiftung</b>
04/2010 – 10/2015	<b>Johannes Gutenberg-Universität Mainz</b> <i>Diplom, Biomedizinische Chemie</i> Wahlpflichtkurse: Pharmakologie und Toxikologie, pharmazeutische und medizinische Chemie Diplomarbeit: "Der Einfluss des Renin-Angiotensin-Systems auf die proteolytische Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins"
09/2009 – 03/2010	<b>Gesundheits- und Pflegeschulen – Stiftung kreuznacher diakonie</b> Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin
08/2000 – 03/2009	<b>Emanuel-Felke-Gymnasium</b> <b>Bad Sobernheim</b> <i>Allgemeine Hochschulreife</i>

### Berufliche Erfahrung

04/2017 – (03/2021)	<b>Johannes Gutenberg-Universität Mainz</b> Wissenschaftliche Mitarbeiterin
12/2015 – 03/2017	<b>Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main</b> Wissenschaftliche Mitarbeiterin

**Beiträge zu Konferenzen**

07/2019	II DFG-FAPESP Workshop: „Protease Research in Chemistry and Biology: Focus on Neglected Tropical Diseases“, Mainz – Vortrag
04/2019	Life Science Meeting Mainz – Mitglied des Organisationsteams der Junior GBM
10/2018	I DFG-FAPESP Workshop: „Protease Research in Chemistry and Biology: Focus on Neglected Tropical Diseases“, São Paulo, Brasilien – Posterpräsentation
07/2018	Gordon Research Conference „Drug Metabolism“, Holderness, NH, USA – Vortrag und Posterpräsentation
04/2018	Life Science Meeting Mainz – Mitglied des Organisationsteams der Junior GBM
01/2018	DECHEMA: „Advances in Chemical Biology“, Frankfurt am Main – Posterpräsentation
10/2017	CRC807 Symposium: „New Horizons in Membrane Transport and Communication“, Frankfurt am Main – Posterpräsentation
10/2017	BioChem Symposium, Mainz – Mitglied des Organisationsteams
04/2017	BioChem Symposium, Mainz – Vortrag
03/2017	Interdisziplinäres Symposium, Mainz – Vortrag

**Studentenbetreuung**

04/2019 – 12/2019	■■■■■■■■■■ – Masterarbeit (MSc Biomedizinische Chemie)
10/2018 – 12/2018	■■■■■■■■■■ – Forschungspraktikum (MSc Biomedizinische Chemie)
02/2018 – 10/2018	■■■■■■■■■■ – Forschungspraktikum und Masterarbeit (MSc Biomedizinische Chemie)
04/2018 – 07/2018	■■■■■■■■■■ – Bachelorarbeit (BSc Biomedizinische Chemie)
09/2017 – 12/2017	■■■■■■■■■■ – Bachelorarbeit (BSc Biomedizinische Chemie)
08/2016 – 12/2016	■■■■■■■■■■ – Bachelorarbeit (BSc Biomedizinische Chemie)

## Publikationen

Maiorana, S., R. Ettari, S. Previti, G. Amendola, A. Wagner, S. Cosconati, U. A. Hellmich, T. Schirmeister, and M. Zappalà, Peptidyl Vinyl Ketone Irreversible Inhibitors of Rhodesain: Modifications of the P2 Fragment. *Chem. Med. Chem.*, 2020, doi: 10.1002/cmdc.202000360.

Dietschreit, J. C. B., A. Wagner, T. A. Le, P. Klein, H. Schindelin, T. Opatz, B. Engels, U. A. Hellmich, and C. Ochsenfeld, Predicting <sup>19</sup>F NMR Chemical Shifts: A Combined Computational and Experimental Study of a Trypanosomal Oxidoreductase-Inhibitor Complex. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2020, **59**(31): 12669-12673.

Klein, P., F. Barthels, P. Johe, A. Wagner, S. Tenzer, U. Distler, T. A. Le, P. Schmid, V. Engel, B. Engels, U. A. Hellmich, T. Opatz, and T. Schirmeister, Napthoquinones as Covalent Reversible Inhibitors of Cysteine Proteases-Studies on Inhibition Mechanism and Kinetics. *Molecules*, 2020, **25**(9): 2064.

Klein, P., P. Johe, A. Wagner, S. Jung, J. Kühnborn, F. Barthels, S. Tenzer, U. Distler, W. Waigel, B. Engels, U. A. Hellmich, T. Opatz, and T. Schirmeister, New Cysteine Protease Inhibitors: Electrophilic (Het)arenes and Unexpected Prodrug Identification for the Trypanosoma Protease Rhodesain. *Molecules*, 2020, **25**(6):1451.

Ettari, R., S. Previti, S. Maiorana, G. Amendola, A. Wagner, S. Cosconati, T. Schirmeister, U. A. Hellmich, and M. Zappalà, Optimization Strategy of Novel Peptide-Based Michael Acceptors for the Treatment of Human African Trypanosomiasis. *J. Med. Chem.*, 2019, **62**(23):10617-10629.

Steiert, E., J. Ewald, A. Wagner, U. A. Hellmich, H. Frey, and P. R. Wich, pH-Responsive protein nanoparticles via conjugation of degradable PEG to the surface of cytochrome c. *Polym. Chem.*, 2020, **11**:551-559.

von Hammerstein, F., L. M. Lauth, S. Hammerschmidt, A. Wagner, T. Schirmeister, and U. A. Hellmich, Cis autocatalytic cleavage of glycine-linked Zika virus NS2B-NS3 protease constructs. *FEBS Lett.*, 2019, **27**(8):2204-2213.

Viet, K. K.\*, A. Wagner\*, K. Schwickert\*, N. Hellwig, M. Brennich, N. Bader, T. Schirmeister, N. Morgner, H. Schindelin, and U. A. Hellmich, Structure of the Human TRPML2 Ion Channel Extracytosolic/Luminal Domain. *Structure*, 2019, **27**(8):1246-1257.

\* contributed equally

Wagner, A., T. A. Le, M. Brennich, P. Klein, N. Bader, E. Diehl, D. Paszek, A. K. Weickhmann, N. Dirdjaja, R. L. Krauth-Siegel, B. Engels, T. Opatz, H. Schindelin, and U. A. Hellmich, *Inhibitor-induced Dimerization of an Essential Oxidoreductase from African Trypanosomes*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2019, 58(11):3640-3644.

Previti, S., R. Ettari, S. Cosconati, G. Amendola, K. Couchene, A. Wagner, U. A. Hellmich, K. Ulrich, R. L. Krauth-Siegel, P. R. Wich, I. Schmid, T. Schirmeister, J. Gut, P. J. Rosenthal, S. Grasso, and M. Zappalá, Development of Novel Peptide-Based Michael Acceptors Targeting Rhodesain and Falcipain-2 for the Treatment of Neglected Tropical Diseases (NTDs). *J. Med. Chem.*, 2017, 60(16):6911-6923.

Wagner, A., E. Diehl, R. L. Krauth-Siegel, and U. A. Hellmich, Backbone NMR Assignments of Tryparedoxin, the Central Protein in the Hydroperoxide Detoxification Cascade of African Trypanosomes, in the Oxidized and Reduced Form. *Biomol. NMR. Assign.*, 2017, 11(2):193-196.

Kanarek, A. M., A. Wagner, J. Küppers, M. Gütschow, R. Postina, and E. Kojro, Crosstalk between angiotensin and the nonamyloidogenic pathway of Alzheimer's amyloid precursor protein. *FEBS J.*, 2017, 284(5): 742-753.