Leitstruktursuche mithilfe eines kristallographischen Fragment-*Screenings* zur Inhibierung des Klasse-II-Chaperons IpgC aus *Shigella flexneri*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Marina Gárdonyi (M.Sc.)

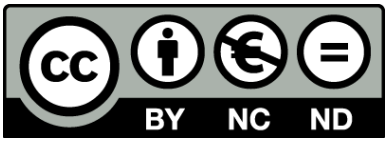
aus
Bad Neuenahr-Ahrweiler

Marburg/Lahn 2021

Erstgutachter: **Prof. Dr. Gerhard Klebe**
Institut für Pharmazeutische Chemie
Philipps-Universität Marburg

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Andreas Heine**
Institut für Pharmazeutische Chemie
Philipps-Universität Marburg

Eingereicht am 27.08.2021
Tag der mündlichen Prüfung am 28.10.2021
Hochschulkennziffer 1180



Die in dieser Arbeit verfassten Untersuchungen wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Juli 2017 bis Mai 2021 durchgeführt.

Für meine Eltern

Aus dieser Dissertation hervorgegangene Publikationen und Konferenzbeiträge

Journal Publikation
Crystallographic Fragment-Screening and *in Silico* Docking to Find Inhibitors for *Shigella* Chaperone IpgC M. Gárdonyi, C. Hasewinkel, K. Reuter, A. Heine, G. Klebe (Manuskript in Bearbeitung)

Titel des Vortrags (V) bzw. Posters (P) und Angaben zur Konferenz
P: Leitstruktursuche zur Inhibierung des Klasse-II-Chaperons IpgC aus *Shigella flexneri* *Projekt-Begutachtung des LOEWE-Zentrums DRUID* 2021, Online
V: IpgC – A Virulence Specific Chaperone of *Shigella* – A New Target against Shigellosis *DRUID Retreat* 2020, Online
P: High-Resolution *Apo* Crystal Structure of *Shigella* Chaperone IpgC *International School of Crystallography* 2020, Erice, Italien (abgesagt wegen COVID-19)
P: Obstruction of the virulence-specific chaperone IpgC of *Shigella flexneri* *Frühjahrssymposium LOEWE-Zentrum DRUID* 2020, Frankfurt/Main, Deutschland
P: Inhibition of the virulence-specific chaperone IpgC of *Shigella flexneri* *Frühjahrssymposium LOEWE-Zentrum DRUID* 2019, Marburg, Deutschland

Summary

Shigellosis is an inflammatory disease of the colon caused by a bacterial infection with *Shigella*. This disease predominantly occurs in developing countries and claims a high number of victims per year. To develop pathogenicity, the bacteria have to penetrate the epithelial cells of the colon. To enter the cells, they use a type III secretion system. IpgC – a class II chaperone – is essential for the active infection of endothelial cells due to its multiple interactions with invasion proteins. The focus of this thesis was to find a lead structure for the inhibition of IpgC function.

The protocol for heterologous production and purification of IpgC was adopted from previous works and slightly modified. The first step was to find a crystallization condition for IpgC. Initially, a protein variant shortened by four amino acids at the C-terminus was used. With this variant a crystallization condition was found. However, this condition resulted in crystals that had a too low scattering power, most likely due to high solvent content. To obtain a better crystallizable protein variant, the principle of surface entropy reduction was used. At the same time, another variant, which was additionally shortened by nine amino acids at the N-terminus, was used for the crystallization experiments. With this protein variant crystals with high scattering power were finally obtained (**Section 3.6**-**3.7**).

Despite the fact that these crystals were predominantly twinned, the *apo* structure of IpgC was able to be determined. With a resolution of 1.58 Å, it was the first high-resolution crystal structure of IpgC. Compared to already deposited IpgC-structures, a previously unobserved dimer arrangement of the protein was obtained. This could be of importance in the future, because IpgC also exists in solution as a dimer (**Section 3.8**).

With the same crystallization condition, it was possible to perform a crystallographic fragment screening using an in-house fragment library comprising 96 structurally diverse fragments. Ten fragment hits were identified which had bound to the protein at a total of five different sites. Most of the fragments had bound in a pocket in the interface of the dimer (**Section 3.9**).

The 96 fragments were again used to perform a thermal shift assay. This assay aimed to confirm the hits found in the crystallographic fragment screening. However, no fragments were found that increased the melting point of the protein which would have indicated a stabilizing effect. Instead, 26 fragments were identified that lowered the melting point of the

protein. These included some of the crystallographic fragment hits which had bound to the dimer interface. This was explained by the fact that some of these fragments destabilize the dimer by breaking hydrogen bonds between chain A and chain B of the protein (**Section 3.10**).

The fragments found in the dimer interface were considered as a good starting point for further drug development. *In silico* docking was used in order to identify potential follow-up compounds. For this purpose, the program *SeeSAR* was used. By using only commercially available compounds for docking, synthesis of the compounds was initially avoided. Based on promising docking results and using three different fragment hits as a starting point, 17 follow-up compounds were selected (**Section 3.11**).

On the basis of soaking experiments and subsequent crystal structure determination, the follow-up compounds that actually form a complex with IpgC were to be determined. Two compounds were clearly identified as hits. Another compound represented a potential hit. Two of these compounds (**U08** and **U11**) had bound in interface pocket 1, as expected. One of these two follow-up compounds (**U11**) confirmed the binding mode observed for fragment **J20** and filled the hydrophobic region of the binding pocket more completely than **J20**. Contrary to expectations based on docking, the third compound (**U09**) occupied a completely different binding site. However, this binding site is of great importance. It is the only known binding site of an interaction partner so far. It is the binding site of IpaB. With **U09** and **U11**, two follow-up compounds were identified which are of great importance for further experiments (**Section 3.12**).

Spa13 – part of the type III secretion system – was to be cloned, recombinantly produced and purified in order to determine the three-dimensional structure of the IpgC-Spa13 complex by X-ray crystallography. A protocol for heterologous production and purification of Spa13 was established. Using a GST tag, only insoluble protein was obtained. Using an MBP tag, Spa13 was produced and purified in soluble form. However, Spa13 was found to be present in a highly aggregated form that made purification difficult. As a result, Spa13 was not able to be obtained completely pure and monodisperse. The coproduction of Spa13 together with its interaction partner IpgC was not successful either (**Section 3.1**).

Rather than crystallography, a peptide microarray was performed to obtain information about the interaction of IpgC with Spa13. Small peptide sequences out of Spa13 were fixed on a membrane. Using appropriate antibodies, the interaction of IpgC with these sequences was

to be detected. This was done to determine the binding epitope of Spa13. However, the results were not conclusive. Only one of three positive controls was successful. For two of the Spa13 peptides a very weak signal was obtained. However, these peptide sequences were not confirmed as binding epitopes in initial experiments by MST. This was partially due to the limited solubility of the peptides (**Section 3.3**).

The binding epitopes of MxiE and IpaC had already been identified in previous works. Here, co-crystallization experiments were performed to determine the crystal structure of the complexes with IpgC. Concerning the co-crystallization of IpgC with the binding epitope of MxiE, crystals with a good scattering power were obtained several times. However, the respective structures revealed that the peptide was not bound. Using the published condition for co-crystallization of IpgC with the IpaB binding epitope, the co-crystallization of IpgC with the binding epitope of IpaC was successful. Here, however, the collected data set to 2.62 Å resolution was not able to be resolved for presently unexplained reasons (**Section 3.5**).

Inhaltsverzeichnis

Summary ..... **I**

Inhaltsverzeichnis ..... **V**

Abkürzungsverzeichnis ..... **XI**

Einheiten, Konstanten und Variablen ..... **XIII**

Proteinogene Aminosäuren ..... **XV**

1. Einleitung **1**

1.1. Shigellenruhr – eine vernachlässigte Tropenerkrankung 1

1.1.1. Shigellenruhr 1

1.1.2. *Shigella*-Bakterien 2

1.1.3. Mechanismen der Epithelzellinvasion 2

1.1.4. Typ-III-Sekretionssystem 3

1.1.5. Behandlung und Prävention 5

1.1.6. Wie entstehen Antibiotikaresistenzen? 6

1.1.7. Wie weit ist die Impfstoffforschung? 7

1.2. IpgC – Klasse-II-Chaperon 9

1.2.1. Tertiärstruktur 9

1.2.2. Komplexstruktur mit dem Bindungsepitop von IpaB 10

1.3. Proteinkristallographie 11

1.3.1. Vom Protein in Lösung zur dreidimensionalen Proteinstruktur 11

1.3.2. Wenn Röntgenstrahlung auf Kristalle trifft 12

1.3.3. Fehler im Kristallgitter – Verzwilligung 14

1.4. Fragment-basiertes Wirkstoffdesign 15

1.4.1. 96er Fragment-Bibliothek 18

1.5. *In Silico-Docking* 19

1.5.1. Vom Fragment-*Hit* zum hochaffinen Liganden 19

1.5.2. *SeeSAR* – eine Plattform für struktur- und ligandbasiertes molekulares Design 19

1.6. Peptid-*Microarray* 21

1.7. *Thermal-Shift-Assay* 23

2. Zielsetzung **25**

3. Ergebnisse und Diskussion 27

3.1. Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem Spa13 27

3.1.1. Verwendung des pGEX-6P-mod-Vektors mit GST-*Tag* und *PreScission*-Protease-Schnittstelle 27

3.1.2. Verwendung des pMALc5x-Vektors mit MBP-*Tag* und *PreScission*-Protease-Schnittstelle 28

3.1.3. Koexpression des *spa13*-Gens zusammen mit dem Gen *ipgC0,-4S* unter Verwendung des Expressionsvektors pETDuet-1 35

3.1.4. Diskussion 38

3.2. Sekundärstrukturvorhersage von Spa13 mit *PSIPRED* 40

3.2.1. Ergebnisse 40

3.2.2. Diskussion 41

3.3. Peptid-*Microarray* 42

3.3.1. Reinigung des GST-Fusionsproteins 42

3.3.2. Nachweis des Fusionsproteins mittels Western Blot 43

3.3.3. Ergebnisse 44

3.3.4. Diskussion 45

3.4. Reinigung des IpgC-Volllängenproteins 47

3.5. Kokristallisationsversuche mit IpgC und den Bindungsepitopen von IpaB, IpaC und MxiE 49

3.5.1. Reproduktion einer Kristallisationsbedingung für IpgC und das Bindungsepitop von IpaB 49

3.5.2. Kokristallisation von IpgC mit dem Bindungsepitop von MxiE 52

3.5.3. Kokristallisation von IpgC mit dem Bindungsepitop von IpaC 56

3.5.4. Diskussion 59

3.6. Kristallisationsversuche mit IpgC 61

3.6.1. Verwendung von IpgC0,-4S 61

3.6.2. Suche nach einer leichter zu kristallisierenden IpgC-Variante unter Anwendung des Konzepts der „*Surface Entropy Reduction*“ 65

3.6.3. Verwendung von IpgC-9,-4S 69

3.7. Kristallisation von IpgC-9,-4S mit Classics H4 74

3.7.1. Testen der Kristalle auf ihr Streuvermögen 75

3.7.2. Probleme bei der Bestimmung der korrekten Raumgruppe 76

3.7.3. Umgang mit Verzwilligung 77

3.7.4. Allgemeine Probleme bei der Durchführung der Kristallisation 78

3.7.5. Stabilitätsprüfungen gegenüber Dimethylsulfoxid 79

3.7.6. Diskussion 80
3.8. Hochauflösende Kristallstruktur von IpgC-9,-4S 84
3.8.1. Neuartige Konformation des flexiblen Proteinbereichs 84
3.8.2. Dimerisierung 85
3.8.3. Vergleich mit anderen bereits ermittelten Dimer-Anordnungen 89
3.8.4. Magnesium- und Chlorid-Ionen 91
3.9. Röntgenkristallographisches Fragment-*Screening* an IpgC 94
3.9.1. *Interface*-Tasche 1 96
3.9.2. Bindungsmodus von J20 97
3.9.3. Bindungsmodus von J2 98
3.9.4. Bindungsmodus von J1 101
3.9.5. Bindungsmodus von J45 103
3.9.6. Bindungsmodus von J66 105
3.9.7. Bindungsmodus von J6 106
3.9.8. Bindungsmodus von J52 107
3.9.9. Bindungsmodus von J36 109
3.9.10. *Blank*-Struktur zeigt DMSO-Molekül in *Interface*-Tasche 1 112
3.9.11. *Interface*-Tasche 2 114
3.9.12. Bindungsmodus von J11 115
3.9.13. Bindungsmodus von J33 117
3.9.14. Protein-Ligand-Interaktionen 119
3.9.15. Diskussion 120
3.10. Fragment-*Screening* mithilfe eines *Thermal-Shift-Assays* 128
3.10.1. Ergebnisse 128
3.10.2. Diskussion 129
3.11. Mit *SeeSAR* auf der Suche nach *Follow-up*-Verbindungen 137
3.11.1. Bewertung der *Docking*-Ergebnisse 137
3.11.2. *Docking*-Ergebnisse mit J20 als Startfragment 138
3.11.3. *Docking*-Ergebnisse mit J2 als Startfragment 144
3.11.4. *Docking*-Ergebnisse mit J45 als Startfragment 148
3.12. Kristallstrukturen der *Follow-up*-Verbindungen 152
3.12.1. Bindungsmodus von U11 153
3.12.2. Überlagerung mit J20, J45 und der entsprechenden *Docking*-Pose 154
3.12.3. Bindungsmodus von U09 156

3.12.4. Überlagerung mit der IpgC-IpaB-Komplexstruktur 158
3.12.5. Ist U08 ebenfalls ein *Follow-up-Hit*? 159
3.12.6. Bindungsmodus von U08 und Überlagerung mit J2 und der entsprechenden *Docking*-Pose 162
3.12.7. Diskussion 164
4. Zusammenfassung 173
5. Material und Methoden 177
5.1. Materialien 177
5.1.1. Laborgeräte 177
5.1.2. Chemikalien 178
5.1.3. Puffer und Lösungen 179
5.1.4. Medien 182
5.1.5. Verbrauchsmaterial 182
5.1.6. Primer 183
5.1.7. Kits 183
5.1.8. Enzyme, Proteine, Molekular-Standards & Co 183
5.1.9. Bakterienstämme 184
5.1.10. Vektoren 184
5.1.11. Säulen 184
5.1.12. Antikörper 184
5.1.13. Peptide 185
5.1.14. *Follow-up*-Verbindungen 186
5.2. Molekularbiologische Methoden 187
5.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) 187
5.2.2. Enzymatischer Verdau 188
5.2.3. Agarose-Gelelektrophorese 188
5.2.4. Gelextraktion 189
5.2.5. Ligation 189
5.2.6. Transformation 190
5.2.7. Übernachtkultur 190
5.2.8. Plasmidpräparation 190
5.2.9. Bestimmung der DNA-Konzentration und Sequenzierung 190
5.2.10. Herstellung eines Glycerol-Stocks 191
5.2.11. Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR 191

5.3. Proteinbiochemische Methoden 191
5.3.1. Heterologe Expression von rekombinanten *spa13*-Genen in *E. coli* 191
5.3.2. Messung der optischen Dichte einer Zellkultur 191
5.3.3. Zellaufschluss und -ernte 192
5.3.4. Affinitätschromatographie mittels Dextrin-Sepharose-Säule 192
5.3.5. Affinitätschromatographie mittels Glutathion-Sepharose-Säule 192
5.3.6. Affinitätschromatographie mittels Nickelsäule 193
5.3.7. Pufferaustausch mittels Dialyse 193
5.3.8. Abspaltung eines Maltosebindeprotein-*Tags* 193
5.3.9. Ionenaustauschchromatographie mittels DEAE-Säule 194
5.3.10. Ionenaustauschchromatographie mittels SP HP-Säule 194
5.3.11. Präparative Molekularsiebchromatographie 194
5.3.12. Heterologe Produktion und Reinigung der *PreScission*-Protease 195
5.3.13. Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IpgC und der trunkierten Varianten IpgC0,-4S und IpgC-9,-4S 196
5.3.14. Reinigung des Fusionsproteins GST-IpgC0,-4S 199
5.3.15. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 200
5.3.16. Bestimmung der Proteinkonzentration 201
5.3.17. Elektrophoretischer Proteintransfer (Western Blot) 201
5.4. Peptid-*Microarray* 202
5.5. *Surface Entropy Reduction Prediction Server* 204
5.6. *Thermal-Shift-Assay* 205
5.7. Kristallographische Methoden 206
5.7.1. MARXTAL-*Screens* 206
5.7.2. *Streak-seeding*-Methode 207
5.7.3. *Soaking* der 96er Fragment-Bibliothek 207
5.7.4. *Soaking* der *Follow-up*-Verbindungen 208
5.7.5. Datensammlung und -prozessierung sowie Strukturbestimmung und Verfeinerung 210
5.7.6. Ermittlung von Interaktionen mittels *Contacsym* 211
5.8. *In silico-Docking* mit *SeeSAR* 212
5.8.1. Allgemeine Durchführung 212
5.8.2. *Docking* ausgehend von J20 213
5.8.3. *Docking* ausgehend von J2 215
5.8.4. *Docking* ausgehend von J45 216

6. Anhang 219

6.1. Sequenzen 219

6.2. *Thermal-Shift-Assay*-Daten 220

6.3. Kristallographische Tabellen 224

6.4. *HYDE-Coloring* für weitere *Follow-up*-Verbindungen 229

6.5. *B*-Werte nach Verfeinerung der Struktur „mlu32“ mit U08 230

Literaturverzeichnis 231

Abbildungsverzeichnis 241

Tabellenverzeichnis 245

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Abkürzungsverzeichnis

3

3D · dreidimensional

A

ADA · *N*-(2-Acetamido)iminodiessigsäure
APS · Ammoniumperoxodisulfat
ATP · Adenosintriphosphat

B

BESSY · Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
BIS-TRIS · Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan

C

CA II · Carboanhydrase II
CBD · Chaperon-Bindedomäne
CoV · Coronavirus

D

DEAE · Diethylaminoethyl
DESY · Deutsches Elektronensynchrotron
DLS · Dynamische Lichtstreuung, engl. *dynamic light scattering*
DMSO · Dimethylsulfoxid
DNA · Desoxyribonukleinsäure, engl. *deoxyribonucleic acid*
ds · doppelsträngig, engl. *double-stranded*
DSF · engl. *differential scanning fluorimetry*
DTT · Dithiothreitol

E

E.coli · *Escherichia coli*
EDTA · Ethylendiamintetraessigsäure
EP · Endothiapepsin
ESRF · engl. *European Synchrotron Radiation Facility*

F

FBDD · Fragment-basiertes Wirkstoffdesign, engl. *fragment-based drug design*
FD · engl. *FastDigest*
FF · engl. *Fast Flow*
Fmoc · Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC · engl. *fast protein liquid chromatography*
FPPS · Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase

G

GMMA · engl. *generalized modules for membrane antigens*
GSH · Glutathion
GST · Glutathion-S-Transferase

H

H · Helix
HEPES · 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF · engl. *High-Fidelity*
HP · engl. *High Performance*
HRP · Meerrettich-Peroxidase, engl. *horseradish peroxidase*
HSD-14 · 17-β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 14
HTS · Hochdurchsatz-*Screening*, engl. *high-throughput screening*
HZB · Helmholtz-Zentrum Berlin

I

ID · Identifikationsnummer
IpaB · engl. *invasion plasmid antigen* B
IpaC · engl. *invasion plasmid antigen* C
IpgC · engl. *invasion plasmid gen* C
IPTG · Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITC · Isothermale Titrationskalorimetrie, engl. *isothermal titration calorimetry*

L

LB · engl. *lysogeny broth*
LPS · Lipopolysaccharide

M

MAD · engl. *multiple-wavelength anomalous dispersion*
MALLS · engl. *multiangle laser light scattering*
MBP · Maltosebindeprotein
MCS · engl. *multiple cloning site*
MES · 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS · 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure
MPD · 2-Methylpentan-2,4-diol
MR · Molekularer Ersatz, engl. *molecular replacement*
MS · Massenspektrometrie
MST · Mikroskalenthermophorese

MWCO · Molekulargewichtsgrenze
engl. *molecular weight cut-off*
Mxi · engl. *membrane expression of invasion plasmid antigens protein*
M-Zellen · engl. *microfold cells*

N

NC · Nitrocellulose
NCS · nicht-kristallographische Symmetrie,
engl. *non-crystallographic symmetry*
NMR · Kernspinresonanz,
engl. *nuclear magnetic resonance*
NSP3 · engl. *non-structural protein 3*
NTP · Nukleosidtriophosphat

O

OD · Optische Dichte
O-Einheiten · Oligosaccharid-Einheiten
Osp · engl. *outer surface protein*

P

PAGE · Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS · Phosphat-gepufferte Salzlösung,
engl. *phosphate-buffered saline*
PCR · Polymerasekettenreaktion,
engl. *polymerase chain reaction*
PDB · Proteindatenbank
PEG · Polyethylenglycol
PKA · Proteinkinase A
PVDF · Polyvinylidenfluorid

R

RMSD · engl. *root-mean-square deviation*
RNA · Ribonukleinsäure,
engl. *ribonucleic acid*

S

S · *Shigella*
SAD · engl. *single-wavelength anomalous dispersion*
SAR · Strukturwirkungsbeziehung,
engl. *structure-activity relationship*
SARS · engl. *severe acute respiratory syndrome*
SAXS · Kleinwinkel-Röntgenstreuung,
engl. *small-angle X-ray scattering*
SDS · Natriumdodecylsulfat,
engl. *sodium dodecyl sulfate*
SEC · Größenausschlusschromatographie,
engl. *size exclusion chromatography*
SERp · Oberflächenentropiereduktionsvorhersage,
engl. *Surface Entropy Reduction prediction*
SP · Sepharose
Spa · engl. *surface presentation of antigens protein*
SPR · Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie,
engl. *surface plasmon resonance spectroscopy*
SV · Säulenvolumen

T

T3SS · Typ-III-Sekretionssystem
TAE · Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS · TRIS-gepufferte Salzlösung,
engl. *tris-buffered saline*
TEMED · Tetramethylethylendiamin
TGT · tRNA-Guanin-Transglycosylase
TOTD · 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin
TPR · Tetratricopeptid-Wiederholungen,
engl. *tetratricopeptide repeats*
TRIS · Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA · *Thermal-Shift-Assay*
T-Zelle · Thymus-Zelle

U

UV · Ultraviolettstrahlung

V

VdW · Van-der-Waals

W

WHO · Weltgesundheitsorganisation,
engl. *World Health Organization*

Einheiten, Konstanten und Variablen

A

A · Ampere
Å · Ångström (1 Å = 10^{-10} m)
AU · Absorptionseinheit

B

B-Faktor · Temperaturfaktor

C

° · Grad
°C · Grad Celsius

D

Da · Dalton (1 Da = 1 g/mol)

F

F_o · beobachtete Reflexionsamplitude
F_c · berechnete Reflexionsamplitude

G

g · Gramm

H

h · Stunde

I

I · Intensität

J

J · Joule

K

K · Kelvin
k · Kilo (10^3)
kb · Kilobasen
K_D · Dissoziationskonstante im Gleichgewicht

L

L · Liter
λ · Wellenlänge

M

m · Meter
m · Milli (10^{-3})
M · Molarität [mol/L]
min · Minute
mol · Einheit der Stoffmenge (1 mol = 6 x 10^{23} Teilchen)
M · Molekulargewicht, engl. *molecular weight*
µ · Mikro (10^{-6})

N

n · Nano (10^{-9})

P

% · Prozent
p · Pico (10^{-12})
pH · *potentia hydrogenii*
pI · *pH(I)*, *pH*-Wert am isoelektrischen Punkt

R

rpm · Umdrehungen pro Minute,
engl. *revolutions per minute*
R_{free} · freier *R*-Faktor

S

s · Sekunde

T

T · Temperatur
t · Zeit
T_m · Schmelztemperatur,
engl. *melting temperature*
ΔT_m · Schmelztemperaturänderung,
engl. *thermal-shift*

U

U · Einheiten, engl. *units*

V

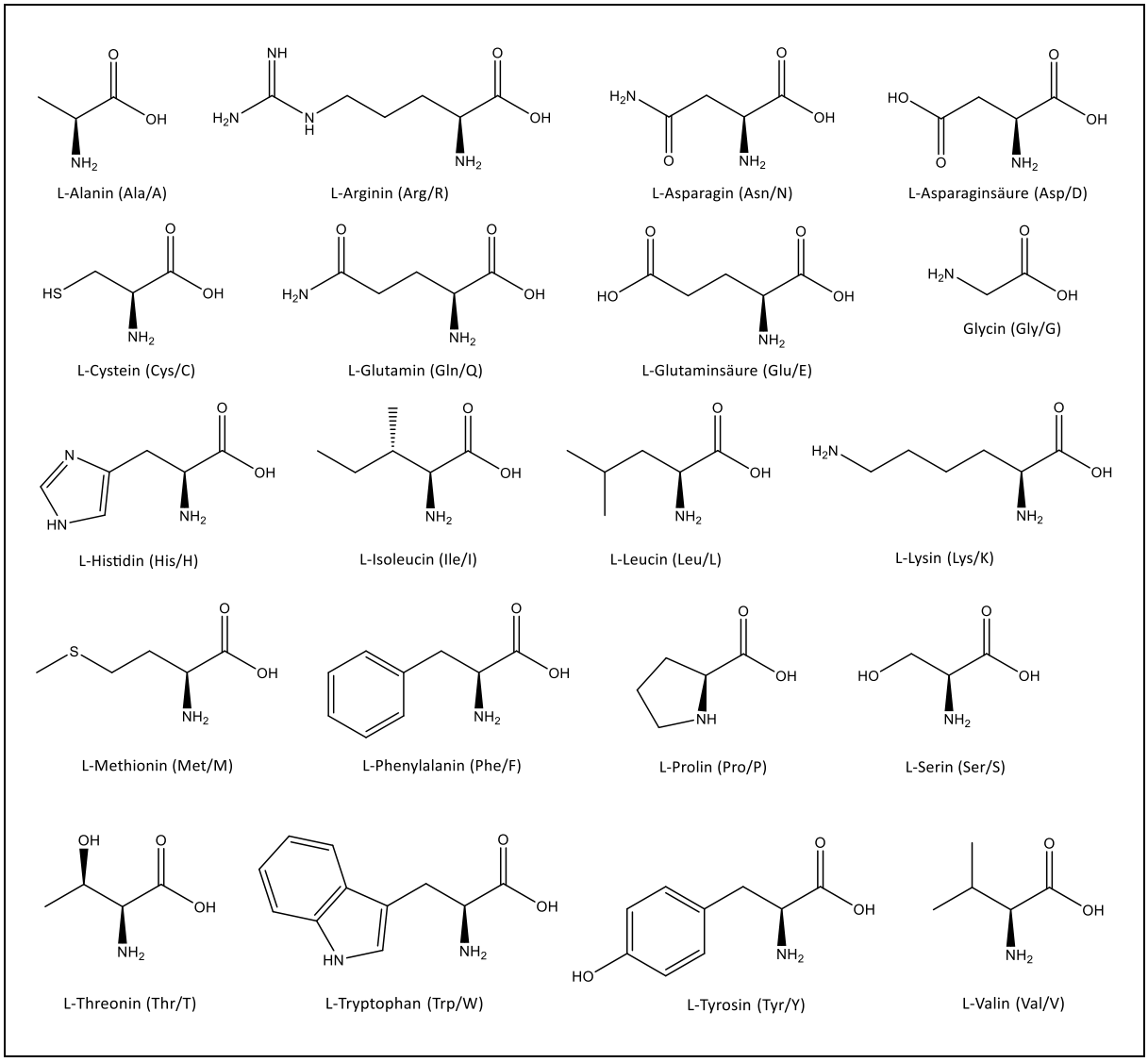
V · Volt
V · Volumen

W

w · Massenanteil

Proteinogene Aminosäuren

Diese Abbildung zeigt die Strukturformeln und Bezeichnungen (3-Buchstaben-, 1-Buchstaben-code) der 20 proteinogenen, ungeladenen Aminosäuren.



1. Einleitung

1.1. Shigellenruhr – eine vernachlässigte Tropenerkrankung

1.1.1. Shigellenruhr

Die Shigellenruhr, häufig auch als Shigellose, Bakterienruhr oder Shigellendysenterie bezeichnet, ist eine entzündliche Erkrankung des Dickdarms, ausgelöst durch eine bakterielle Infektion. Verursacher dieser Erkrankung ist eine Bakteriengattung namens *Shigella*. Ausreichend für eine Infektion sind bereits weniger als 100 *Shigella*-Bakterien. *Shigella*-Bakterien sind demnach sehr virulent. Folgende Symptome stehen bei dieser Erkrankung im Vordergrund: wässrige oder blutige Durchfälle, Fieber, Bauchkrämpfe und Appetitlosigkeit. Die Bakterien können sich dort am besten verbreiten, wo viele Menschen auf engem Raum zusammenleben und die sanitären Einrichtungen und Hygienepraktiken zu wünschen übriglassen. Die meisten Infektionen treten daher in Entwicklungsländern auf, besonders betroffen sind Afrika, Südasien und Zentralamerika (siehe **Abbildung 1.1-1**).[1] Es wird von etwa 165 Millionen Fällen und bis zu 1.1 Millionen Toten jährlich weltweit ausgegangen.[2] Häufig sind Kinder unter fünf Jahren schwer betroffen und überleben eine solche Infektion nicht. Übertragen wird die Infektion entweder durch direkten Kontakt mit einer infizierten Person oder über kontaminiertes Trinkwasser bzw. kontaminierte Nahrung.[1]

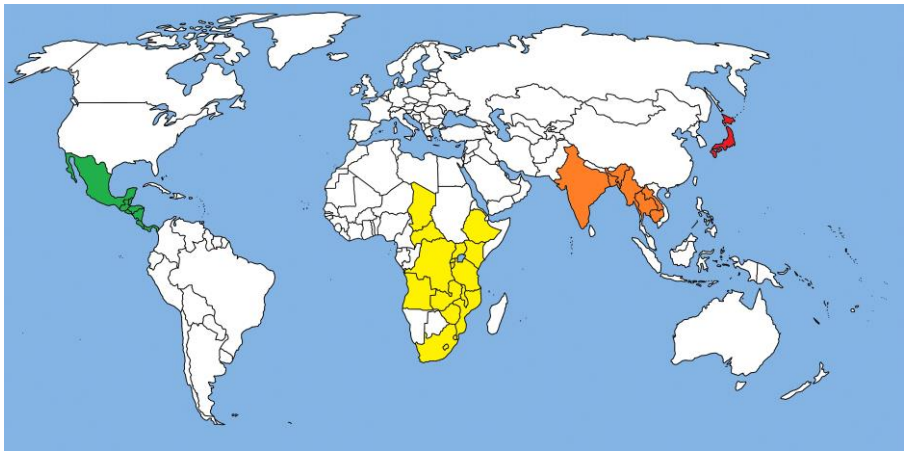


***Abbildung 1.1-1: Shigellenruhr-Pandemien**. Gebiete, in denen bereits* Shigella*-Pandemien ausgebrochen sind, sind farbig markiert. Die erste Pandemie, bei der das Bakterium auch zum ersten Mal isoliert wurde, trat in Japan in den 1890ern auf (rot markiert). Zentralamerika war um etwa 1970 von einer Pandemie betroffen (grün markiert). Weitere Pandemien traten zwischen 1975 und 1990 in Afrika und Asien auf (gelb und orange markiert) (Abbildung in Anlehnung an* LEVINE et al.[3]*).*

1.1.2. *Shigella*-Bakterien

Bei *Shigella*-Bakterien handelt es sich um eine Gattung gramnegativer unbeweglicher Stäbchenbakterien, die zur Familie der Enterobakterien gehören. Sie sind sehr eng mit *Escherichia coli* verwandt.[4] Entdeckt wurde diese Bakteriengattung von einem japanischen Wissenschaftler namens Kiyoshi Shiga.[5] Nach ihm wurde die Gattung letztendlich auch benannt. Es gibt vier verschiedene Spezies von *Shigella (S)*, die wiederum eine Reihe unterschiedlicher Serotypen bzw. Subserotypen besitzen: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*. Die letzten drei Spezies verursachen eher milde Erkrankungen. *S. flexneri* ist in Entwicklungsländern weit verbreitet. *S. dysenteriae* führt dagegen häufig zu schweren Verläufen.[6] Eine besondere Rolle spielt *S. dysenteriae* Typ 1. Dieser Typ produziert das sogenannte Shiga-Toxin, welches noch einmal auf andere Weise zum Fortschreiten der Infektion beiträgt. Beim Shiga-Toxin handelt es sich um ein zytotoxisches Protein, welches die eukaryotische Proteinbiosynthese hemmt. Dies erreicht das Protein über seine Fähigkeit, die N-glykosidische Bindung eines bestimmten Adenosins der ribosomalen RNA zu spalten.[6]

1.1.3. Mechanismen der Epithelzellinvasion

Ein kritischer Schritt in der Pathogenese der Shigellenruhr ist der Befall der Epithelzellen. Bekannt ist, dass die Epithelzellinvasion durch Shigellen zum überwiegenden Anteil von der basalen Seite aus erfolgt und nicht von der apikalen Seite der Zelle.[7] Wahrscheinlich stellen die dort auf der Oberfläche vorhandenen Glykolipide ein Hindernis dar. Daher muss die Infektion auf indirektem Wege erfolgen. Dies gelingt vor allem über M-Zellen (engl. *microfold cells*). M-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie nehmen über Endozytose auf der apikalen Seite der Epithelzellen Antigene (u.a. Bakterien bzw. Viren) auf und geben sie auf der basalen Seite der Epithelzellen durch Exozytose wieder ab. Dort werden die Antigene an Makrophagen weitergeleitet, die ebenfalls zu den Zellen des Immunsystems gehören und für die Zerstörung solcher Antigene zuständig sind.[8] M-Zellen können jedoch auch von Bakterien und Viren als Eindringmöglichkeit ausgenutzt werden. Auch Shigellen erhalten so den Zutritt. Allerdings werden diese nicht von Makrophagen zerstört. Im Gegenteil: Shigellen sind, wie andere Bakterien auch, in der Lage, durch bestimmte Mechanismen den Zelltod der Makrophagen einzuleiten.[9] Die absterbenden Makrophagen schütten Interleukin-1β aus. Auf der basalen Seite angelangt, sind die Bakterien fähig, mithilfe ihres Typ-III-Sekretionssystems in die Epithelzellen einzudringen. Von dort aus können sie auch in benachbarte Epithelzellen

gelangen und sich vermehren. **Abbildung 1.1-2** fasst dies graphisch zusammen. Die befallenen Epithelzellen setzen Interleukin-8 frei. Interleukin-1β und Interleukin-8 leiten Reaktionen ein, die den Bakterien helfen, den Befall der Epithelzellen weiter zu verstärken.[10,11]

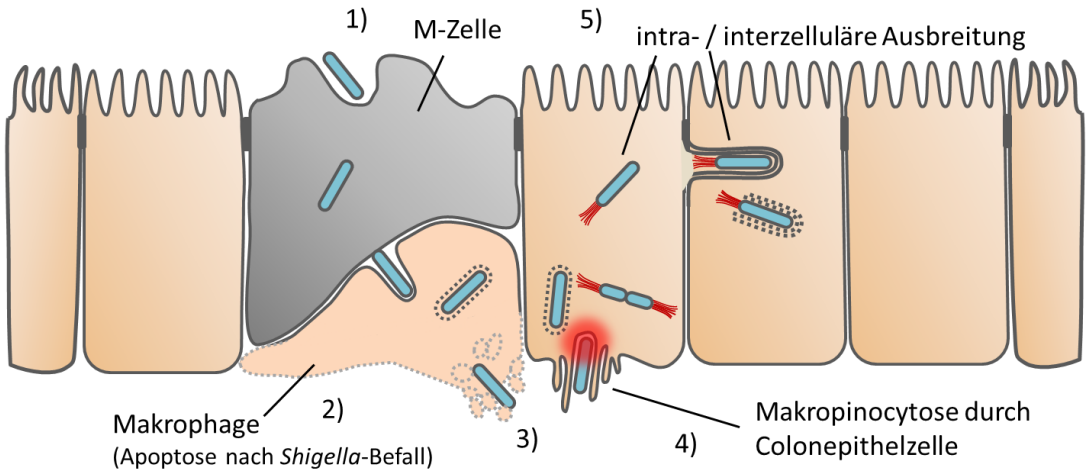


Abbildung 1.1-2: Epithelzellinvasion der Shigellen. *1) Eintritt über die M-Zellen. 2) Aufnahme durch Makrophagen und Einleitung der Apoptose. 3) Ankunft auf der basalen Seite. 4) Mittels T3SS sekretierter Effektorproteine induzierte Makropinocytose. 5) Intra- und interzelluläre Ausbreitung (Abbildung in Anlehnung an* SANSONETTI et al.[12]*).*

1.1.4. Typ-III-Sekretionssystem

Um Substanzen von einem Ort zum anderen zu transportieren, z.B. vom Zellinneren ins Zelläußere, benutzen Bakterien sogenannte Sekretionssysteme. Diese Sekretionssysteme sind Teil der bakteriellen Zellmembran. Es gibt verschiedene Arten von Sekretionssystemen. Ihr Mechanismus und ihr Aufbau hängen u.a. von der Art der Bakterien ab, denn gramnegative Bakterien besitzen im Gegensatz zu grampositiven Bakterien zwei Membranen. In gramnegativen Bakterien können sechs Sekretionssysteme unterschieden werden (Typ I-VI).[13] Darunter befindet sich das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS), welches sowohl die innere also auch die äußere bakterielle Zellmembran durchdringt und sogar den Zugang in eine eukaryotische Wirtszelle schaffen kann. Ein solches T3SS befindet sich u.a. in *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Pseudomonas* und *Shigella.*[14] Etwa 20-30 verschiedene Proteine sind am Aufbau des T3SS beteiligt, viele von ihnen mit einer Vielzahl von Kopien. Ein nicht unbedeutender Teil des T3SS befindet sich im extrazellulären Bereich und wird aufgrund seiner Erscheinungsform als Nadel bezeichnet. Tritt die Spitze der Nadel in Kontakt mit einer eukaryotischen Zelle, so wird die Sekretion von zwei Effektorproteinen in Gang gesetzt. Im Falle von *Shigella* sind das IpaB und IpaC (Ipa: *Invasion plasmid antigen*). Bevor die beiden Invasine IpaB und IpaC jedoch sekretiert werden, liegen sie beide im Cytoplasma als Komplex mit dem Chaperon IpgC

(Ipg: *Invasion plasmid gen*) vor. Die Aufgabe von IpgC ist es, IpaB und IpaC zu stabilisieren und eine verfrühte Interaktion derselbigen zu verhindern.[15] Die Komplexe, bestehend aus einem Chaperon und einem Invasin, treten mit T3SS-Proteinen in Wechselwirkung, die sich auf der cytoplasmatischen Seite befinden. Zu nennen ist hier Spa13 (Spa: *surface presentation of antigens protein*).[16] Spa13 leitet den IpgC-IpaB- bzw. IpgC-IpaC-Komplex an Spa47 weiter. Spa47 ist eine ATPase, die die nötige Energie für den Transport von Proteinen durch das T3SS in *Shigella* liefert. Es wird vermutet, dass alle Effektorproteine vor ihrer Sekretion in irgendeiner Weise mit Spa47 interagieren.[17] IpaB und IpaC werden letztendlich entfaltet durch den Tunnel bis an die Spitze der Nadel geleitet und sind dort mitverantwortlich für die Ausbildung einer Pore in der eukaryotischen Wirtszellmembran. So entsteht ein direkter Durchgang vom bakteriellen Cytoplasma bis ins Cytoplasma der Wirtszelle und weitere Effektoren können in die eukaryotische Zelle injiziert werden und Entzündungsprozesse in Gang setzen. In **Abbildung 1.1-3** ist ein vereinfachter Mechanismus des T3SS von *Shigella* dargestellt.

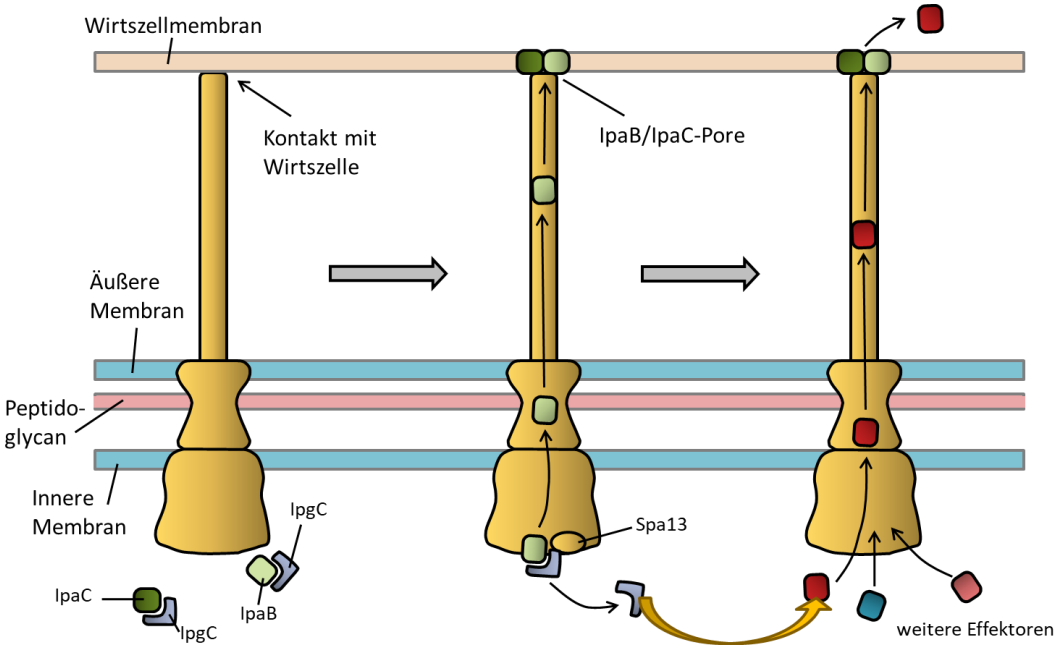


***Abbildung 1.1-3: Schematische Darstellung des T3SS von* Shigella**. *Anfangs ist das T3SS inaktiv. Bei Kontakt mit der Wirtszellmembran kommt es zur Sekretion der Invasine IpaB und IpaC, zwei Proteine, die mitverantwortlich sind für die Porenausbildung innerhalb der Wirtszellmembran. Zuvor liegen IpaB und IpaC jeweils komplexiert mit IpgC (einem Chaperon) im Cytoplasma vor. IpgC transferiert IpaB und IpaC zur cytoplasmatischen Seite des T3SS. Dort interagiert der Komplex mit Spa13, einem T3SS-Protein. Spa13 leitet die beiden Proteine weiter ins Innere des T3SS. Nach Porenbildung durch IpaB und IpaC können weitere Effektoren direkt aus dem Cytoplasma des Bakteriums in die Wirtszelle injiziert werden.*

Hat IpgC die Invasine IpaB und IpaC an Proteine des T3SS übergeben, so ist es frei für die Interaktion mit weiteren Proteinen. IpgC fungiert nämlich nicht nur als Chaperon, sondern auch als Co-Aktivator in Zusammenarbeit mit dem Transkriptionsfaktor MxiE (Mxi: *membrane expression of invasion plasmid antigens protein*). Zunächst ist MxiE durch einen Anti-Aktivator (OspD1, Osp: *outer surface protein*) inaktiviert und kann daher nicht an eine spezifische DNA-Sequenz binden. Ist freies IpgC im Cytosol vorhanden und bleibt das Translokon geöffnet, so tritt OspD1 ebenfalls den Weg durch das T3SS an. Nun kann IpgC mit MxiE interagieren und als Komplex mit MxiE an eine spezifische DNA-Sequenz binden, um so die RNA-Polymerase zu rekrutieren. Dadurch kommt es zur Transkription von Genen, die für weitere, „späte" Effektor-proteine kodieren (siehe **Abbildung 1.1-4**).[18,19]

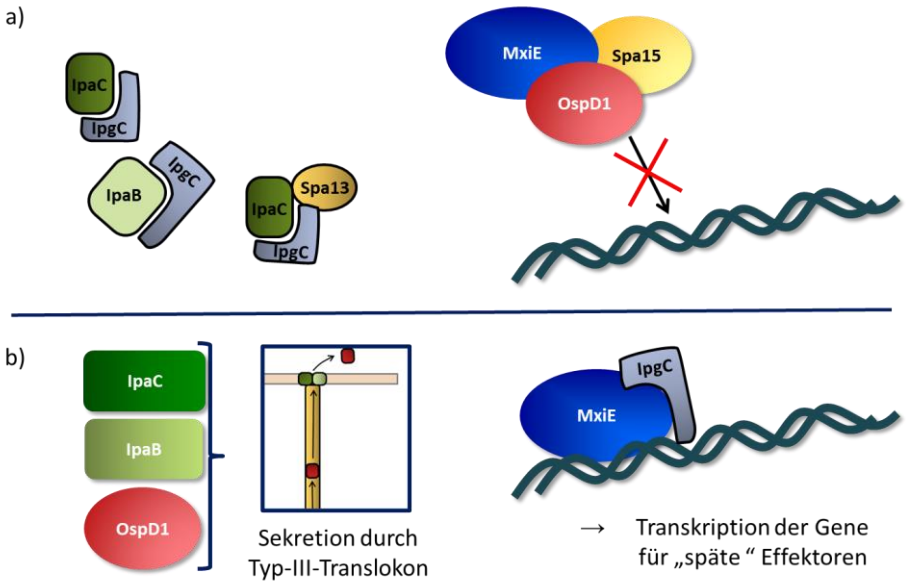


Abbildung 1.1-4: IpgC in der Funktion als Co-Aktivator für die Transkription der Gene weiterer Effektoren. *a) Das Translokon ist inaktiv. IpaB und IpaC liegen als Komplex mit IpgC vor. Durch die Wechselwirkung mit dem Anti-Co-Aktivator OspD1 und dem dazugehörigen Chaperon Spa15 kann MxiE nicht an die DNA binden. b) Das Translokon ist aktiv. IpaB und IpaC werden sekretiert. Ebenso konnte OspD1 in die Wirtszellmembran geschleust werden. IpgC ist frei und kann mit MxiE interagieren. MxiE ist zusammen mit IpgC in der Lage, an spezifische DNA-Sequenzen zu binden und somit die Transkription von Genen weiterer, „später" Effektoren freizugeben.*

1.1.5. Behandlung und Prävention

Bei akuten *Shigella*-Infektionen, beispielsweise beim Auftreten von blutigem Durchfall, wird die Gabe eines Antibiotikums empfohlen. In den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organization*, WHO) ist Ciprofloxacin seit vielen Jahren die erste Wahl bei der Behandlung einer solchen Infektion.[2] Dieses Antibiotikum gehört zur Gruppe der Fluorchinolone. Fluorchinolone hemmen sowohl die Topoisomerase II (auch Gyrase genannt) als auch die Topoisomerase IV. Beide spielen eine wichtige Rolle bei der DNA-Synthese.[20] Nur bei

Shigella-Stämmen, die eine Resistenz gegen Ciprofloxacin entwickelt haben, werden andere Antibiotika, wie z.B. Pivmecillinam, Ceftriaxon oder Azithromycin, angewandt. Viele Antibiotika, die anfangs zur Behandlung der Shigellenruhr verwendet wurden, kommen inzwischen aufgrund manifestierter Resistenzen nicht mehr in Frage. Darunter fallen u.a. die anfangs häufig eingesetzten Antibiotika Ampicillin, Chloramphenicol und Tetracyclin.[2]

Besser als die Behandlung von bereits bestehenden Infektionen ist sicherlich die Vermeidung von Infektionen durch präventive Maßnahmen. Es gibt bislang noch keine Impfung gegen eine Infektion mit *Shigella*-Bakterien. Somit können Infektionen momentan nur durch Hygienemaßnahmen vermieden werden. Dazu gehört in erster Linie gründliches Händewaschen. In Entwicklungsländern müsste demnach in erster Linie ein Bewusstsein für den richtigen Umgang mit Trinkwasser und Nahrungsmitteln geschaffen werden. Der Zugang zu sauberem Trinkwasser müsste gewährleistet werden. Auch der Transport und das Lagern von Trinkwasser müsste auf eine Weise erfolgen, dass Kontaminationen ausgeschlossen werden. Bei der Zubereitung von Nahrung müssten ebenfalls Regeln befolgt werden, wie z.B. die Regel, dass rohe Nahrungsmittel vor dem Verzehr gekocht werden sollten. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die korrekte Entsorgung menschlicher Ausscheidungen.[1]

1.1.6. Wie entstehen Antibiotikaresistenzen?

Schon seit einigen Jahren kommt es immer häufiger zur Ausbildung von Resistenzen gegen gebräuchliche Antibiotika. Aber wie schaffen es Bakterien, der Wirkung von Antibiotika zu entgehen? Mittlerweile sind viele, jedoch immer noch nicht alle Mechanismen aufgeklärt. Eine Möglichkeit, die Bakterien haben, ist dafür zu sorgen, dass eine geringere Menge an Antibiotikum seinen Wirkort erreicht. Das gelingt den Bakterien entweder durch eine reduzierte Durchlässigkeit der Zellmembran oder durch einen erhöhten Abtransport mithilfe sogenannter Efflux-Pumpen (heute auch Membran-ATPasen genannt) aus der Zelle heraus. Hierbei handelt es sich um einen unspezifischen Resistenzmechanismus, da dieser nicht von der Art des Antibiotikums abhängt. Eine reduzierte Durchlässigkeit kann beispielsweise durch eine Herabregulation unspezifischer Transmembranproteine bzw. durch einen Austausch gegen spezifischere Membranproteine erreicht werden. Ein erhöhter Abtransport aus der Zelle heraus gelingt z.B. durch Überexpression der Gene, die für Efflux-Pumpen kodieren.

Resistenzen können zudem durch eine Veränderung des *Targets* entstehen. Dies geschieht u.a. durch Punktmutationen oder Hinzufügen chemischer Gruppen (z.B. Methylgruppen). So kann das Antibiotikum nicht mehr effizient binden, die eigentliche Funktion des *Targets* bleibt dabei jedoch erhalten. Auch eine Überproduktion des *Targets* kann zur Ausbildung einer Resistenz führen. Das Antibiotikum kann zwar binden, allerdings bleiben genügend *Target*-Moleküle unbeeinflusst, sodass diese weiterhin ihrer Funktion nachgehen können und somit dafür sorgen, dass die Zelle überlebt.

Neben der Veränderung des *Targets* kann allerdings auch die Veränderung des Antibiotikums zur Resistenzentwicklung führen. Eine Möglichkeit ist die Inaktivierung des Antibiotikums mittels Hydrolyse. Daneben gibt es diverse Enzymklassen, die eine Veränderung des Antibiotikums durch Übertragung von z.B. Phosphor- oder Acylgruppen herbeiführen können. Durch diese hinzugefügten Gruppen ist dann die Bindung des Antibiotikums sterisch gehindert.[21,22]

1.1.7. Wie weit ist die Impfstoffforschung?

Bislang ist noch kein Impfstoff gegen *Shigella*-Bakterien zugelassen. Frühe Studien haben allerdings bereits gezeigt, dass ein Schutz vor einer solchen Infektion durch eine Impfung möglich ist.[23–25]. Was aber macht die Entwicklung eines effizienten Impfstoffs so schwierig? Es sind die vier verschiedenen Spezies mit insgesamt knapp 50 verschiedenen Serotypen, die eine umfassende Immunisierung nahezu unmöglich machen. Ein Impfstoff müsste gleichzeitig vor einer Infektion möglichst vieler Serotypen schützen oder zumindest vor einer Infektion jener Serotypen, die am meisten verbreitet sind bzw. von denen die größte Gefahr ausgeht. Studien zufolge sind das die Serotypen *S. flexneri* 2a, 3a und 6 und *S. sonnei.*[26]

Viele zurzeit in der Entwicklung befindliche Impfstoffe zur Bekämpfung der Shigellenruhr konzentrieren sich auf O-spezifische Polysaccharide (O-Antigene). Diese bestehen aus vielen Oligosaccharid-Einheiten (O-Einheiten) und sind die einzigen Antigene von *Shigella.* Sie sind Bestandteil der Lipopolysaccharide (LPS) auf der äußeren Zellmembran. Ihre Struktur ist sehr variabel und unterscheidet sich je nach Serotyp deutlich.[27]

Ein Bereich der Impfstoffforschung beschäftigt sich mit der Entwicklung eines Impfstoffs, der auf abgeschwächten, lebenden Zellen beruht. Diese sorgen für eine Immunantwort, lösen jedoch keine Erkrankung aus. Die Abschwächung lebender Zellen wird beispielsweise durch den Einsatz mutierter Varianten erzielt. Hier soll die Studie von KOTLOFF *et al*.[28] und die Studie

von ORR *et al*.[29] Erwähnung finden. Dort kommen mutierte Varianten zum Einsatz, deren Fähigkeit, sich fortzubewegen bzw. zu vermehren, vermindert ist.[26]

Daneben gibt es Impfstoffkandidaten, die auf einer anderen Wirkungsweise beruhen und als Konjugatimpfstoffe bezeichnet werden. Diese bestehen meist aus einem Antigen (Polysaccharid) und einem Protein, das als Trägermolekül fungiert. Die Kopplung des Antigens an ein Trägermolekül hat eine verstärkte Immunantwort zur Folge. Heute ist bekannt, dass ein Antigen alleine nicht in der Lage ist, eine Thymus- (T-) zellabhängige Immunantwort hervorzurufen. Dies ist aber gerade dann erforderlich, wenn Kleinkinder durch eine Impfung geschützt werden sollen.[30] Auch einige potentielle Konjugatimpfstoffe befinden sich bereits in klinischen Studien der Phase I und II, wie z.B. das synthetisch hergestellte Glykokonjugat vom Institut *Pasteur* in Paris[31] und das von der Firma LIMMATECH BIOLOGICS AG in der Schweiz rekombinant hergestellte Glykokonjugat.[32]

Neben den bekannten Methoden der Impfstoffherstellung gibt es weitere Ansätze, die bei der Entwicklung eines Impfstoffes zum Schutz vor *Shigella*-Infektionen verfolgt werden. Zum einen gibt es Impfstoffkandidaten, bei denen Serotyp-spezifische und konservierte Antigene von *Shigella* kombiniert werden.[26] Diesen Ansatz verfolgt z.B. das *Walter Reed Army Institute of Research* in den Vereinigten Staaten mit ihrem Impfstoffkandidaten *Invaplex*. Er besteht aus Lipopolysacchariden und den Proteinen IpaB und IpaC.[33,34]. Zum anderen wird an der Entwicklung von Impfstoffen gearbeitet, die auf äußeren Membranpartikeln aus gentechnisch veränderten gramnegativen Bakterien (engl. *generalized modules for membrane antigens*, GMMA) basieren. Diese Art von Impfstoff besteht aus Lipiden und Proteinen der äußeren Membran, aber auch aus löslichen Komponenten des Periplasmas und stellt somit ein aus mehreren Komponenten bestehendes Vakzin dar. Am Beispiel von *S. sonnei* wurde ein solcher Impfstoff bereits in klinischen Studien getestet und zeigt eine hohe Immunogenität.[35]

1.2. IpgC – Klasse-II-Chaperon

1.2.1. Tertiärstruktur

IpgC ist ein Klasse-II-Chaperon, welches im bakteriellen Cytosol vorliegt. Es besitzt mit nur 18 kDa ein sehr geringes Molekulargewicht. Wie andere Chaperone dieser Art hat IpgC einen sehr niedrigen isoelektrischen Punkt (*pI*: 4.6, mit *Expasy*[36] ermittelt). Die dreidimensionale Struktur von IpgC wurde erstmals im Jahr 2009 von LUNELLI *et al*.[37] mittels Röntgenkristallographie bestimmt. IpgC besitzt acht *α*-Helices. Sieben der acht *α*-Helices sind so angeordnet, dass mehrere Tetratricopeptid-Wiederholungen (engl. *tetratricopeptide repeats*, TPR) entstehen. Bei diesem Strukturmotiv handelt es sich um zwei antiparallele *α*-Helices. Durch die Wiederholung von mindestens drei solcher Strukturmotive kommt es zur Ausbildung einer rechtshändigen Superhelix. So entsteht eine konkave und eine konvexe Seite. Die konkave Seite spielt eine entscheidende Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen, da sie eine hervorragende Interaktionsfläche für eine *α*-Helix eines Interaktionspartners darstellt.[38] Die konvexe Seite hingegen nimmt eine entscheidende Rolle bei der Dimerisierung ein.[39] Der Teil des Proteins, der an der Ausbildung der Superhelix beteiligt ist, ist relativ starr. Darüber hinaus besitzt IpgC einen recht flexiblen Teil bestehend aus einer langen Schleife und einer weiteren *α*-Helix (*α*-Helix 1). In der von LUNELLI *et al.* bestimmten IpgC-Struktur spielt diese *α*-Helix eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung einer Dimerstruktur.[37] Die dreidimensionale Struktur eines IpgC-Monomers ist in **Abbildung 1.2-1** dargestellt.

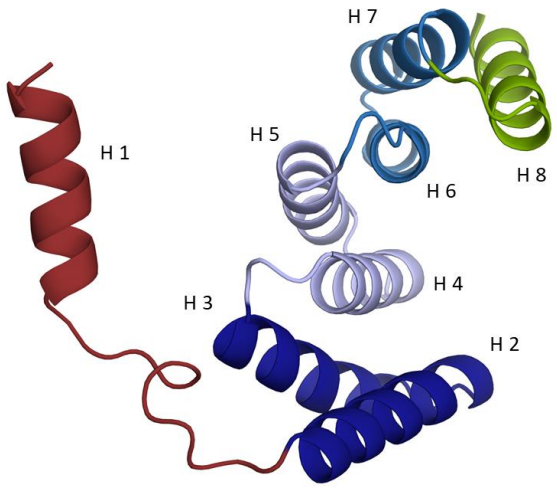


Abbildung 1.2-1: Dreidimensionale Struktur des IpgC-Monomers. *Das Protein ist als Bändermodell dargestellt. Die drei TPR-Motive sind in unterschiedlichen Blautönen voneinander abgehoben. Die α-Helix, die den Beginn eines vierten TPR-Motivs darstellt (α-Helix 8 (H8)), ist in Grün gezeigt. Der flexible Bereich des Proteins, bestehend aus einer langen Schleife und α-Helix 1 (H1), ist in Dunkelrot dargestellt. Diese Abbildung wurde mithilfe der Struktur mit dem PDB-Code 3gyz*[37] *erzeugt.*

1.2.2. Komplexstruktur mit dem Bindungsepitop von IpaB

Bislang ist nur eine Komplexstruktur von IpgC mit einem seiner Interaktionspartner bekannt. Dabei handelt es sich um die Struktur von IpgC mit dem Bindungsepitop des Invasins IpaB. Diese Struktur ist ebenfalls von LUNELLI *et al*.[37] bestimmt worden. Zusätzlich existiert eine zweite Struktur dieses Komplexes. LOKAREDDY *et al*.[40] konnten ebenfalls die Komplexstruktur von IpgC mit dem Bindungsepitop von IpaB bestimmen. Im Grunde sind sich die Strukturen sehr ähnlich. Der einzige Unterschied besteht darin, dass LUNELLI *et al*. ein 22 Aminosäuren langes Peptid ($IpaB^{51-72}$) verwendet haben, LOKAREDDY *et al*. dagegen haben mit $IpaB^{16-72}$ einen viel längeren Teil des IpaB-Proteins für die Kokristallisation eingesetzt. Dies war darin begründet, dass LOKAREDDY *et al*. eine zweite Chaperon-Bindedomäne (CBD) von IpaB ermitteln konnten, die sich im Bereich der Aminosäuren 15-45 befindet. Somit waren in dem Teil, den LOKAREDDY *et al*. zur Kristallisation nutzten, beide CBDs enthalten. Durch die Verwendung beider CBDs kam es zu einer Änderung des Verhältnisses von IpgC und IpaB. Während LUNELLI *et al*. mit ihrer Struktur ein 1:1-Verhältnis beobachten konnten (an jeder Proteinkette des IpgC-Dimers hatte jeweils ein $IpaB^{51-72}$ gebunden), konnten LOKAREDDY *et al*. feststellen, dass pro IpgC-Dimer nur ein $IpaB^{16-72}$ gebunden hat. LOKAREDDY *et al*. begründeten dies so, dass die CBD 1 zwar nicht in der Elektronendichte zu erkennen sei, seine Präsenz aber wahrscheinlich die Interaktion eines weiteren $IpaB^{16-72}$-Moleküls verhindert hatte. In **Abbildung 1.2-2** ist zu erkennen, in welcher Art und Weise IpaB mit IpgC interagiert.

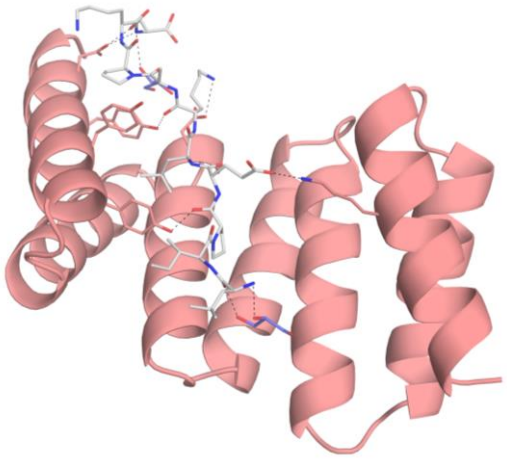


Abbildung 1.2-2: Komplexstruktur von IpgC mit der CBD 1 von IpaB. *Das Protein ist als Bändermodell in Rosa dargestellt. Zur besseren Übersicht sind nur die α-Helices 2-8 gezeigt. Die Aminosäureseitenketten von Asp37, Tyr40, Tyr44, Tyr47, Asp71 und Lys142 sind als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome dieser Aminosäuren sind rosa. Das IpaB-Peptid ist ebenfalls als Stäbchenmodell dargestellt. C-Atome des IpaB-Peptids sind grau. Auch Glycerolmoleküle sind als Stäbchenmodelle gezeigt, die entsprechenden C-Atome sind lila. O-Atome sind rot und N-Atome blau. Zwischen IpaB-Peptid und Protein bzw. Glycerolmolekülen ausgebildete H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt. Diese Abbildung wurde mithilfe der Struktur mit dem PDB-Code 3gz1[37] angefertigt.*

Das bei LUNELLI *et al*. zur Kristallisation verwendete IpaB-Peptid hatte auf der konkaven Seite der durch TPR-Domänen ausgebildeten Superhelix gebunden und geht dort vermehrt über seine Hauptkette H-Brücken mit dem Protein ein.[37] In der Struktur von LOKAREDDY *et al.* bindet das IpaB-Peptid auf sehr ähnliche Art und Weise.[40]

1.3. Proteinkristallographie

1.3.1. Vom Protein in Lösung zur dreidimensionalen Proteinstruktur

Die ersten Proteinkristalle konnten mehr oder weniger durch Zufall vor etwa 150 Jahren beobachtet werden. Das erste Protein, dessen Struktur mithilfe der Röntgenkristallographie bestimmt werden konnte, war Myoglobin.[41] Mittlerweile ist die Proteinkristallographie zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen nicht mehr wegzudenken. Die erste Bedingung für eine erfolgreiche Kristallisation eines Proteins ist die hohe Reinheit der Proteincharge. Je reiner das Protein (auch konformative Reinheit erforderlich), desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, optimale Kristalle zu erhalten. Zudem muss eine geeignete Lösungsmittelzusammensetzung gefunden werden, um das Protein in den kristallinen Zustand zu überführen. Die Suche nach einer solchen Lösung ist allerdings nicht einfach und häufig sehr zeitintensiv. Hier muss nach dem Motto ‚*trial and error*' verfahren werden. Je mehr Bedingungen getestet werden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine optimale Bedingung gefunden wird. Heutzutage kann dieser Arbeitsschritt, besonders in der Anfangsphase, von Pipettierrobotern übernommen werden. Eine Optimierung vieler einzelner Parameter ist erforderlich, um letztendlich optimale Kristalle zu erhalten. Dazu gehören: Temperatur, Salzgehalt, *pH*-Wert und vieles mehr. Weiterhin muss eine Übersättigung der Lösung erzielt werden. Erst dann kommt es zur Ausbildung von Kristallisationskeimen und schließlich zum Kristallwachstum. Wie aber kommt es zu einer Übersättigung der Lösung? Dies kann mithilfe unterschiedlicher Methoden erreicht werden, beispielsweise durch Entzug von Wassermolekülen, die das Protein in Lösung halten. Eine Methode ist die sogenannte Dampfdiffusion. Dabei kommt es durch Diffusion zum Ausgleich eines anfänglich bestehenden Konzentrationsgradienten zwischen Proteintropfen und Reservoirlösung und letztlich zur Übersättigung der Proteinlösung. Die Voraussetzungen für eine hoffentlich erfolgreiche Kristallisation sind damit geschaffen.[42]

1.3.2. Wenn Röntgenstrahlung auf Kristalle trifft

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur der Proteinmoleküle im Kristallgitter erfolgt mithilfe von Röntgenstrahlung. Trifft Röntgenstrahlung auf einen Kristall, so wird diese abgelenkt. Ursächlich dafür ist die Wechselwirkung der Röntgenstrahlung mit den Elektronen der Atome im Kristall. Die Elektronen werden angeregt und geben selbst wieder Strahlung in Form von Wellen ab. Da die Wellenlänge der eingesetzten Röntgenstrahlung und die Abstände im Kristallgitter eine vergleichbare Größenordnung besitzen, kommt es zu Interferenzerscheinungen. Das Phänomen der Röntgenbeugung an Kristallen geht auf MAX VON LAUE zurück, der diese Entdeckung bereits im Jahr 1912 machte.[43] Auf diesen Erkenntnissen aufbauend folgte ein Jahr später die Erkenntnis, dass mithilfe der Röntgenbeugung die Strukturaufklärung von Kristallen möglich ist. Dies gelang Vater und Sohn BRAGG. Mithilfe der Bragg-Gleichung, die beschreibt, unter welchen Bedingungen es zu konstruktiver Interferenz kommt, kann das auf einem Detektor entstandene Diffraktionsbild, bestehend aus vielen einzelnen Reflexen, die zusammen ein Beugungsmuster ergeben, erklärt werden.

$$\text{Bragg-Gleichung:} \qquad n\lambda = 2d \sin(\varphi)^{44}$$

(n: natürliche Zahl; λ: Wellenlänge der Röntgenstrahlung; d: Abstand zwischen parallelen Gitterebenen; φ: Winkel zwischen Röntgenstrahl und Gitterebene)

Um alle Informationen zu erhalten, die benötigt werden, um beispielsweise die Struktur eines Proteins bestimmen zu können, muss der Kristall aus verschiedenen Winkeln mit Röntgenstrahlung bestrahlt werden, da nur so alle Gitterebenen einmal die richtige Orientierung besitzen, um die Bedingungen für konstruktive Interferenz zu erfüllen. Erst die Summe mehrerer hundert Diffraktionsbilder führt letztendlich zu einem vollständigen Datensatz. Die sogenannte *Fourier*-Transformation, ein spezielles mathematisches Verfahren, hilft, aus den Beugungsbildern das Molekül in Form einer Elektronendichte-Karte zu erzeugen (siehe **Abbildung 1.3-1**). Allerdings gibt es notwendige Informationen, die dem Beugungsbild nicht entnommen werden können. Die Intensität der Reflexe und somit die Amplitude bzw. die Anzahl der Elektronen einer Gitterebene lässt sich bestimmen, die Informationen über die einzelnen Phasen gehen allerdings verloren. Dieses Problem wird als „Phasen-Problem“ bezeichnet. Die Information, die durch die fehlenden Phasen verloren geht, ist deutlich wichtiger als die Information, die aus der Intensität gewonnen wird. Es gibt daher verschiedene Verfahren, die fehlenden Phasen wiederzugewinnen. Ein Verfahren ist der sogenannte

„molekulare Ersatz“ (engl. *molecular replacement*, MR). Dieses Verfahren findet Anwendung, wenn die Struktur des Proteins bzw. die Struktur eines ähnlichen Proteins bereits bekannt ist. Die Sequenzidentität sollte mindestens 25 % betragen.[45] Durch Lösen der Rotations- und Translationsfunktion mithilfe eines geeigneten Startmodells können erste Phasen für die neue Struktur erhalten werden. Ein weiteres Verfahren ist die „anomale Dispersion“. Es wird zwischen anomaler Dispersion unter Verwendung verschiedener Wellenlängen (engl. *multiple-wavelength anomalous dispersion*, MAD) und anomaler Dispersion unter Verwendung einer einzigen Wellenlänge (engl. *single-wavelength anomalous dispersion*, SAD) unterschieden. Im Grunde geht es darum, dass die Phasenverschiebung von der Wellenlänge der Röntgenstrahlung abhängig ist. Bei der anomalen Dispersion werden anomale Streuelemente benötigt. Diese können in der Proteinkristallographie durch Selenomethionin ins Protein eingefügt werden. Für anomale Streuer gilt das Friedelsche Gesetz nicht mehr, sodass durch die anomalen Differenzen die Position der anomalen Streuer berechnet werden kann und dadurch eine experimentelle Phasenbestimmung möglich ist.[45]

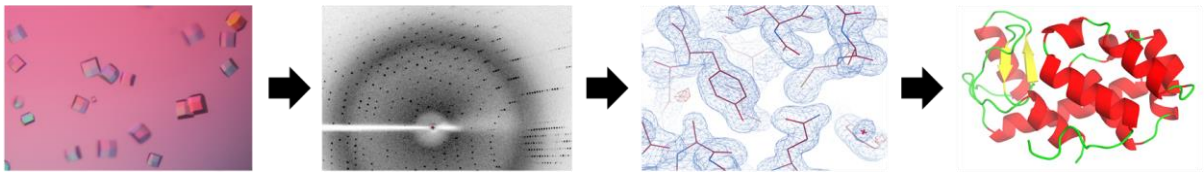


Abbildung 1.3-1: Der Weg vom Proteinkristall zur dreidimensionalen Struktur. *Proteinkristalle werden mit Röntgenstrahlung bestrahlt. Auf einem Detektor kann ein aus vielen Reflexen bestehendes Diffraktionsbild erhalten werden. Durch Drehung des Kristalls werden viele solcher Diffraktionsbilder erhalten. Mithilfe der* Fourier-*Transformation kann aus diesen Beugungsbildern eine Elektronendichte-Karte erstellt werden. Durch Anpassung des Modells an diese Elektronendichtekarte und Wiedergewinnung der Phasen kann am Ende die dreidimensionale Struktur des Proteins erhalten werden.*

Mit diesen Methoden gelingt die Phasenbestimmung allerdings nur näherungsweise. In einem iterativen Prozess muss die Phaseninformation Schritt für Schritt verbessert werden, die Struktur muss „verfeinert“ werden. Dazu wird das anfänglich verwendete Modell an die ermittelte Elektronendichte angepasst. Mit diesem verbesserten Modell wird erneut eine Elektronendichte-Karte erzeugt, mit leicht verbesserten Phasen. Die verbesserte Elektronendichte-Karte wird erneut verwendet, um das Modell anzupassen und so weiter. Der Weg, der beschritten werden muss, um eine Proteinstruktur zu lösen, ist in **Abbildung 1.3-1** noch einmal graphisch dargestellt.

1.3.3. Fehler im Kristallgitter – Verzwilligung

Proteinkristalle besitzen immer gewisse Unregelmäßigkeiten im Kristallgitter. Kein realer Kristall ist perfekt. Ein Kristall kann als Zusammensetzung vieler kleiner Kristalle angesehen werden, deren Ausrichtungen leicht gegeneinander verschoben sind, auch Mosaikstruktur genannt. Das Modell der Mosaikstruktur geht auf C. G. DARWIN zurück.[46] Die Mosaizität von Kristallen gibt Aufschluss darüber, wie stark die einzelnen kleinen Kristalle gegeneinander verschoben sind. Es gibt allerdings auch Unregelmäßigkeiten, die nur gelegentlich auftreten und zu enormen Schwierigkeiten führen können. Verzwilligung stellt ein solches Problem dar. Ein Kristall ist verzwillingt, wenn er aus mehreren Domänen besteht, die durch eine Symmetrieoperation, dem „Verzwilligungsgesetz“, ineinander überführt werden können. Das Verzwilligungsgesetz stellt dabei aber keine Symmetrieoperation der Punktgruppe des Kristalls dar.[47] Neben dem Verzwilligungsgesetz wird die Verzwilligung durch eine weitere Größe charakterisiert, dem „Verzwilligungsgrad“. Dieser macht Aussagen über das Verhältnis des relativen Volumens der einzelnen Domänen.[48] Das Problem, welches bei verzwillingten Kristallen auftritt, ist, dass überlagerte Diffraktionsbilder erzeugt werden. Diffraktionsbilder der einzelnen Domänen werden zeitgleich erfasst. Das kann entweder dazu führen, dass alle Reflexe oder nur ein Teil der Reflexe überlappen. So kann es vorkommen, dass sich starke und schwache Reflexe überlagern und die Intensitätsverteilung eines solchen Datensatzes stark von der Intensitätsverteilung eines normalen Datensatzes abweicht. Auch heute noch kommt es vor, dass Forschungsstudien beim Auftreten verzwillingter Kristalle zum Stillstand kommen, bis Kristalle erhalten werden, die nicht verzwillingt sind. Manchmal ist die Suche nach einer neuen Kristallisationsbedingung einfacher als die Auswertung der Daten verzwillingter Kristalle. Dank moderner Rechenprogramme ist die Auswertung verzwillingter Datensätze mittlerweile allerdings möglich. Oft werden aufgespaltene oder zerbrochene Kristalle ebenfalls als verzwillingt bezeichnet. Dies ist jedoch nicht korrekt. Kristallen kann nicht immer angesehen werden, ob sie verzwillingt sind oder nicht. Ein besserer Weg, um Verzwilligung festzustellen, ist die Analyse der Intensitätsstatistiken. Wenn die Intensitäten signifikant von den zu erwartenden Intensitäten für einen unverzwillingten Datensatz abweichen, ist eine Verzwilligung wahrscheinlich.[49]

1.4. Fragment-basiertes Wirkstoffdesign

Beim strukturbasierten Wirkstoffdesign geht es um die Entwicklung von Wirkstoffen basierend auf einer bereits bekannten 3D-Struktur des *Targets*. Dem gegenüber steht das ligandbasierte Wirkstoffdesign, welches zum Einsatz kommt, wenn die Struktur des *Targets* noch nicht bekannt ist. Das strukturbasierte Wirkstoffdesign wird auch als gezieltes, rationales Design bezeichnet.[50] Im Grunde geht es um das Auffinden von Molekülen, die in der Bindetasche des Zielproteins binden (siehe **Abbildung 1.4-1**). Diese werden im weiteren Verlauf optimiert, um eine möglichst hohe Affinität zu erzielen.

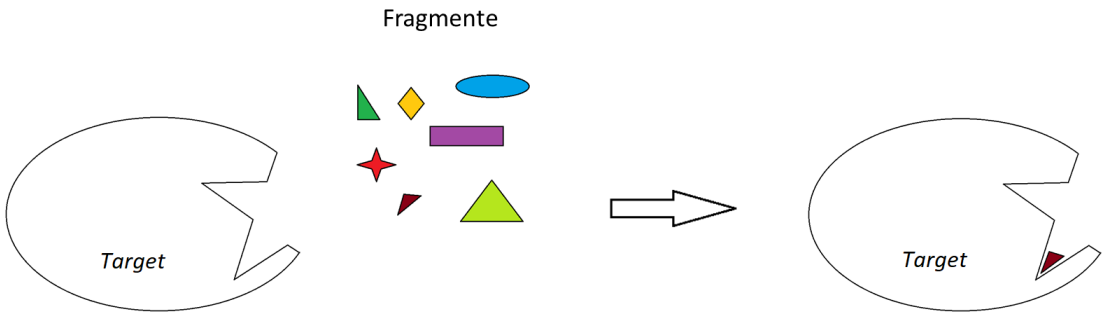


Abbildung 1.4-1: Fragment-basiertes Wirkstoffdesign. *Durch die Verwendung vieler, sehr kleiner Moleküle (Fragmente) werden jene Moleküle ermittelt, die optimale Interaktionen mit dem* Target *in einem Teilbereich der Bindetasche eingehen.*

Fragment-basiertes Wirkstoffdesign (engl. *fragment-based drug design,* FBDD) erfreut sich seit einigen Jahren großer Beliebtheit. Im Gegensatz zum Hochdurchsatz-*Screening* (engl. *high-throughput screening*, HTS) kommen hierbei Verbindungen mit einem deutlich geringeren Molekulargewicht zur Anwendung. Unter dem Begriff „Fragment“ werden meist Verbindungen verstanden, die ein Molekulargewicht kleiner als 300 Da aufweisen.[51] Ein Vorteil in der Verwendung kleinerer Verbindungen ist, dass passgenaue chemische Strukturen gefunden werden können, die optimale Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen. Die Oberfläche eines Proteins kann viel effizienter nach Wechselwirkungen abgesucht werden. Es kommt zu deutlich höheren *Hit*-Raten. Außerdem nimmt die Anzahl an möglichen Verbindungen mit zunehmender Größe der Verbindung zu. Somit sind Fragment-Bibliotheken (mehrere hundert Verbindungen) um einige Größenordnungen kleiner als Bibliotheken, die beim HTS zum Einsatz kommen (mehrere tausend Verbindungen).[52] Das hat eine deutliche Kostenreduktion zur Folge, zumal die kleinen Moleküle meist nicht synthetisiert werden müssen, sondern gekauft werden können. Aus diesem Grund ist FBDD auch für die akademische Forschung erschwinglich.[53] Die erzielten Fragment-*Hits* dienen als Startpunkt für die Entwicklung hochaffiner Verbindungen.

Den Anfang in FBDD machten SHUKER *et al*.[54] vor genau 25 Jahren. Sie entwickelten eine Kernspinresonanz- (engl. *nuclear magnetic resonance*-, NMR-) basierte Methode, mit deren Hilfe kleine organische Moleküle, die an Proteinen gebunden haben, identifiziert, optimiert und verknüpft werden können. Diese Methode ist auch bekannt unter dem Namen „SAR by NMR", wobei SAR für Strukturwirkungsbeziehung (engl. *structure-activity relationship*) steht. Da allerdings die NMR-Methode routinemäßig nur für kleine Biomoleküle mit einem Molekulargewicht kleiner 30 kDa geeignet ist, die zudem in ausreichender Menge (≥ 200 mg) zur Verfügung stehen müssen, kam es in den darauffolgenden Jahren zur Entwicklung weiterer Methoden. Aufgrund der kleinen Fragmente, die eine sehr geringe Affinität im Bereich von 0.1-100 mM aufweisen, mussten die zu entwickelnden Detektionsmethoden sehr sensitiv sein. Eine Methode, mit deren Hilfe die Identifizierung von Protein-Ligand-Interaktionen in der Vergangenheit bereits gelang, ist das *Thermal-Shift-Assay* (TSA).[55–57] Diese Methode wird in **Kapitel 1.7** ausführlich beschrieben. Der Vorteil dieser Methode ist die einfache, schnelle und ressourcensparende Handhabung.[58] Auch die native Massenspektrometrie (MS) stellt eine ausreichend sensitive Methode zur Identifizierung schwach affiner Liganden dar, wie es SWAYZE *et al*.[59] und OCKEY *et al*.[60] bereits in den Jahren 2002 und 2003 zeigen konnten. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nur sehr kleine Mengen an *Target* und Ligand benötigt werden und es keiner Markierung bedarf.[61] Bei einer anderen Methode, der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl. *surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR), muss das *Target* auf einem Sensor-Chip immobilisiert werden (es gibt allerdings auch den umgekehrten Fall, dass die zu untersuchenden Verbindungen immobilisiert werden). Durch die Interaktion einer Verbindung mit dem immobilisierten *Target* kommt es zu einer Veränderung des Brechungsindexes der Chip-Oberfläche. Dieser kann sehr genau bestimmt werden. Meist „nur" als sekundäre Methode verwendet, konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass auch SPR als *Pre-Screening*-Methode angewandt werden kann.[62,63] Auch diese Methode erfordert nur eine sehr geringe Menge an Protein, da der Chip mit dem immobilisierten Protein regeneriert werden kann. Die isothermale Titrationskalorimetrie (engl. *isothermal titration calorimetry*, ITC) ist eine Methode, die zur Bestimmung enthalpischer und entropischer Bindungsbeiträge angewandt wird und eher selten in Zusammenhang mit FBDD steht. Dass diese Methode jedoch als Ergänzung zu bereits etablierten *Screening*-Methoden dienen kann, zeigen LADBURY *et al*.[64] in ihrer Arbeit. Als letzte und noch relativ neue Methode auf diesem Gebiet sei die Mikroskalenthermophorese (engl. *microscale thermophoresis*, MST)

genannt. Hier kommt es bei Komplexbildung zu einer Veränderung der Bewegungseigenschaften des Moleküls. Durch die Fluoreszenzkopplung des Proteins und der Anwendung eines minimalen Temperaturgradienten können diese veränderten Eigenschaften erfasst werden. Auch MST wurde bereits im Zusammenhang mit FBDD angewandt. Mithilfe von MST sind nebenbei noch Aussagen über Effekte wie Proteinaggregation und Proteindenaturierung möglich.[65]

Alle genannten Methoden (NMR ausgenommen) haben den Nachteil, dass sie keine strukturellen Informationen über das Bindungsevent liefern. Früher oder später ist eine Methode notwendig, die diese Informationen liefert, spätestens wenn es um die *Hit*-Optimierung geht. Daher stellt die Proteinkristallographie neben der NMR eine gute *Pre-Screening*-Methode dar, da so die strukturellen Informationen von Anfang an zur Verfügung stehen. In der Anfangsphase des FBDD wurde die Kristallographie erst im späteren Verlauf des Wirkstoffdesigns eingesetzt, wo bereits mithilfe anderer Methoden vielversprechende *Hits* ausgewählt wurden. Diese Vorgehensweise birgt allerdings eine Gefahr. Zuvor durch andere Methoden ermittelte *Hits* können sich durch die Kristallographie als falsch positiv herausstellen oder falsch negative *Hits* werden erst gar nicht in die Wirkstoffentwicklung mit einbezogen. Mittlerweile ist die Proteinkristallographie auch als *Pre-Screening*-Methode bekannt.[66–69] Eine Voraussetzung muss jedoch gegeben sein. Es sollten genügend Kristalle mit ausreichendem Streuvermögen zur Verfügung stehen, ansonsten kann diese Methode sehr zeitintensiv und kostspielig werden. Es gibt auch Studien, die Ergebnisse unterschiedlicher *Screening*-Methoden miteinander vergleichen. Auffällig dabei ist, dass nur relativ wenige Fragmente, die mittels kristallographischen Fragment-*Screenings* gefunden wurden, auch von anderen *Screening*-Methoden als Binder identifiziert werden. Insgesamt ist die Anzahl an überlappenden *Hits* häufig enttäuschend gering.[70,71]

Mittlerweile haben es bereits mehr als 30 aus Fragment-basierten Studien hervorgegangene Wirkstoff-Kandidaten in die klinische Phase geschafft.[53] Der erste Arzneistoff, der aus einem Fragment-basierten Ansatz hervorging, war *Vemurafenib*. 2012 erhielt dieser Arzneistoff seine Zulassung in der Europäischen Union zur Behandlung von Hautkrebs.[72]

1.4.1. 96er Fragment-Bibliothek

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Fragment-Bibliothek wurde von der eigenen Arbeitsgruppe (AG KLEBE, Universität Marburg) in Kooperation mit der MX-Gruppe am Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB) (AG WEISS, *BESSY II*) entwickelt. Sie wurde das erste Mal von HASSAAN *et al.* näher beschrieben.[71] Zum überwiegenden Anteil besteht diese Bibliothek aus Fragmenten, die gleichzeitig auch Bestandteil einer größeren Bibliothek der Arbeitsgruppe KLEBE (361er Bibliothek) sind. Die 361er Bibliothek ist aus Fragmenten zusammengesetzt, die teilweise einer Erweiterung der *„Rule of Three"* entsprechen. Damit sollte der Frage nachgegangen werden, ob nicht auch solche Fragmente als Startpunkt zur Entwicklung von Leitstrukturen dienen können. Diese Frage konnte mit ja beantwortet werden, denn mehr als 50 % der im Falle der Aspartatprotease Endothiapepsin (EP) gefundenen *Hits* folgten nicht streng der *„Rule of Three"*.[73] Eine Auswahl dieser Fragment-*Hits* wurde in die 96er Fragment-Bibliothek übernommen. Damit besteht die 96er Fragment-Bibliothek zu einem Großteil aus Fragmenten, die an EP gebunden hatten. Diese Liganden besitzen demnach die Fähigkeit, an Proteine zu binden, was ein entscheidendes Kriterium bei der Entwicklung dieser Fragment-Bibliothek war. Hinzu kommen einige Fragmente aus der 96er Bibliothek der Arbeitsgruppe WEISS. Auch von diesen Verbindungen existierte bereits jeweils eine in der PDB deponierte Komplexstruktur. Die Bibliothek wurde durch fünf Naturstoffverbindungen der Firma ANALYTICON komplettiert.

Die in dieser Arbeit verwendete 96er Fragment-Bibliothek wurde bereits umfangreich validiert.[69,71] Dies erfolgte an acht unterschiedlichen *Targets* (Proteinkinase A (PKA), tRNA-Guanin Transglycosylase (TGT), Carboanhydrase II (CA II), Thrombin, 17-β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 14 (HSD-14), Thermolysin, Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase (FPPS) und Trypsin.[74]

Die 96er Fragment-Bibliothek ist mittlerweile kommerziell erhältlich bei der Firma JENA BIOSCIENCE unter dem Namen *„Frag Xtal Screen"*. Der *Screen* ist so konzipiert, dass das *Soaking* in möglichst wenigen Arbeitsschritten vollzogen werden kann.[75]

1.5. *In Silico-Docking*

1.5.1. Vom Fragment-*Hit* zum hochaffinen Liganden

Konnten mithilfe des Fragment-*Screenings Hits* an relevanten Stellen des Proteins identifiziert werden, so geht es im nächsten Schritt darum, diese *Hits* zu optimieren, um Verbindungen mit verbesserter Affinität zu erhalten (siehe **Abbildung 1.5-1**). Dies kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Der Fragment-*Hit* kann einmal durch Hinzufügen weiterer Gruppen und mit der strukturellen Information über die Bindetasche des Proteins vergrößert werden *(fragment growing)*. Sollten mehrere Fragment-*Hits* an unterschiedlichen Stellen innerhalb der Bindetasche gebunden haben, können auch zwei oder mehr *Hits* miteinander verlinkt werden, indem nach passenden chemischen Gruppen gesucht wird, die als Linker fungieren *(fragment linking)*. Überlagern sich die Fragment-*Hits* teilweise, so können die strukturellen Komponenten der einzelnen Verbindungen auch zusammengeführt werden *(fragment merging)*.[52]

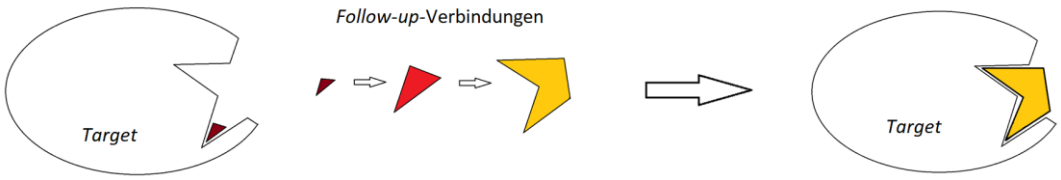


Abbildung 1.5-1: Vom Fragment*-Hit *zum hochaffinen Liganden. *Ausgangspunkt ist ein gebundenes Fragment in der Bindetasche des* Targets*. Dieses Fragment wird mithilfe computergestützter Methoden und Strukturbestimmung vergrößert, um letztendlich einen hochaffinen Liganden zu erhalten.*

Diese unterschiedlichen Vorgehensweisen können mithilfe computergestützter Verfahren durchgeführt werden. Mit ihnen ist es möglich, Bindungsmodi von Molekülen vorherzusagen. Dies ermöglicht eine effizientere Arbeitsweise, da nicht alle in Frage kommenden *Follow-up*-Verbindungen experimentell getestet werden müssen.

1.5.2. *SeeSAR* – eine Plattform für struktur- und ligandbasiertes molekulares Design

SeeSAR[76] ist eine Software-Plattform für struktur- und ligandbasiertes molekulares Design, entwickelt von der Firma BIOSOLVEIT. Der Vorteil dieser Plattform ist, dass sie gleich mehrere für das struktur- und ligandbasierte molekulare Design nützliche Werkzeuge vereinigt. Zwei u.a. in *SeeSAR* enthaltene *Tools* sind die *Docking*-Software *FlexX* und die *Scoring*-Funktion *HYDE*.

Mithilfe von *FlexX* ist eine Vorhersage von Protein-Ligand-Interaktionen möglich. BÖHM[77] bzw. KLEBE *et al.*[78] legten den Grundstein für das chemische Modell, welches *FlexX* zu Grunde liegt; *FlexX* selbst wurde von RAREY *et al.*[79] entwickelt. Das Programm umfasst drei grundlegende

Aspekte: die Flexibilität des Liganden, Protein-Ligand-Interaktionen und eine *Scoring*-Funktion. Der Ligand besitzt aufgrund einer Vielzahl möglicher Konformationen eine gewisse Flexibilität. Es geht zunächst darum, mögliche Konformationen des Liganden zu erzeugen und Konformationen mit geringer Energie auszuwählen, die beispielsweise häufig vorkommende Torsionswinkel aufweisen. Im zweiten Schritt geht es darum, den Liganden in der Bindetasche zu platzieren. Zuvor muss die Bindetasche definiert werden. Der Ligand wird zunächst in Bruchstücke („Fragmente“) zerlegt. Diese einzelnen Fragmente bzw. ein erstes Fragment wird in die unterschiedlichen Bereiche der Bindetasche platziert. Diese Positionen werden bewertet. Mit den besten Positionen wird weiterverfahren. Das Fragment wird nun mit einem zweiten Fragment verknüpft. Nach und nach wird der Ligand zusammengesetzt. Die Positionen des vollständigen Liganden mit den besten Bewertungen werden dem Nutzer anschließend präsentiert. Die Bewertung der unterschiedlichen Posen erfolgt mithilfe einer Abschätzung der freien Bindungsenergie des Protein-Ligand-Komplexes. Es ist aber auch ein sogenanntes Templat-basiertes *Docking* möglich. Ein Templat sollte mindestens fünf Nicht-Wasserstoffatome besitzen und ist in allen zu dockenden Molekülen enthalten. Es werden bevorzugt *Docking*-Posen erzeugt, in denen dieser Teil des Moleküls der Position des Templats in der Kristallstruktur entspricht.[79]

HYDE wurde 2008 von REULECKE *et al*.[80] entwickelt und wird seitdem regelmäßig optimiert.[81,82] Mithilfe von *HYDE* werden freie Bindungsenergien unter Einbeziehung von Wasserstoffbrückenbindungen *(**Hy**drogen bonding)* und Dehydratisierungsenthalpien *(**DE**hydration energies)* berechnet. Das Konzept dahinter sieht wie folgt aus: Protein und Ligand werden zunächst in ungebundenem Zustand betrachtet, beide liegen solvatisiert vor. Beim Bindungsevent muss der Ligand seine Hydrathülle abstreifen und die in der Bindetasche vorhandenen Wassermoleküle verdrängen. Dabei werden Wasserstoffbrücken zwischen H_2O-Molekülen und Ligand bzw. zwischen H_2O-Molekülen und Protein gebrochen. Dies wirkt sich ungünstig auf die Bindungsenergie aus. Wasserstoffbrücken, die zwischen Ligand und Protein ausgebildet werden, tragen dagegen günstig zur Bindung bei. Bei der Verdrängung von H_2O-Molekülen aus hydrophoben Bereichen kommt es ebenfalls zu einem positiven Beitrag zur Bindungsenergie (Entropiegewinn der H_2O-Moleküle). Dies wird auch als „hydrophober Effekt“ bezeichnet. In *SeeSAR* werden für jedes Atom des Liganden Beiträge zur freien Energie als farbige Koronas um die jeweiligen Atome ausgegeben.[81]

1.6. Peptid-*Microarray*

Peptid-*Microarrays* werden mittlerweile für sehr viele Fragestellungen genutzt, u.a. lassen sich damit Bindungsepitope bestimmen oder Ligand-Rezeptor-Interaktionen untersuchen. Auch die Substratspezifität von Enzymen kann so ermittelt werden.[83–85] Bei einem Peptid-*Microarray* sind zahlreiche Peptide (manchmal ganze, aus mehreren hundert bis tausend unterschiedlichen Peptidsequenzen bestehende Bibliotheken) auf einer festen Oberfläche fixiert. Das ermöglicht auch den Einsatz als HTS-Methode, weil in kurzer Zeit mit wenig Aufwand viele unterschiedliche Interaktionen untersucht werden können. In den meisten Fällen kommt heutzutage die *SPOT*-Synthese zum Einsatz. Durch die Verwendung Fluorenylmethoxycarbonyl- (Fmoc-) geschützter Aminosäuren erfolgt die Synthese der Peptide dabei zeitgleich auf einer Membran. Die Anfänge dieser Methode gehen auf FRANK *et al.*[86] zurück. Um die Interaktion der auf der Membran befindlichen Peptide mit einem Protein zu untersuchen, muss die Membran mit der Proteinlösung zusammengebracht werden. Nach einer Inkubationszeit und mehreren Waschschritten erfolgt der Nachweis der Peptid-Protein-Interaktion. Dies geschieht mithilfe geeigneter Antikörper. Es kann dabei ein Antikörper verwendet werden, der unmittelbar gegen das Protein gerichtet ist. Es kann aber auch ein Antikörper verwendet werden, der gegen ein am Protein befindliches *Tag* (z.B. His- oder Glutathion-S-Transferase- (GST-) *Tag*) gerichtet ist. Wenn diese Antikörper nicht bereits mit einem Reportermolekül gekoppelt sind, wird ein zweiter Antikörper benötigt, mit dessen Hilfe die Bindung sichtbar gemacht wird. Ein häufig verwendetes Reportermolekül ist die Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP). Im Zusammenspiel mit einem Substrat erfolgt der Nachweis hier über Chemilumineszenz.[85,87] Der schematische Ablauf eines Peptid-*Microarrays* ist in **Abbildung 1.6-1** dargestellt.

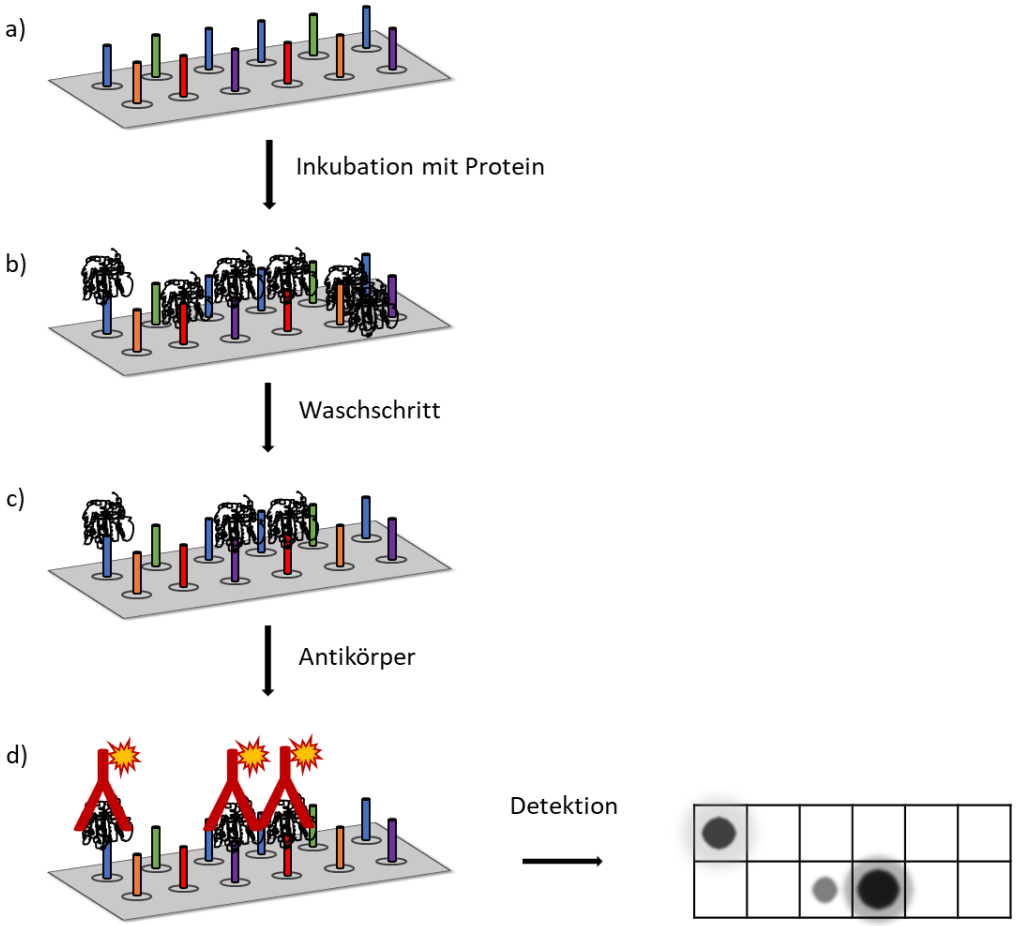


***Abbildung 1.6-1: Schematischer Ablauf eines Peptid*-Microarrays.** *a) Membran mit 12 unterschiedlichen Peptiden, dargestellt als längliche Stäbchen. b) Durch die Inkubation der Membran in Proteinlösung haben Proteinmoleküle auf der Membran gebunden. Allerdings befinden sich darunter auch unspezifisch gebundene Proteinmoleküle. c) Nach einem Waschschritt sind nur die Proteinmoleküle auf der Membran verblieben, die spezifische Wechselwirkungen mit den Peptiden auf der Membran eingehen. d) Mit Reportermolekülen gekoppelte Antikörpermoleküle haben spezifisch an vorhandenen Proteinmolekülen gebunden. Die Protein-Peptid-Interaktionen sind letztendlich als dunkle Spots auf der Membran zu erkennen (Abbildung in Anlehnung an KATZ* et al.[85]*).*

1.7. *Thermal-Shift-Assay*

Das *Thermal-Shift-Assay* (TSA), auch bekannt als *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF), ist eine Methode, mit deren Hilfe Aussagen über die Thermostabilität eines Proteins getroffen werden können. Sie wird häufig angewandt, um herauszufinden, wie eine Pufferzusammensetzung verändert werden muss, um das Protein maximal zu stabilisieren. Gerade im Zusammenhang mit der Proteinkristallographie hat sich gezeigt, dass der Erfolg der 3D-Strukturbestimmung maßgeblich von der Qualität der Proteinlösung abhängt.[88,89] TSA wird aber auch zur Bestimmung von Protein-Protein-, Protein-DNA- und Protein-Ligand-Interaktionen eingesetzt.[55,90,91]

Bei einem TSA-Experiment wird eine Proteinlösung mit einem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff (in den meisten Fällen *SYPRO Orange*) versetzt. Das Protein befindet sich in Lösung in einem Gleichgewicht zwischen korrekter Faltung und ungefaltetem Zustand. Im Optimalfall liegt das Gleichgewicht sehr weit auf der Seite des gefalteten Zustands. Im Laufe eines TSA-Experiments wird ein Temperaturgradient gefahren. Mit steigender Temperatur verlagert sich das Gleichgewicht auf die Seite des ungefalteten Zustands, bis das Protein schließlich vollständig denaturiert vorliegt. Der hydrophobe Farbstoff und das Protein interagieren anfangs kaum, da das Protein in gefaltetem Zustand an seiner Oberfläche überwiegend hydrophile Reste besitzt. Beginnt das Protein sich zu entfalten, werden hydrophobe Bereiche freigelegt und der Farbstoff kann mit dem Protein interagieren. Nur durch Interaktion mit hydrophoben Bereichen zeigt der Farbstoff eine Fluoreszenz. Daher steigt im Verlaufe des Experiments die Fluoreszenz an, bis sie durch Aggregation des Proteins an einem gewissen Punkt wieder sinkt. Durch diese Fluoreszenzänderung lässt sich die sogenannte Schmelztemperatur des Proteins bestimmen. Das ist der Punkt, an dem 50 % des Proteins gefaltet und 50 % ungefaltet vorliegen. Der Schmelzpunkt ist ein Maß für die Stabilität des Proteins und hängt von der Pufferzusammensetzung bzw. vorhandener Interaktionspartner ab, da diese das Protein stabilisieren können. Der Schmelzpunkt befindet sich am Wendepunkt der Schmelzkurve, bei der die Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen wird (siehe **Abbildung 1.7-1**). Durch Stabilisierung des Proteins wird der Schmelzpunkt in Richtung höherer Temperatur verschoben. Diese Änderung der Schmelztemperatur wird auch als *„thermal shift“* bezeichnet.[92]

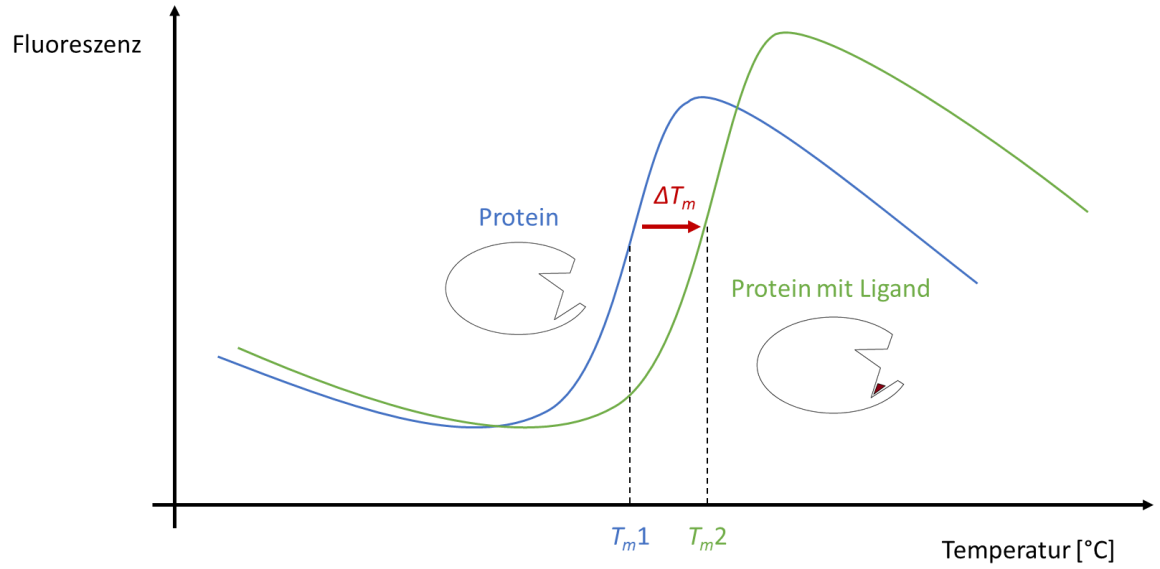


***Abbildung 1.7-1: Schmelzkurve eines typischen TSA-Experiments**. Auf der Abszisse ist die Temperatur in Grad Celsius (°C) aufgetragen, auf der Ordinate die Fluoreszenz. Zwei Schmelzkurven sind dargestellt. In Blau ist die Schmelzkurve eines Proteins mit der Schmelztemperatur* T_m1 *gezeigt. In Grün ist die Schmelzkurve des Proteins mit einem gebundenen Liganden dargestellt. Dieser Ligand stabilisiert das Protein, zu erkennen an der höheren Schmelztemperatur* T_m2*. In Rot ist die Verschiebung der Schmelztemperatur (engl.* thermal shift*,* ΔT_m*) gezeigt.*

2. Zielsetzung

Die Bakteriengattung *Shigella* ist verantwortlich für eine entzündliche Erkrankung des Dickdarms, u.a. bekannt unter dem Namen „Shigellenruhr“. Gerade in Entwicklungsländern, wo viele Menschen auf engem Raum zusammenleben und die sanitären Einrichtungen und Hygienepraktiken zu wünschen übriglassen, fordert diese Erkrankung zahlreiche Todesopfer. Einen Impfstoff gibt es bislang nicht und gegen die zur Anwendung kommenden Antibiotika entwickeln sich immer häufiger Resistenzen. Die Shigellenruhr gehört zu den vernachlässigten Tropenerkrankungen. Diese Arbeit steht im Zusammenhang mit dem LOEWE-Zentrum DRUID, welches vom Land Hessen gefördert wird und über 25 Arbeitsgruppen bzw. mehr als 30 Wissenschaftler und deren Expertise vereint, um zusammen die Entwicklung von Wirkstoffen, Vakzinen und Diagnostika gegen vernachlässigte Infektionskrankheiten voranzutreiben.

In dieser Arbeit soll das Klasse-II-Chaperon IpgC aus *Shigella flexneri* als *Target* zur Entwicklung von Wirkstoffen gegen die Bakterienruhr dienen. In erster Linie sollen mithilfe eines kristallographischen Fragment-*Screenings* erste Moleküle identifiziert werden, die an unterschiedlichen Stellen mit dem Protein interagieren. Dafür muss zunächst eine geeignete Kristallisationsbedingung gefunden werden, die Kristalle mit ausreichendem Streuvermögen entstehen lässt. Eine Optimierung der gefundenen Fragment-*Hits* hin zu größeren, potenteren Wirkstoff-Kandidaten soll anschließend unter Zuhilfenahme von *in silico-Docking* erfolgen. Zeitgleich sollen die Komplexstrukturen von IpgC mit den bereits in vorherigen Arbeiten ermittelten Bindungsepitopen aus IpaC und MxiE – zwei Interaktionspartner von IpgC – kristallographisch bestimmt werden. Dazu muss eine geeignete Kristallisationsbedingung für jeden Komplex gefunden werden. Zudem soll das Protein Spa13 – ein weiterer Interaktionspartner von IpgC und Teil des Typ-III-Sekretionssystems – in einen geeigneten Vektor kloniert, anschließend rekombinant produziert und gereinigt werden. Nach erfolgreicher Reinigung sollen Kristallisationsstudien zur Ermittlung der Komplexstruktur aus IpgC und Spa13 durchgeführt werden. Ziel ist es, herauszufinden, an welchen Stellen und mit welcher Geometrie IpaC, MxiE und Spa13 mit IpgC interagieren, um somit geeignete Wirkstoffe entwickeln zu können, welche die Protein-Protein-Interaktionen inhibieren und dadurch weitgehend zum Pathogenitätsverlust des Erregers führen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem Spa13

3.1.1. Verwendung des pGEX-6P-mod-Vektors mit GST-*Tag* und *PreScission*-Protease-Schnittstelle

Spa13 ist mit 152 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 17.9 kDa ein relativ kleines Protein. Da Spa13 ein wichtiger IpgC-Interaktionspartner ist, sollte es in dieser Arbeit produziert und gereinigt werden. Anschließend sollte es für Kokristallisationsversuche mit dem Chaperon IpgC zur Verfügung stehen, mit dem Ziel, die dreidimensionale Struktur des Komplexes zu bestimmen.

Zunächst sollte versucht werden, Spa13 mithilfe eines N-terminalen GST-*Tags* aufzureinigen. Daher kam der Vektor pGEX-6P-mod zum Einsatz. pGEX-6P-mod ist ein durch GRIMM[93] modifizierter Expressionsvektor, der ausgehend vom Vektor *pGEX-6P-1* (AMERSHAM PHARMACIA) unmittelbar nach der Erkennungssequenz für die *PreScission*-Protease eine *Nde*I-Schnittstelle besitzt, um so die Anzahl der zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus nach Abspaltung des GST-*Tags* zu reduzieren.

Das zuvor Codon-optimierte *spa13*-Gen wurde anfänglich von EUROFINS GENOMICS im Vektor pEX-A128 erhalten. Zuvor wurde als 5´-Restriktionsschnittstelle *Nde*I und als 3´-Restriktionsschnittstelle *Bam*HI gewählt. Das Plasmid wurde „pEX-A128-spa13“ genannt. Zur Herstellung des Expressionsplasmides wurde das *spa13*-Gen mittels PCR amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Bam*HI verdaut und durch Ligation in den Vektor pGEX-6P-mod eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde „pGEX-6P-mod-spa13“ genannt. In **Abbildung 3.1-1** ist die Klonierung schematisch dargestellt.

Nach erfolgter Genexpression in *BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL* und Zellaufschluss wurde nach Abtrennung der festen Zellbestandteile das Zelllysat auf eine Glutathion- (GSH-) Säule geladen. Durch das anschließende Beladen der Säule mit *PreScission*-Protease sollte das GST-*Tag* vom Zielprotein abgespalten werden, während sich das Zielprotein weiterhin auf der Säule befand. Es stellte sich jedoch heraus, dass zwar eine Überproduktion stattgefunden hatte, das Fusionsprotein aber nicht im Zelllysat, sondern im Zellpellet vorhanden war (nicht gezeigt).

Versuche, das Expressionsprotokoll zu optimieren, führten leider nicht zum gewünschten Erfolg.

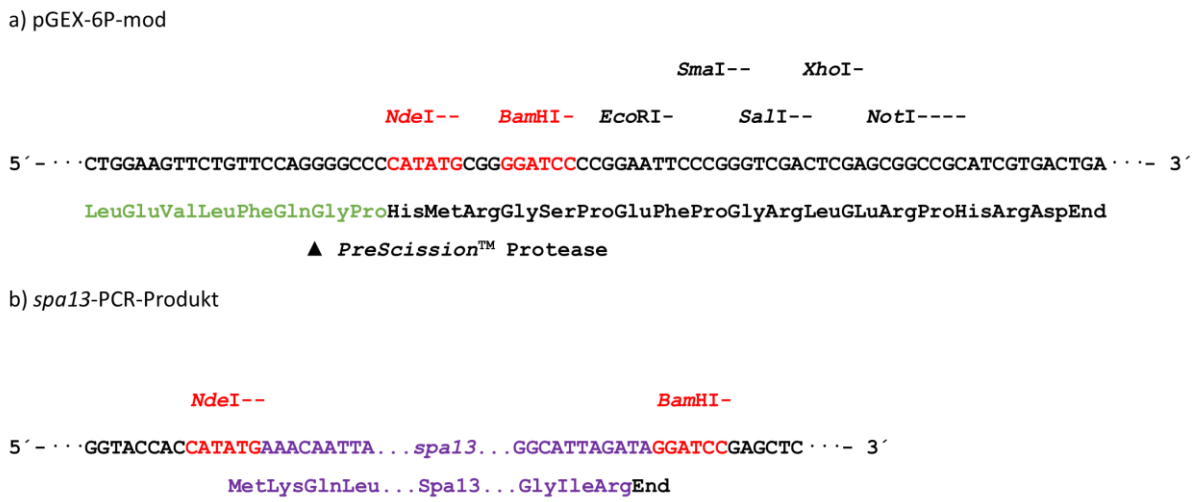


Abbildung 3.1-1: Schematische Darstellung der Klonierung von* spa13 *unter Verwendung des Expressionsvektors pGEX-6P-mod. *a)* Multiple Cloning Site *(MCS) des Expressionsplasmids pGEX-6P-mod. Grün hervorgehoben ist die Erkennungssequenz der* PreScission-*Protease. Rot hervorgehoben sind die Restriktionsschnittstellen für* Nde*I und* Bam*HI. b) PCR-Produkt von* spa13*. Rot hervorgehoben sind die Restriktionsschnittstellen für* Nde*I und* Bam*HI. Violett hervorgehoben ist die Sequenz des* spa13*-Gens bzw. die Sequenz des entsprechenden Proteins.*

3.1.2. Verwendung des pMALc5x-Vektors mit MBP-*Tag* und *PreScission*-Protease-Schnittstelle

Als nächstes wurde versucht, Spa13 als Fusionsprotein mit N-terminalem Maltosebindeprotein- (MBP-) *Tag* in löslicher Form zu erhalten. Das MBP-*Tag* ist bekannt dafür, dass es eine besonders positive Auswirkung auf die Löslichkeit eines Zielproteins hat.[94]

Für die Klonierung wurde das zuvor hergestellte Plasmid „pGEX-6P-mod-spa13“ verwendet und mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die Primer „pGEX-spa13-pMAL-for“ und „pGEX-spa13-pMAL-back“ verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang (siehe **Tabelle 5.1-6**) aufgeführt. Als 5´-Restriktionsschnittstelle wurde *Sac*I und als 3´-Restriktionsschnittstelle *Bam*HI gewählt. Dies führte dazu, dass die im pMAL-c5X-Vektor vorhandene Erkennungssequenz für Faktor Xa herausgeschnitten wurde (siehe **Abbildung 3.1-2**). Das *spa13*-Gen wurde allerdings zusammen mit der Erkennungssequenz für die *PreScission*-Protease aus dem pGEX-6P-mod-Vektor entnommen und durch Ligation in den *pMAL™-c5X*-Vektor (NEW ENGLAND BIOLABS) eingefügt.

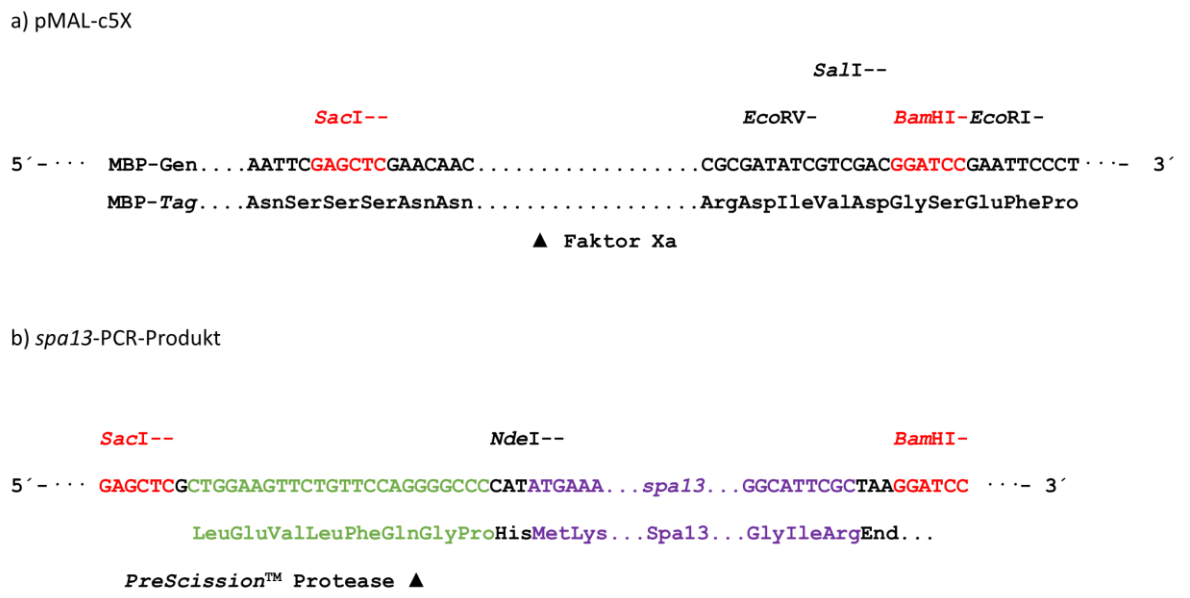


Abbildung 3.1-2: Schematische Darstellung der Klonierung von* spa13 *unter Verwendung des Expressionsvektors pMAL-c5X. *a) MCS des Expressionsplasmids pMAL-c5X. Rot hervorgehoben sind die Restriktionsschnittstellen für* SacI *und* BamHI*. b) PCR-Produkt von* spa13*. Rot hervorgehoben sind die Restriktionsschnittstellen für* SacI *und* BamHI*. Grün hervorgehoben ist die Erkennungssequenz der* PreScission*-Protease. Violett hervorgehoben ist die Sequenz des* spa13*-Gens bzw. die Sequenz des entsprechenden Proteins.*

Nach erfolgreicher Genexpression in *BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL* folgte der erste Aufreinigungsversuch. Zunächst sollte mithilfe einer Dextrin-Sepharose-Säule das Fusionsprotein affinitätschromatographisch über das vorhandene MBP-*Tag* gereinigt werden. Die Abspaltung des MBP-*Tags* sollte durch Zugabe der *PreScission*-Protease zusammen mit einem Pufferaustausch erfolgen. Eine reverse Dextrin-Sepharose-Säule sollte das MBP-*Tag* und eine reverse GSH-Säule die *PreScission*-Protease vom Zielprotein abtrennen. Die SDS-PAGE mit den Proben der entsprechenden Aufreinigung lässt erkennen, dass die Abspaltung des MBP-*Tags* vollständig stattgefunden hatte (siehe **Abbildung 3.1-3**). Das Fusionsprotein ist an Position 2 in Höhe der 55-kDa-Markerbande zu erkennen. Nach erfolgtem Schnitt (Position 5) ist diese Bande nicht mehr zu sehen, dafür sind zwei Banden in Höhe der 40-kDa-Markerbande zu erkennen und eine sehr schwache Bande in Höhe der 15-kDa-Markerbande. Die *PreScission*-Protease (46 kDa) und das abgeschnittene MBP-*Tag* (43 kDa) weisen eine ähnliche molare Masse auf und sind daher nur schwer voneinander zu unterscheiden. Anhand der SDS-PAGE wird deutlich, dass mithilfe der reversen GSH-Säule die *PreScission*-Protease abgetrennt werden konnte, da im Durchfluss (Position 7) die entsprechende Proteinbande für die *PreScission*-Protease fehlt. Das MBP-*Tag* war allerdings nach Passieren der reversen Dextrin-Sepharose-Säule und somit auch nach Passieren der reversen GSH-Säule noch vorhanden. Vermutlich konnte die im Dextrin-S-Elutionspuffer vorhandene Maltose durch Dialyse nicht vollständig

entfernt werden, sodass das MBP-*Tag* wahrscheinlich durch die gebundene Maltose blockiert war und somit nicht an die Dextrin-Sepharose-Säule binden konnte. Bereits nach Abspaltung des MBP-*Tags*, welche zusammen mit dem Pufferaustausch über Nacht erfolgte, konnte nur noch eine sehr schwache Proteinbande für Spa13 beobachtet werden. Der überwiegende Anteil des Zielproteins war ausgefallen (weißes Präzipitat).

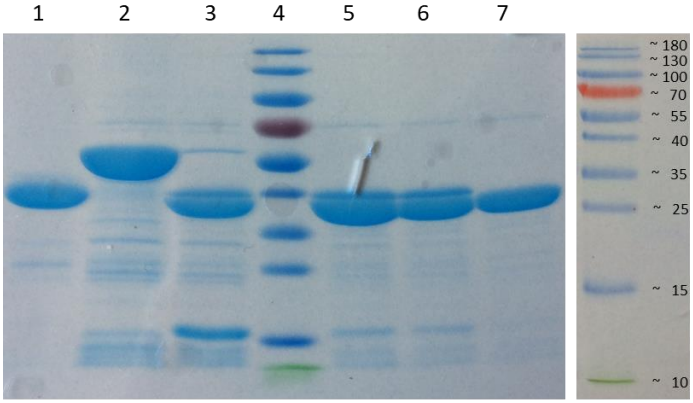


Abbildung 3.1-3: SDS-PAGE mit Proben der ersten Reinigung von Spa13. *Von links nach rechts: 1:* PreScission-*Protease; 2: Eluat der Dextrin-Sepharose-Säule; 3: Eluat der Dextrin-Sepharose-Säule mit zugesetzter* PreScission-*Protease; 4: Proteinmarker; 5: Probe nach vollständigem Schnitt mit* PreScission-*Protease (Inkubationszeit: 18 h); 6: Durchfluss der reversen Dextrin-Sepharose-Säule; 7: Durchfluss der reversen GSH-Säule. Rechts ist der Proteinmarker mit den molaren Massen für die Markerbanden in kDa dargestellt.*

Beim zweiten Aufreinigungsversuch kam nach Dextrin-Sepharose-Säule und Abspaltung des MBP-*Tags* eine Kationenaustauschersäule (*HiTrap™ SP HP 5 mL*-Säule, GE HEALTHCARE) zum Einsatz. Aufgrund des sehr hohen *pI*-Wertes von Spa13 (pI_{Spa13}: 9.9; mit *Expasy*[36] ermittelt) hätte eine Bindung des Proteins an eine Anionenaustauschersäule kaum erzielt werden können. Eine Anionenaustauschersäule hätte somit nur zur Abtrennung des MBP-*Tags* (pI_{MBP}: 3.95; mit *Expasy*[36] ermittelt) dienen können.

Im Sepharose-Bindepuffer (SP-Bindepuffer), mit dem die Kationenaustauschersäule konditioniert worden war, befanden sich zu Beginn – wie in der Anleitung der Säule empfohlen – 50 mM Natriumacetat *pH* 5.0, 25 mM NaCl und 3 mM Dithiothreitol (DTT). Der entsprechende Elutionspuffer unterschied sich nur in der Salzkonzentration (1 M NaCl). Es zeigte sich jedoch bereits während der Dialyse, dass das Fusionsprotein in diesem Puffer nicht stabil war. Das Fusionsprotein fiel aus. Die Aufreinigung wurde an dieser Stelle abgebrochen. In weiteren Aufreinigungsversuchen wurden SP-Bindepuffer mit unterschiedlichen *pH*-Werten getestet (50 mM MES *pH* 6.0; 50 mM Natriumphosphat pH 7.0; 50 mM HEPES *pH* 8.0 bzw. 50 mM BICIN

pH 8.5). Im Bindepuffer wurde auf den Zusatz von 25 mM NaCl verzichtet. Dabei stellte sich heraus, dass das Fusionsprotein bei *pH*-Werten im Bereich von 6.0 bis 8.5 stabil war.

Es konnte kein Peak im Chromatogramm der Kationenaustauschersäule beobachtet werden (nicht gezeigt). Die entsprechende SDS-PAGE zeigt, dass weder MBP-*Tag* noch Spa13 an der Säule gebunden hatten, sondern beide im Durchfluss vorhanden waren (siehe **Abbildung 3.1-4**, Position 6). Die auf der SDS-PAGE aufgetragene Fraktion 1 (Position 7) war Teil des Durchflusses, der sich noch auf der Säule befand. Fraktion 13 (Position 8) repräsentiert einen kleinen Peak, der nach dem Spülen mit 100 % SP-Elutionspuffer im Chromatogramm zu erkennen war. Auch die SDS-PAGEs mit Proben bei Verwendung der anderen Puffer zeigten, dass sich MBP-*Tag* und Spa13 stets im Durchfluss befanden (nicht gezeigt). Spa13 war also unabhängig vom verwendeten Puffer nicht in der Lage, an der Kationenaustauschersäule zu binden. Gründe dafür waren zu diesem Zeitpunkt unklar und werden in **Kapitel 3.1.4** diskutiert.

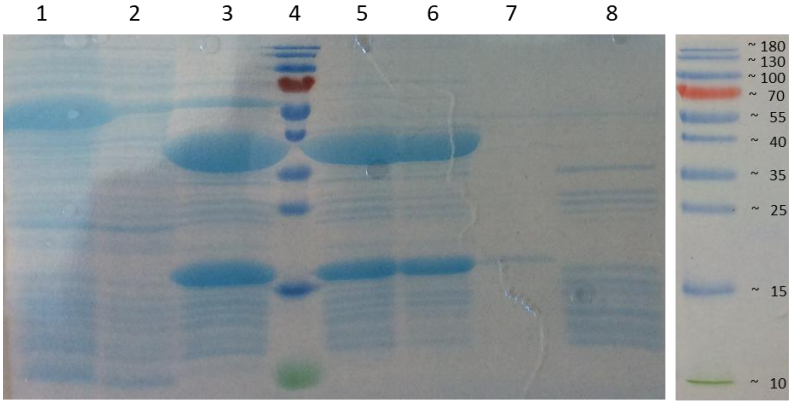


Abbildung 3.1-4: SDS-PAGE mit Proben einer Aufreinigung von Spa13 unter Verwendung einer Kationenaustauschersäule. *Von links nach rechts: 1: Lysat; 2: Durchfluss der Dextrin-Sepharose-Säule; 3: Eluat nach Zugabe der* PreScission-*Protease; 4: Proteinmarker; 5: Probe nach vollständigem Schnitt mit* PreScission-*Protease; 6: Durchfluss der SP-Säule bei Verwendung von HEPES; 7: Fraktion 1 der SP-Säule bei Verwendung von HEPES; 8: Fraktion 13 der SP-Säule bei Verwendung von HEPES.*

In einem weiteren Versuch, Spa13 in reiner Form zu erhalten, kam nach vorangegangener Dextrin-Sepharose-Säule und Abspaltung des MBP-*Tags* eine Größenausschlusschromatographie (engl. *size exclusion chromatography*) mittels einer SEC-75-Säule (*HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade*, AMERSHAM BIOSCIENCES) zum Einsatz. Es konnten im Chromatogramm der SEC-Säule zwei Peaks beobachtet werden (siehe **Abbildung 3.1-5**). Die entsprechende SDS-PAGE ist in **Abbildung 3.1-6** gezeigt. Das Absorptionsverhältnis der Wellenlängen 260 nm zu 280 nm, welches Rückschlüsse auf die Reinheit eines Proteins erlaubt, wurde photometrisch mittels Nanodrop bestimmt. Für den ersten Peak betrug dieses Verhältnis 1.99, für den zweiten Peak konnte ein Verhältnis von 0.71 ermittelt werden. Für 100 % reine Proteine liegt das Verhältnis normalerweise im Bereich von 0.57. Proteine mit 5 % DNA-Verunreinigung weisen bereits ein Verhältnis von 1.06 auf.[95] Dies lässt den Schluss zu, dass es sich beim zweiten Peak um nahezu reines Protein handelte, während in dem zuerst eluierten Protein eine große Menge an Nukleinsäure-Verunreinigung enthalten war. Dabei wird es sich wahrscheinlich nicht ausschließlich um DNA gehandelt haben, da auch in der entsprechenden SDS-PAGE viele schwache Banden zu erkennen sind und DNA bekanntlich mittels SDS-PAGE nicht nachgewiesen werden kann.

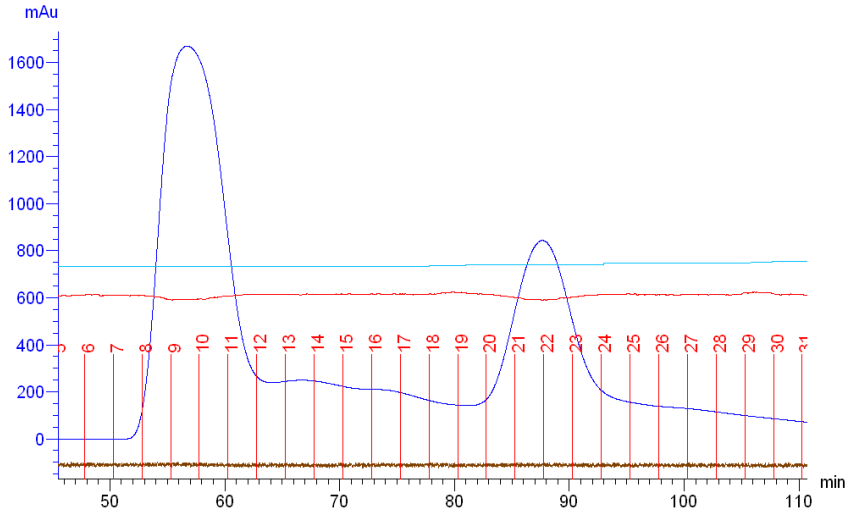


Abbildung 3.1-5: Chromatogramm der präparativen SEC-75-Säule. *Auf der Abszisse ist die Zeit in min aufgetragen und auf der Ordinate die UV-Absorption in mAu. Die UV-Absorption ist als dunkelblaue Kurve dargestellt, die Leitfähigkeit als rote Kurve, die Temperatur als hellblaue Kurve und der Druck als braune Kurve. Die gesammelten Fraktionen sind als rote Zahlen angegeben. Bei dieser Abbildung handelt es sich nur um einen Ausschnitt des Chromatogramms.*

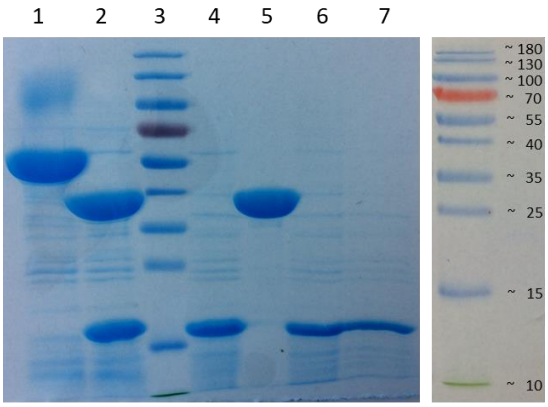


Abbildung 3.1-6: SDS-PAGE mit Proben der Aufreinigung von Spa13 unter Verwendung einer SEC-Säule. *Von links nach rechts: 1: Eluat der Dextrin-Sepharose-Säule; 2: Probe nach Schnitt mit* PreScission-*Protease; 3: Proteinmarker; 4: Fraktion 9 der SEC-75; 5: Fraktion 21 der SEC-75; 6: Fraktionen 8-11 der SEC-75; 7: Fraktion 9 der präparativen SEC-200. Rechts ist der Proteinmarker mit den molaren Massen für die Markerbanden in kDa dargestellt.*

Doch viel entscheidender war die Beobachtung, dass Spa13 trotz einer geringeren molaren Masse vor dem MBP-*Tag* eluiert wurde. Der Spa13-Peak erschien unmittelbar zusammen mit der Laufmittelfront. Es fand anscheinend keinerlei Retention durch die Poren der Säule statt. Dies führte zwangsläufig zu der Schlussfolgerung, dass Spa13 in hochaggregierter Form vorlag und somit zu groß war, um in die Poren der Säule einzudringen.

Auch die Verwendung einer *HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade* („SEC-200“) (AMERSHAM BIOSCIENCES), geeignet zur Trennung von globulären Proteinen bis zu einer molaren Masse von 600 kDa, lieferte exakt die gleichen Ergebnisse. Auch hier eluierte das Protein mit der Laufmittelfront und besaß ebenso wie unter Verwendung der präparativen SEC-75 Verunreinigungen (siehe **Abbildung 3.1-6**, Position 7). Auch der Versuch, auf die Abspaltung des MBP-*Tags* zu verzichten, in der Hoffnung, dass das Fusionsprotein eine höhere Stabilität aufweist, lieferte die gleichen Ergebnisse (nicht gezeigt). Zeitgleich wurde beobachtet, dass bei Aufkonzentration unter Verwendung einer Ultrazentrifugationseinheit (*Vivaspin® 20 Molecular Weight Cut-off (MWCO) 30.000*, SARTORIUS) Spa13 im Überstand vorlag, obwohl es aufgrund seiner molaren Masse im Durchfluss hätte vorliegen müssen.

Der Versuch, die Unreinheiten mithilfe eines Hochsalzpuffers zu entfernen, während das Fusionsprotein auf der Dextrin-Sepharose-Säule gebunden vorlag, misslang. Es konnte bei diesem Versuch nur sehr wenig Protein erhalten werden. Es war anzunehmen, dass das Protein bei hohen Salzkonzentrationen nicht stabil war. Dies konnte bei anderen Aufreinigungsversuchen auch für das vom *Tag* befreite Zielprotein beobachtet werden. Eine Salzkonzentration

von 150 mM führte teilweise schon zur Fällung des Proteins, wohingegen das Protein bei 0-25 mM NaCl keine Tendenz zeigte, auszufallen.

Auch die Zugabe von 0.1 bzw. 0.01 % (*V*/*V*) Triton zu dem Dextrin-Sepharose- bzw. SEC-Puffer, die Reduktion des Salzgehaltes im SEC-Puffer von 150 mM NaCl auf 25 mM NaCl und der schonendere Zellaufschluss mit dem Homogenisator *EmulsiFlex-C5* (AVESTIN) lieferten keine anderen Ergebnisse. Auch hier schien das Protein hochaggregiert vorzuliegen.

Ein weiterer Versuch bestand in der Verwendung einer schwachen Anionenaustauschersäule (*HiTrap™ DEAE FF 5 mL*-Säule, GE HEALTHCARE) im Anschluss an die SEC-Säule, um dadurch eventuell vorhandene DNA zu entfernen. Es konnte tatsächlich ein Peak mit einer UV-Absorption von über 1200 mAu im Chromatogramm der Diethylaminoethyl- (DEAE-) Säule beobachtet werden (siehe **Abbildung 3.1-7**). Aus der entsprechenden SDS-PAGE ging hervor, dass es sich dabei um DNA handeln muss, denn es waren keine Banden zu erkennen (siehe **Abbildung 3.1-8**, Position 9). Das für die Proteinlösung erhaltene Absorptionsverhältnis von 260 nm zu 280 nm deutete jedoch auch nach Durchführung der DEAE-Säule mit 1.99 weiterhin auf einen hohen Prozentsatz an DNA-Verunreinigung hin. Um sicherzugehen, dass die DEAE-Säule nicht überladen worden war, wurde sie ein zweites Mal verwendet. Auch beim zweiten Durchgang konnte ein Peak beobachtet werden, allerdings mit schwächerer Intensität. Auch diese Proteinprobe ließ keinerlei Banden erkennen (nicht gezeigt).

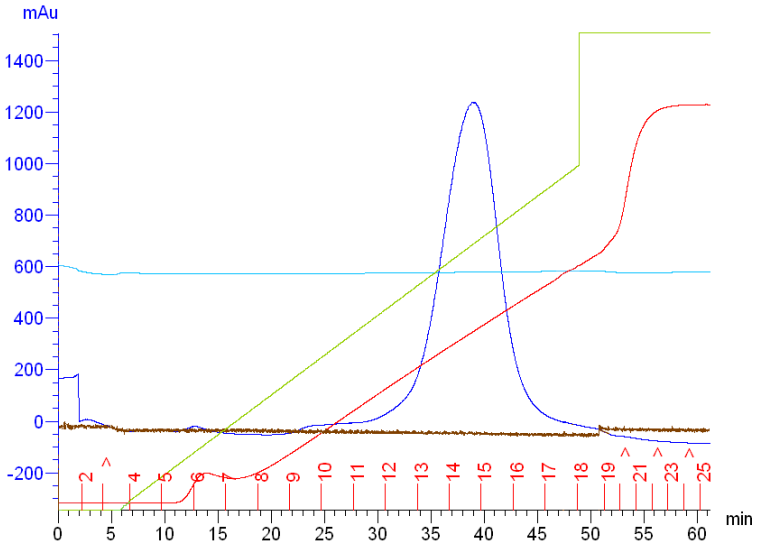


Abbildung 3.1-7: Chromatogramm der Anionenaustauschersäule. *Auf der Abszisse ist die Zeit in min aufgetragen und auf der Ordinate die UV-Absorption in mAu. Die UV-Absorption ist als dunkelblaue Kurve dargestellt, die Leitfähigkeit als rote Kurve, die Temperatur als hellblaue Kurve, der Anteil an Elutionspuffer als grüne Kurve und der Druck als braune Kurve. Die gesammelten Fraktionen sind als rote Zahlen angegeben.*

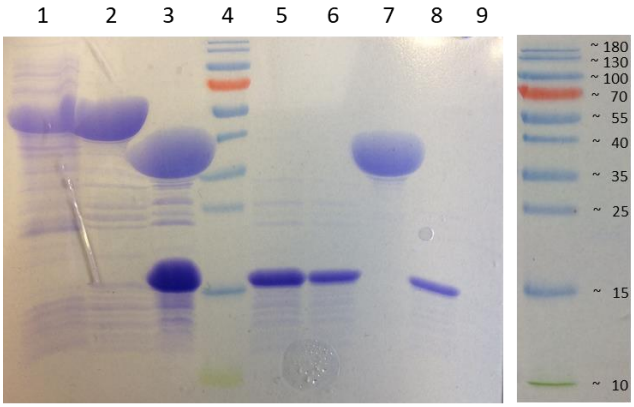


Abbildung 3.1-8: SDS-PAGE mit Proben der Aufreinigung von Spa13 unter Verwendung einer Anionenaustauschersäule. *Von links nach rechts: 1: Lysat; 2: Eluat der Dextrin-Sepharose-Säule; 3: Probe nach Schnitt mit* PreScission-*Protease; 4: Proteinmarker; 5: Fraktion 28 der SEC-Säule; 6: Fraktion 32 der SEC-Säule; 7: Fraktion 55 der SEC-Säule; 8: Durchfluss der DEAE-Säule; 9: Fraktionen 12-16 der DEAE-Säule (keine Banden auf dem Gel zu erkennen). Rechts ist der Proteinmarker mit den molaren Massen für die Markerbanden in kDa dargestellt.*

3.1.3. Koexpression des *spa13*-Gens zusammen mit dem Gen *ipgC0,-4S* unter Verwendung des Expressionsvektors pETDuet-1

Die Koexpression erlaubt die zeitgleiche Expression mehrerer Gene. Sie wird u.a. verwendet, um die Löslichkeit eines Proteins zu erhöhen, da es durch die Wechselwirkung mit einem Interaktionspartner meist zur Stabilisierung des schlecht löslichen Proteins kommt. Daher sollte das *spa13*-Gen zusammen mit dem *ipgC0,-4S*-Gen koexprimiert werden. Sollte nach erfolgreicher Überproduktion und Aufreinigung wider Erwarten keine Interaktion zwischen beiden Proteinen festgestellt werden, sollten die am C-Terminus von IpgC fehlenden Aminosäuren nachträglich mittels Mutagenese eingefügt werden.

Als Expressionsvektor wurde *pETDuet™-1* (NOVAGEN) gewählt. Dieser Vektor besitzt zwei *Multiple Cloning Sites* (MCS I und MCS II). Zur Herstellung des benötigten Expressionsplasmids wurde mittels PCR das *ipgC0,-4S*-Gen zusammen mit der Sequenz kodierend für ein N-terminales GST-*Tag* und der dazwischen befindlichen Schnittstelle für Thrombin aus dem Plasmid „pHW1-*ipgC0,-4S*“ amplifiziert. *Upstream* wurde mit dem Primer „IpgC0,-4S_pETDuet_forward“ eine *Eco*RV-Schnittstelle und *downstream* mit dem Primer „IpgC0,-4S_pETDuet_back“ eine *Pac*I-Schnittstelle eingefügt. Somit wurde die Sequenz kodierend für das in pETDuet-1 eigentlich vorhandene N-terminale S-*Tag* in der MCS II entfernt. Ebenso wurde mittels PCR das *spa13*-Gen zusammen mit der Sequenz kodierend für die N-terminale *PreScission*-Protease-Schnittstelle aus dem Plasmid „pGEX-6P-mod-spa13“ amplifiziert. Dabei wurde am 5‘-Ende mit dem Primer „spa13_pETDuet_forward“ eine *Eco*RI-Schnittstelle und am 3‘-Ende

mit dem Primer „pETDuet_spa13_backward_2“ eine *Not*I-Schnittstelle eingefügt. Somit blieb das N-terminale His-*Tag* der MCS I erhalten. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang (siehe **Tabelle 5.1-6**) aufgelistet. Das Schema der Klonierung ist in **Abbildung 3.1-9** gezeigt.

Zunächst wurde das PCR-Produkt der Amplifikation des *ipgC0,-4S*-Gens in die MCS II des pET-Duet-Vektors eingefügt. Anschließend wurde das PCR-Produkt der Amplifikation des *spa13*-Gens in die MCS I desselben Vektors eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde „pET-Duet_spa13_ipgC0,-4S“ genannt.

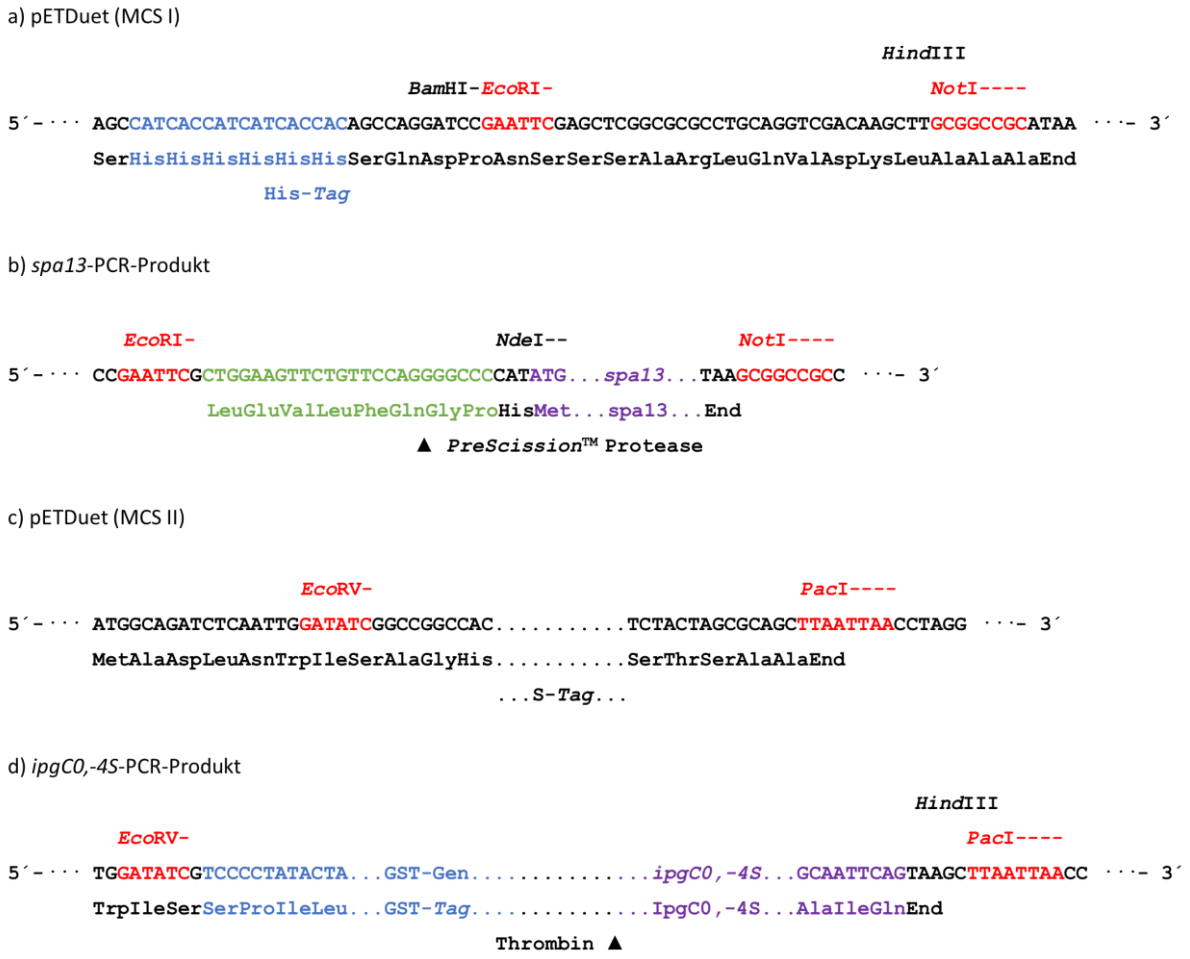


Abbildung 3.1-9: Schematische Darstellung der Klonierung von* spa13 *unter Verwendung des Expressionsvektors pETDuet-1. *a) MCS I des Expressionsplasmids pETDuet. Blau hervorgehoben ist die Sequenz für das His-*Tag*. Rot markiert sind die Restriktionsschnittstellen für* Eco*RI und* Not*I. b) PCR-Produkt von* spa13 *mit zusätzlicher Erkennungssequenz für die* PreScission*-Protease (grün markiert). Rot hervorgehoben sind die Restriktionsschnittstellen für* Eco*RI und* Not*I. c) MCS II des Expressionsplasmids pETDuet. Rot hervorgehoben sind die Restriktionsschnittstellen für* Eco*RV und* Pac*I. d) PCR-Produkt der verkürzten Variante von* ipgC (ipgC0,-4S) *mit zusätzlichem GST-Gen (blau markiert) und Thrombinschnittstelle. Rot hervorgehoben sind auch hier die Restriktionsschnittstellen für* Eco*RV und* Pac*I. Die Sequenz des* ipgC0,-4S*-Gens und die Sequenz des entsprechenden Proteins sind lila markiert.*

Nach Genexpression in *E.coli*-Zellen des Stammes *ONE Shot™ BL21(DE3)* (INVITROGEN) sollte die Aufreinigung erfolgen. Ein Aufreinigungsversuch bestand darin, das Zelllysat auf eine GSH-Säule aufzutragen, um das GST-*getaggte* IpgC0,-4S und indirekt über Interaktion auch das His-*getaggte* Spa13 an die Säule zu binden. Durch Zugabe von Thrombin sollte das GST-*Tag* abgespalten und das mit IpgC0,-4S interagierende His-*getaggte* Spa13 eluiert werden. Ein weiterer Versuch bestand darin, Spa13 über sein His-*Tag* und indirekt über Interaktion ebenfalls das GST-*getaggte* IpgC0,-4S an eine Nickelsäule (*HisTrap™ HP 5 mL*-Säule, GE HEALTHCARE) zu binden. Durch Zugabe von *PreScission*-Protease sollte das His-*Tag* abgespalten und der Komplex aus GST-IpgC0,-4S und Spa13 eluiert werden. Doch letztendlich konnte keine Überexpression der Gene erzielt werden.

Die in **Abbildung 3.1-10** dargestellte SDS-PAGE der zeitgleichen Aufreinigung von Spa13 und IpgC0,-4S zeigt, dass keine ausreichende Überexpression der Gene stattgefunden hatte. Im Pellet (Position 5) sind zwar Banden der entsprechenden Größen zu erkennen (Bande zwischen 35 und 40 kDa voraussichtlich für GST-IpgC0,-4S und Bande zwischen 15 und 25 kDa für His-Spa13), allerdings nur sehr schwach. Die Lysatproben und folglich auch alle weiteren SDS-Proben sind frei von eindeutig zu erkennenden Banden in diesem Bereich. An dieser Stelle hätte eventuell eine Optimierung des Expressionsprotokolls erfolgen müssen. Da dies sehr zeitintensiv sein kann, wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet.

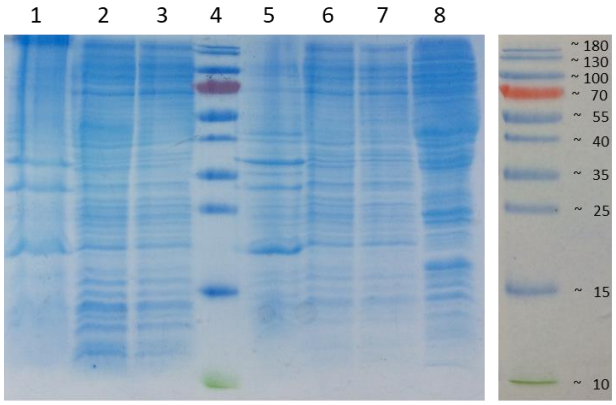


Abbildung 3.1-10: SDS-PAGE mit Proben der Aufreinigung von His-Spa13 und GST-IpgC0,-4S nach Koproduktion. *Von links nach rechts: 1: Pellet nach Resuspension mit PBS-Puffer und Zellaufschluss; 2: Lysat nach Resuspension mit PBS-Puffer und Zellaufschluss; 3: Durchfluss der GSH-Säule; 4: Proteinmarker; 5: Pellet nach Resuspension mit Nickel-Bindepuffer und Zellaufschluss; 6: Lysat nach Resuspension mit Nickel-Bindepuffer und Zellaufschluss 7: Durchfluss der Nickelsäule; 8: Peak der Nickelsäule. Rechts ist der Proteinmarker mit den molaren Massen für die Markerbanden in kDa dargestellt.*

3.1.4. Diskussion

Am vielversprechendsten war der Versuch, Spa13 mit N-terminalem MBP-*Tag* zu produzieren. Wie in der Literatur beschrieben[94,96], erwies sich das MBP-*Tag* als besonders nützlich, da so eine Überexpression des Gens erzielt werden konnte und sich das Protein im Zelllysat befand. Auch die Abspaltung des MBP-*Tags* mit *PreScission*-Protease war erfolgreich. Nach einigen Reinigungsversuchen konnten zudem *PreScission*-Protease und MBP-*Tag* erfolgreich vom Zielprotein abgetrennt werden. Auch die Menge an Spa13, die erhalten werden konnte, erschien ausreichend und die Reinheit erschien akzeptabel, zumindest, was die Analyse der Proteinprobe mittels SDS-PAGE angeht. Allerdings stellte sich heraus, dass Spa13 lösliche Aggregate bildete und zudem einen hohen Anteil an Nukleinsäure-Verunreinigungen besaß. Dieses Problem konnte trotz zahlreicher Versuche nicht behoben werden.

Häufig bleibt die Tatsache, dass ein Protein lösliche Aggregate bildet, unbemerkt, denn Methoden, die dies zum Vorschein bringen (z.B. dynamische Lichtstreuung), werden nicht routinemäßig durchgeführt. Hier jedoch wurden die löslichen Aggregate von Spa13 bemerkt, denn das Protein eluierte ausgesprochen früh bei der Größenausschlusschromatographie und befand sich bei der Verwendung von Ultrafiltriereinheiten mit einem MWCO von 30 kDa nicht im Durchfluss, sondern im Überstand. Sehr wahrscheinlich wird das Vorhandensein dieser Aggregate auch die Ursache dafür gewesen sein, dass das Protein nicht an der Kationenaustauschersäule binden konnte. Die löslichen Aggregate waren wahrscheinlich zu groß, um überhaupt in die Poren des Säulenmaterials einzudringen, ähnlich wie bei der Größenausschlusschromatographie. Die Frage ist nur, welche Größe diese Aggregate besitzen müssen, wenn sie selbst bei Anwendung einer SEC-200 mit der Laufmittelfront eluiert werden. Eine solche Säule ist normalerweise geeignet zur Trennung von Proteinen bis zu einer molaren Masse von 600 kDa. Es scheint sich um hochmolekulare Aggregate zu handeln, denn niedermolekulare Aggregate können häufig mittels Größenausschlusschromatographie voneinander getrennt werden.

Aber was ist die Ursache für das Vorliegen solcher Aggregate und wie könnte ihre Entstehung eventuell verhindert werden? Es kann im Allgemeinen unterschieden werden zwischen reversiblen und irreversiblen Aggregaten. Reversible Aggregate können durch Veränderung der Bedingungen, wie z.B. durch Veränderung des *pH*-Wertes oder der Salzkonzentration wieder aufgelöst werden. Dies scheint hier nicht der Fall zu sein, denn eine Veränderung des

pH-Wertes bzw. der Salzkonzentration oder die Zugabe von Detergenzien führten nicht zum Erfolg. Es macht den Anschein, als handle es sich hierbei um einen irreversiblen Aggregationsprozess.

Es scheint so, als läge das Problem schon bei der Proteinexpression, denn nicht nur das Zielprotein, sondern auch das Fusionsprotein bildete hochmolekulare, lösliche Aggregate. Die entsprechenden SDS-PAGEs (vgl. **Abbildung 3.1-8**) zeigen, dass eine sehr große Menge an Protein von den Zellen produziert wurde. Einerseits ist eine „Über"-Expression erwünscht, andererseits ist irgendwann eine Grenze erreicht, bei dem die Proteinkonzentration in der Zelle zu hoch ist und das Protein in gewisser Weise einen toxischen Effekt auf die Zelle ausübt. Zu hohe Proteinmengen führen zu einer Überlastung der Prozesse innerhalb der Zelle. Die Zelle muss Energie aufwenden, um Protein zu produzieren. Je mehr Energie sie dafür aufwenden muss, desto weniger Energie verbleibt für andere Prozesse, wie z.B. für die Proteinfaltung, posttranslationale Modifikationen oder den Transport.[97,98] Demnach kann es sein, dass hier die Produktion einer zu großen Menge an MBP-markiertem Spa13 zur Bildung hochmolekularer, löslicher Aggregate geführt hat, da die Zelle nicht mehr genügend Energie für die Proteinfaltung erübrigen konnte. Um in diesem Fall die Bildung löslicher Aggregate zu verhindern, müsste eine Anpassung des Expressionsprotokolls erfolgen, mit dem Ziel, die Proteinproduktion zu drosseln. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt und müsste in weiterführenden Experimenten erfolgen. Wenn das Problem der Aggregation behoben worden ist, wird Spa13 wahrscheinlich auch wieder in der Lage sein, an einer Kationenaustauschersäule bzw. Größenausschlusschromatographiesäule zu binden und die Abtrennung der noch vorhandenen Verunreinigungen könnte erfolgen.

3.2. Sekundärstrukturvorhersage von Spa13 mit *PSIPRED*

3.2.1. Ergebnisse

Da die Reinigung von Spa13 in dieser Arbeit leider nicht gelungen war, konnten auch keine darauf aufbauenden Experimente, wie beispielsweise die Strukturbestimmung mittels Röntgenkristallographie, erfolgen. Bislang existiert noch keine 3D-Struktur dieses Proteins. Daher sollte zumindest mit *PSIPRED*[99] eine Sekundärstrukturvorhersage erfolgen. Dazu wurde die Primärsequenz von Spa13 (siehe Anhang, **Abbildung 6.1-1**) genutzt. Die Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersage sind in **Abbildung 3.2-1** gezeigt. Zu erkennen ist, dass für Spa13 eine überwiegend α-helikale Struktur vorhergesagt wird. Nur an drei Stellen wird die α-helikale Struktur unterbrochen. Darunter fallen die Aminosäure 13, die Aminosäuren 33-35 und die Aminosäuren 56-61, die anscheinend keine erkennbare Sekundärstruktur aufweisen.

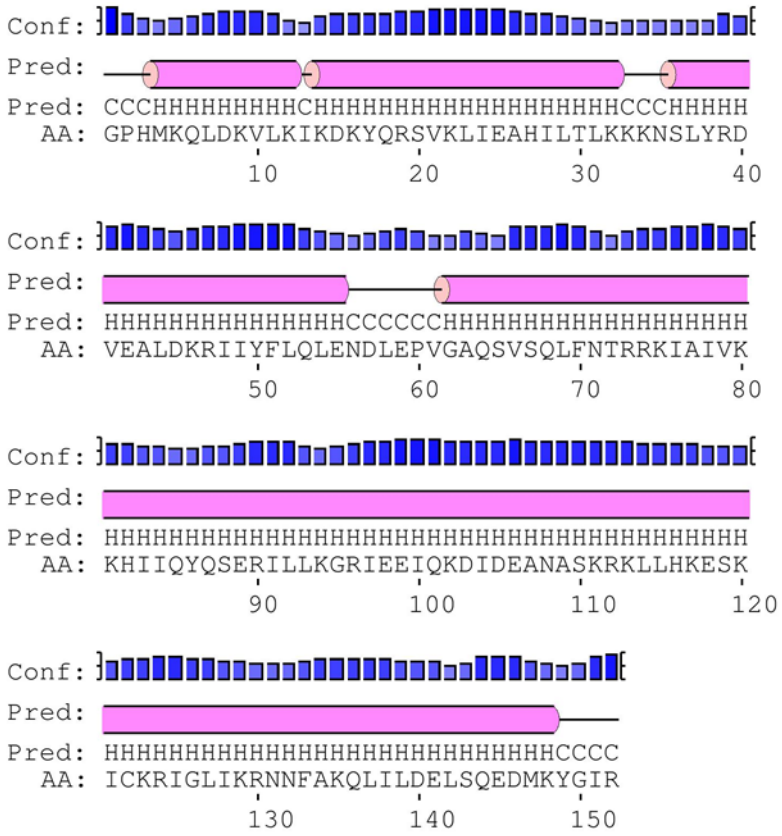


***Abbildung 3.2-1: Sekundärstrukturvorhersage von Spa13 mit* PSIPRED[99].** *Verwendet wurde die Primärsequenz von Spa13. Rosa markiert sind die Bereiche der Sequenz, für die eine α-Helix (H) vorhergesagt wird. Schleifen (C) sind als schwarze Linie dargestellt. Die Zuverlässigkeit der Vorhersage (engl.* confidence of prediction*, „Conf") ist durch unterschiedlich große blaue Balken dargestellt. Die Aminosäuresequenz (AA) ist im Einbuchstabencode angegeben.*

3.2.2. Diskussion

Um die Sekundärstrukturvorhersage zu bewerten, soll diese mit Strukturen von Spa13-orthologen Proteinen verglichen werden. Es existiert beispielsweise die Struktur von CdsO (veralteter Name: CT670). Dabei handelt es sich um das Spa13-orthologe Protein aus *Chlamydia trachomatis*.[100] Dieses Protein besteht aus zwei langen α-Helices (siehe **Abbildung 3.2-2**). Auch die bereits existierenden Strukturen anderer orthologer Proteine zeigen eine solche dreidimensionale Struktur, in der zwei lange α-Helices teilweise zu einer Doppelhelix gewunden sind. Dabei handelt es sich um ein Strukturmotiv, welches auch als *„coiled-coil"* bekannt ist.[101]

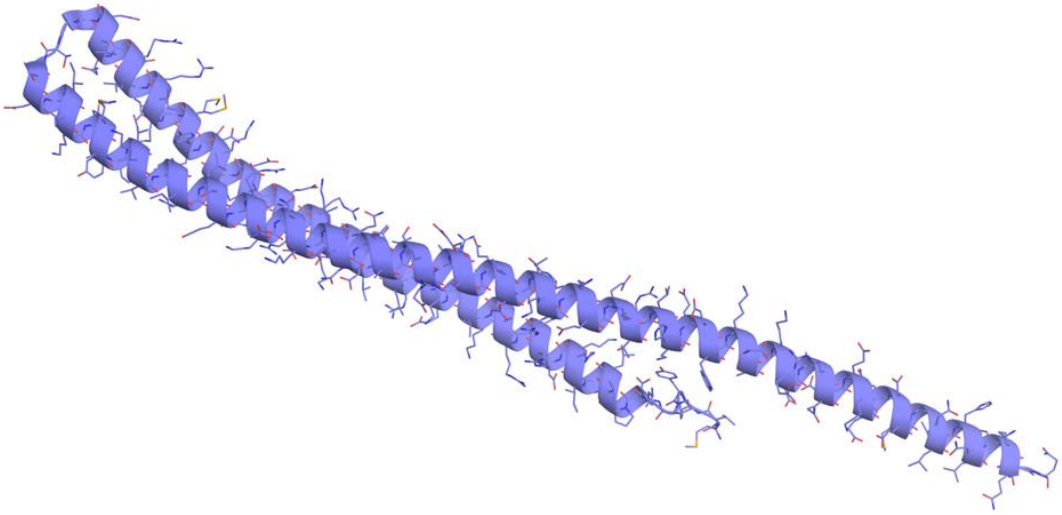


Abbildung 3.2-2: Dreidimensionale Struktur des Spa13-orthologen Proteins CdsO aus* Chlamydia trachomatis *(PDB-Code: 3k29). *Das Protein ist als Bänder- und Stäbchenmodell gezeigt. C-Atome sind lila, O-Atome rot, N-Atome dunkelblau und S-Atome gelb.*

Wird jetzt noch einmal die Sekundärstrukturvorhersage von Spa13 betrachtet, so können eventuell die Aminosäuren 56-61 als *Loop* identifiziert werden, der die beiden α-Helices miteinander verbindet. Die anderen zwei Bereiche, die der Vorhersage nach zu urteilen keine erkennbare Sekundärstruktur aufweisen, sind mit einer bzw. drei Aminosäuren sehr kurz. Hier stellt sich die Frage, inwieweit diese Vorhersage tatsächlich zutrifft oder ob es sich hierbei vielleicht nicht doch um Aminosäuren handelt, die Teil einer α-Helix sind, allerdings aufgrund bestimmter Kriterien nicht der Norm entsprechen. Wäre das der Fall, dann würde Spa13 aus zwei α-Helices bestehen, die eine 52 Aminosäuren lang, die andere 86 Aminosäuren lang. Dies würde in etwa mit der in **Abbildung 3.2-2** gezeigten Struktur von CdsO übereinstimmen. Dort besitzt die eine α-Helix 60 Aminosäuren und die andere 92 Aminosäuren.

Wie am Beispiel von CdsO aus *Chlamydia trachomatis* zu erkennen, existieren zwar 3D-Strukturen bekannter Spa13-orthologer Proteine, allerdings existiert bislang noch keine Struktur eines Spa13-orthologen Proteins zusammen mit einem IpgC-orthologen Protein. Da auch in dieser Arbeit die Komplexstruktur von IpgC mit Spa13 nicht erhalten werden konnte, bleibt offen, auf welche Art und Weise Spa13 und IpgC miteinander interagieren. Um dennoch mehr über die Wechselwirkung der beiden Proteine zu erfahren, wurde ein Peptid-*Microarray* durchgeführt, welches im folgenden Kapitel beschrieben wird.

3.3. Peptid-*Microarray*

Mithilfe eines Peptid-*Microarrays* sollte zum einen das IpgC-Bindungsepitop von Spa13 ermittelt werden. Dazu wurde die vollständige Sequenz des Proteins in 20er-Peptide unterteilt, sodass sich die Peptidsequenzen um jeweils etwa zehn Aminosäuren überschnitten. Zum anderen sollten mithilfe eines Alanin-Scans die Bindungsbeiträge einzelner Aminosäuren des bereits von HASEWINKEL[102] bestimmten IpgC-Bindungsepitops von MxiE (10er Peptid) ermittelt werden. Dazu wurde jede der zehn Aminosäuren durch ein Alanin ersetzt. Als Positivkontrollen dienten die IpgC-Bindungsepitope von IpaB, IpaC und MxiE.

3.3.1. Reinigung des GST-Fusionsproteins

Da es keinen spezifischen Antikörper gegen das Chaperon IpgC gibt, wurde für das Peptid-*Microarray* das GST-Fusionsprotein verwendet, welches über das GST-*Tag* mithilfe eines geeigneten *anti*-GST-Antikörpers nachgewiesen werden kann. Bei der Reinigung des Fusionsproteins (GST-IpgC0,-4S) traten jedoch Schwierigkeiten auf. Trotz zahlreicher Versuche, das Fusionsprotein in reiner Form zu erhalten, waren letzten Endes immer noch Verunreinigungen enthalten (siehe SDS-PAGE in **Abbildung 3.3-1**). Egal, ob versucht wurde, das Protein mittels GSH-, DEAE- und SEC-Säule zu reinigen, oder ob direkt nach der GSH-Säule eine Phenyl-Sepharose-Säule verwendet wurde, die Reinheit des Proteins blieb unzulänglich. Es waren immer zusätzliche Banden in Höhe der 25-kDa-Markerbande zu erkennen, wobei es sich um das freie GST-*Tag* handeln könnte. Letzten Endes wurde das Fusionsprotein mittels GSH- und Phenyl-Sepharose-Säule gereinigt (siehe Material- und Methodenteil, **Kapitel 5.3.14**). Es wurde beschlossen, das nicht vollständig reine Protein für das Peptid-*Microarray* zu nutzen.

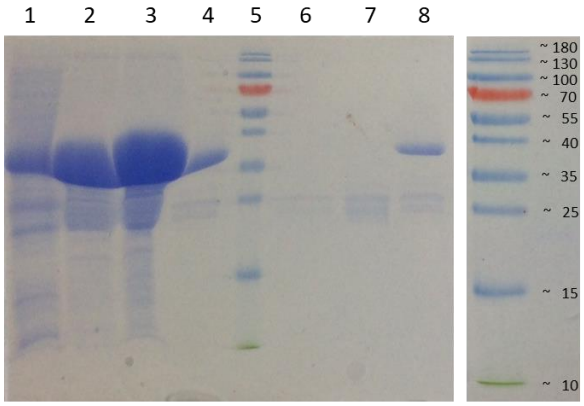


Abbildung 3.3-1: SDS-PAGE mit Proben einer Aufreinigung des Fusionsproteins GST-IpgC0,-4S. *Von links nach rechts: 1: Lysat; 2+3: Eluat der GSH-Säule; 4: Durchfluss der GSH-Säule; 5: Proteinmarker; 6: Peak 1 der Phenyl-Sepharose-Säule; 7: Peak 1 der Phenyl-Sepharose-Säule nach Aufkonzentration, 8: Peak 2 der Phenyl-Sepharose-Säule. Rechts ist der Proteinmarker mit den molaren Massen für die Markerbanden in kDa dargestellt.*

3.3.2. Nachweis des Fusionsproteins mittels Western Blot

Zunächst wurden GST-IpgC0,-4S-Proben unterschiedlicher Konzentration und eine Probe von IpgC0,-4S mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Elektrophorese auf eine NC-Membran transferiert. Mit diesem Versuch sollte geprüft werden, ob die verwendeten Antikörper auch das GST-Fusionsprotein detektieren. Als Erstantikörper diente ein *anti*-GST-Antikörper aus dem Kaninchen mit einer Verdünnung von 1:1000. Als Zweitantikörper kam ein aus der Ziege gewonnener Antikörper gegen Kaninchen-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:5000 zum Einsatz. Die Detektion erfolgte fluoreszenzbasiert am *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR BIOSCIENCES). **Abbildung 3.3-2** zeigt sowohl die SDS-PAGE als auch den zugehörigen Western Blot. Aus der Abbildung geht hervor, dass das Fusionsprotein durch die verwendeten Antikörper detektiert werden konnte, IpgC0,-4S ohne GST-*Tag* allerdings nicht detektiert wurde (siehe fehlende Bande im Western Blot). Die Auftragung von 6 µg GST-IpgC0,-4S (Position 2) ließ jedoch sowohl auf der SDS-PAGE als auch im Western Blot schwache Banden in Höhe der 25-kDa-Markerbande erkennen. Wie in **Kapitel 3.3.1** bereits vermutet, handelt es sich hierbei tatsächlich um das freie GST-*Tag*, da nur so eine Detektion mittels *anti*-GST-Antikörper erklärt werden kann.

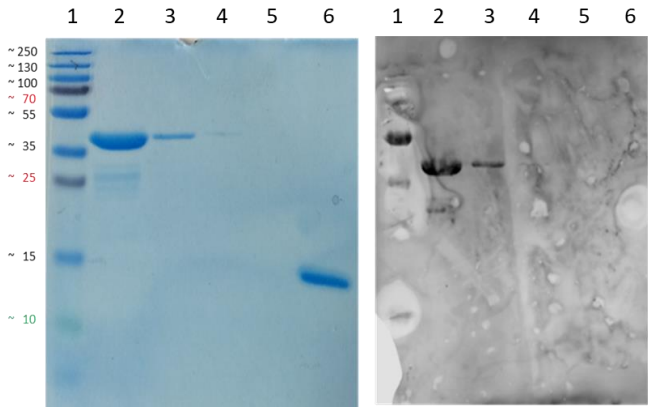


Abbildung 3.3-2: Detektion des Fusionsproteins mittels SDS-PAGE (links) und Western Blot (rechts). *Die Probenauftragung war in beiden Fällen identisch. Von links nach rechts: 1: Proteinmarker (Molekulargewicht in kDa angegeben); 2: 6 µg GST-IpgC0,-4S; 3: 0.6 µg GST-IpgC0,-4S; 4: 60 ng GST-IpgC0,-4S; 5: 6 ng GST-IpgC0,-4S; 6: 6 µg IpgC0,-4S.*

3.3.3. Ergebnisse

Das Ergebnis des Peptid-*Microarrays* ist in **Abbildung 3.3-3** gezeigt. Zu erkennen ist in erster Linie ein sehr starkes Signal für das Peptid an Position B12. Dabei handelte es sich um das Bindungsepitop von IpaB, welches hier eine von drei Positivkontrollen darstellt. Zudem ist ein sehr schwaches Signal für das Peptid an Position A6 zu erkennen. An dieser Position befand sich ein aus 20 Aminosäuren bestehendes Peptid aus der Sequenz von Spa13 ($Spa13^{51-70}$). An Position A13 kann ebenfalls eine leichte Dunkelfärbung beobachtet werden, allerdings könnte diese Färbung auch durch das starke Signal an Position B12 hervorgerufen worden sein. An Position A13 befand sich ebenfalls ein Peptid aus der Sequenz von Spa13 ($Spa13^{122-141}$). Für alle weiteren Peptide konnte kein Signal beobachtet werden, auch nicht für die zwei weiteren Positivkontrollen, das IpgC-Bindungsepitop von MxiE an Position B2 und das IpgC-Bindungsepitop von IpaC an Position B13.

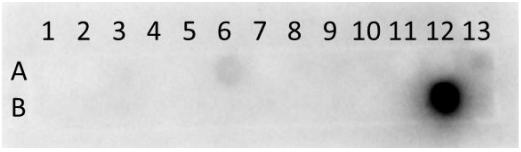


Abbildung 3.3-3: Ergebnis des Peptid*-Microarrays.** *Die Chemilumineszenz-Signale sind als dunkle Spots zu erkennen. Beim einzigen klar zu erkennenden Spot handelt es sich um das IpgC-Bindungsepitop von IpaB (IpaB10: LIPELKAPKS). Die Sequenzen aller Peptide sind in* ***Tabelle 5.4-1 *(****Kapitel 5.4****) aufgeführt.*

3.3.4. Diskussion

Wie ist dieses Ergebnis zu bewerten? Zunächst einmal wäre zu erwarten gewesen, dass alle drei Positivkontrollen eindeutig detektiert werden. Wie lässt sich nun die Tatsache erklären, dass für das Bindungsepitop von IpaB ein sehr starkes Signal erhalten wurde, für die anderen beiden Bindungsepitope allerdings kein Signal?

Zunächst einmal muss berücksichtigt werden, dass bei diesem Experiment nicht IpgC, sondern das GST-Fusionsprotein verwendet wurde. Theoretisch könnten die Bindestellen für die Peptide aus MxiE und IpaC durch das an IpgC gekoppelte GST-*Tag* blockiert worden sein. Allerdings wird angenommen, dass das Bindungsepitop von IpaC die gleiche Bindestelle besitzt, wie das Bindungsepitop von IpaB (siehe **Kapitel 3.5.3**). In diesem Fall könnte die sterische Hinderung des GST-*Tags* nicht als Erklärung für das fehlende Signal herangezogen werden.

Das Bindungsepitop von IpaB ist aus der Literatur bekannt. Zur Bestimmung der Bindungsaffinität des IpaB-Bindungsepitops wurden bei LUNELLI *et al.* ITC-Messungen durchgeführt.[37] Der dabei ermittelte Wert (K_D: 72 µM, für ein etwas längeres Peptid als hier verwendet wurde) konnte von HASEWINKEL[102] durch MST-Experimente bestätigt werden. Die IpgC-Bindungsepitope von MxiE (MxiE10S) und IpaC (IpaC10.5) wurden von HASEWINKEL ermittelt. Die entsprechenden Affinitäten wurden durch MST-Experimente bestimmt. HASEWINKEL ermittelte für den Komplex aus IpgC und IpaC10.5 einen K_D-Wert von 107.0 ± 15.7 µM und für den Komplex aus IpgC und MxiE10S einen K_D-Wert von 86.8 ± 25.4 µM. Somit liegen die Bindungsaffinitäten für diese beiden Peptide in der gleichen Größenordnung wie die für das Peptid aus IpaB. Demnach hätten die Bindungsepitope von MxiE und IpaC auch ein ähnlich starkes Signal erzeugen müssen. Die Komplexstrukturen bestehend aus IpgC und den Bindungsepitopen von MxiE und IpaC konnten bislang noch nicht ermittelt werden. Nur die Komplexstruktur mit dem Bindungsepitop von IpaB ist bekannt.[40,103]

Hinsichtlich der zwei schwachen Signale, die für zwei Spa13-Peptide beobachtet wurden, muss bedacht werden, dass die Proteinprobe mit einer geringen Menge an freiem GST-*Tag* verunreinigt war und es sich hierbei auch um den Nachweis einer Wechselwirkung zwischen Peptid und GST-*Tag* handeln könnte. Diese Ergebnisse müssten beispielsweise durch MST- bzw. ITC-Messungen validiert werden. In dieser Arbeit sollte versucht werden, mithilfe entsprechender MST-Experimente die Affinität der beiden Spa13-Peptide zu ermitteln, allerdings gelang

bereits die Reproduktion der Bindungsaffinität für das IpaB-Peptid mithilfe von MST nicht (nicht gezeigt). Somit ist nicht klar, ob die beiden Spa13-Peptide keine Affinität zum Protein besitzen oder ob die MST-Methode noch nicht ausreichend etabliert war, um die Affinität bestimmen zu können.

Ein weiterer Grund dafür, warum eventuell mithilfe des Peptid-*Microarrays* das Bindungsepitop von Spa13 nicht ermittelt werden konnte, wäre das Vorliegen eines nicht-linearen Bindungsepitops. Dabei handelt es sich um ein Bindungsepitop, welches aus mehreren, nicht-kontinuierlichen Sequenzen zusammengesetzt ist. Es existieren bereits Methoden, die dieses Problem versuchen zu lösen, wie beispielsweise die Methode, bei der die verschiedenen Peptide mithilfe eines Linkers verbunden werden, um die räumliche Distanz der einzelnen Sequenzabschnitte zu simulieren.[85] Allerdings stellt sich im Zusammenhang mit der in **Kapitel 3.2** durchgeführten Sekundärstrukturvorhersage für Spa13 die Frage, wie dieser Fall für Spa13 konkret aussehen würde. Laut Sekundärstrukturvorhersage besteht Spa13 höchstwahrscheinlich aus zwei sehr langen α-Helices. Folglich wäre es vorstellbar, dass sich das Bindungsepitop aus Aminosäuren zusammensetzt, die teilweise Bestandteil der einen α-Helix und teilweise Bestandteil der anderen α-Helix sind und dass die Affinität eines Peptids, welches nur einen Bruchteil des tatsächlichen Bindungsepitops enthält, zu gering ist, um mithilfe eines Peptid-*Microarrays* nachgewiesen werden zu können.

Leider konnten auch mithilfe des Peptid-*Microarrays* keine Informationen über die Interaktion von Spa13 mit IpgC ermittelt werden. Das Experiment wäre wahrscheinlich besser mit einem kleineren *Tag* (z.B. His-*Tag*) durchgeführt worden. So hätte zumindest eine sterische Hinderung von Seiten des *Tags* besser ausgeschlossen werden können. Dafür hätte aber ein neues Konstrukt erzeugt werden müssen. Auch bleibt unklar, warum nicht zumindest für das Bindungsepitop von IpaC eine Interaktion detektiert werden konnte. Vielleicht ist aber auch das starke Signal für das IpaB-Peptid durch Interaktion mit freiem GST-*Tag* erzeugt worden. Es bleibt zu hoffen, dass es sich bei den von HASEWINKEL ermittelten Sequenzen auch tatsächlich um die korrekten Bindungsepitope handelt.

3.4. Reinigung des IpgC-Volllängenproteins

In dieser Arbeit wurden vermehrt die Proteinvarianten IpgC0,-4S und IpgC-9,-4S verwendet, da der Fokus dieser Arbeit auf der Kristallisation des Chaperons lag. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die Kristallisation von IpgC durch Entfernen der am C-Terminus vorhandenen vier Aminosäuren „DIKE“ erleichtert wird.[37] Aus diesem Grund spielte das Volllängenprotein in dieser Arbeit eine geringere Rolle. Nichtsdestotrotz sollte das Volllängenprotein für biochemische Analysemethoden genutzt werden. Nach erfolgter Aufreinigung des Volllängenproteins konnten jedoch anhand einer SDS-PAGE zwei kräftige Banden beobachtet werden. Beide Proteinbanden lagen sehr dicht beieinander und befanden sich in Höhe der 15-kDa-Markerbande (siehe **Abbildung 3.4-1**). Durch eine sehr hohe Proteinausbeute blieb dieser Sachverhalt allerdings zunächst unbemerkt.

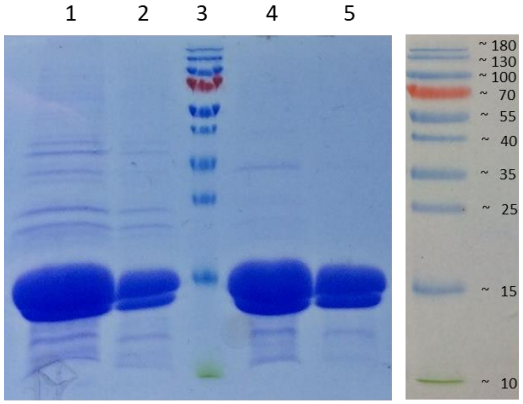


Abbildung 3.4-1: SDS-PAGE mit Proben einer Aufreinigung des IpgC-Volllängenproteins. *Von links nach rechts: 1: Eluat der GSH-Säule; 2: Eluat der PD-10-Säule; 3: Proteinmarker; 4: Eluat der DEAE-Säule; 5: Eluat der SEC-Säule. Rechts ist der Proteinmarker mit den molaren Massen für die Markerbanden in kDa dargestellt.*

HASEWINKEL[102] beschreibt dieses Problem in seiner Dissertation, allerdings nicht im direkten Zusammenhang mit der Reinigung des IpgC-Volllängenproteins. Er beschreibt, dass es ausgehend vom Expressionsvektor pGEX-4T-mod bei der Translation neben der Produktion des Volllängenproteins häufig auch zur Produktion C-terminal verkürzter Abbruchfragmente kommt. Dies nahm HASEWINKEL zum Anlass, ein neues Expressionsplasmid („pHW1“) zu konstruieren, bei dem am C-Terminus der Zielgene eine Sequenz für ein His-*Tag* angefügt wurde. Dies sollte die Abtrennung der C-terminal verkürzten Abbruchfragmente ermöglichen. Zudem führte das neue Expressionsplasmid dazu, dass Zielproteine nach Abspaltung des Affinitäts-*Tags* am N-Terminus nur noch eine zusätzliche Aminosäure besaßen.[102] Für die verschiedenen Proteinvarianten von IpgC ist festzuhalten, dass HASEWINKEL das IpgC-Volllängenprotein ausgehend vom Vektor pGEX-4T-mod erzeugt hat, die Proteinvarianten IpgC0,-4S und IpgC-9,-4S dagegen

ausgehend vom neuen Expressionsplasmid pHW1. Der Vektor pGEX-4T-mod kann daher durchaus die Ursache für das nur beim IpgC-Volllängenprotein vorhandene C-terminale Abbruchfragment sein.

Aufgrund der geringen Massendifferenz konnte das C-terminale Abbruchfragment im Verlauf der Aufreinigung nicht vom IpgC-Volllängenprotein abgetrennt werden. Daher wurde das Volllängenprotein nicht für biochemische Analysemethoden verwendet. Entsprechend kam die am C-Terminus verkürzte Variante IpgC0,-4S zum Einsatz. Es ist zunächst einmal davon auszugehen, dass die vier Aminosäuren am C-Terminus des Proteins nicht an Bindungsprozessen beteiligt sein werden und daher die Proteinvariante IpgC0,-4S beispielweise bedenkenlos für das in **Kapitel 3.3** beschriebene Peptid-*Microarray* verwendet werden kann. Um langfristig jedoch bei solchen Experimenten auf das Volllängenprotein zurückgreifen zu können, sollte ausgehend von der Proteinvariante IpgC0,-4S das Volllängenprotein durch Mutagenese erzeugt werden. Dies wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

3.5. Kokristallisationsversuche mit IpgC und den Bindungsepitopen von IpaB, IpaC und MxiE

In dieser Arbeit wurden Kokristallisationsversuche mit den drei unterschiedlichen IpgC-Varianten (IpgC-Volllängenprotein, IpgC0,-4S und IpgC-9,-4S) und den Bindungsepitopen seiner Interaktionspartner IpaB, IpaC und MxiE durchgeführt. Das IpgC-Bindungsepitop von IpaB war bereits aus der Literatur bekannt[37], die Bindungsepitope von IpaC und MxiE wurden von HASEWINKEL[102] mittels MST bestimmt. Alle drei Bindungsepitope besitzen eine Affinität im zwei- bis dreistelligen mikromolaren Bereich (siehe **Tabelle 3.5-1**). HASEWINKEL nutzte für MST-Messungen eine verkürzte, zehn Aminosäuren lange Sequenz des von LUNELLI *et al.* ermittelten Bindungsepitops von IpaB (Sequenz: LIPELKAPKS), da aus der Struktur von LUNELLI *et al.* ersichtlich war, dass nicht alle Aminosäuren von IpaB$^{51-71}$ mit IpgC interagieren. Auch in dieser Arbeit wurde als Sequenz für das IpaB-Bindungsepitop das zehn Aminosäuren lange IpaB-Peptid verwendet, dessen Affinität sehr wahrscheinlich etwas geringer ist, als die von IpaB$^{51-72}$. Alle in dieser Arbeit für Kokristallisationsversuche verwendeten Peptide waren am N-Terminus acetyliert und am C-Terminus amidiert, um ladungsfreie Enden zu erhalten.

Tabelle 3.5-1: IpgC-Bindungsepitope der Proteine IpaB, IpaC und MxiE und bekannte Affinitäten.

Bindungsepitop	Sequenz	K_D [µM]	Methode	Referenz	verwendet
IpaB	PELKAP	625 ± 11	ITC	LUNELLI *et al.*[37]	
	INTTNAHSTSNILIPELKAPKS (IpaB$^{51-72}$)	72 ± 8	ITC	LUNELLI *et al.*[37]	
	Ac-LIPELKAPKS-NH_2 (IpaB10)	-	-	-	x
IpaC10.5	Ac-LLKLSEQVQH-NH_2	107.0 ± 15.7	MST	HASEWINKEL[102]	x
MxiE10S	Ac-AEKSIHFYHE-NH_2	86.8 ± 25.4	MST	HASEWINKEL[102]	x

3.5.1. Reproduktion einer Kristallisationsbedingung für IpgC und das Bindungsepitop von IpaB

Aus der Literatur war die Komplexstruktur von IpgC0,-4S mit dem Bindungsepitop von IpaB bereits bekannt.[37,40] Es sind zwei Komplexstrukturen in der PDB deponiert, die sich nur durch die Länge des verwendeten IpaB-Bindungsepitops unterscheiden. Allerdings war in beiden Fällen die Auflösung nicht überragend (siehe **Tabelle 3.5-2**). Daher sollten die dort verwendeten Kristallisationsbedingungen reproduziert werden, in der Hoffnung, dass eine Optimierung

der Bedingung zu einer besseren Auflösung und somit zu einer detailreicheren Elektronendichte für das Peptid führt. Die Kristallisationsbedingungen sind in **Tabelle 3.5-2** aufgeführt.

Tabelle 3.5-2: Bekannte Kristallisationsbedingungen für IpgC und das Bindungsepitop von IpaB.

Referenz	PDB-Code (Auflösung)	Kristallisationsbedingung	IpaB-Peptid
LUNELLI *et al*.[37]	3gz1 (2.15 Å)	0.1 M HEPES *pH* 7.4 20 % PEG 8000 8 % Ethylenglykol *hanging drop*-Methode 18 °C	$IpaB^{51-72}$
LOKAREDDY *et al*.[40]	3gz2 (2.65 Å)	0.1 M ADA *pH* 6.5 1 M Ammoniumsulfat *hanging drop*-Methode 18 °C	$IpaB^{16-72}$

Da der Versuch, die Bedingung von LOKAREDDY *et al*. zu reproduzieren, bereits für das *Apo*-Protein gescheitert war, wurde hier nur versucht, die Bedingung von LUNELLI *et al.* zu reproduzieren. Bei der Reproduktion wurde die Proteinvariante IpgC-9,-4S verwendet. Da der K_D-Wert des verwendeten Peptids in etwa bekannt war, wurde anfangs der 10-fache K_D-Wert von $IpaB^{51-72}$ für die Kristallisation von IpgC-9,-4S mit IpaB10 verwendet. Durch leichtes Variieren der Konzentrationen von PEG 8000 und Ethylenglykol konnte die Bedingung relativ schnell reproduziert werden. Die erhaltenen Kristalle sind in **Abbildung 3.5-1** gezeigt. Es waren sehr viele dünne Nadeln gewachsen, auch Nadel-Cluster wurden erhalten.

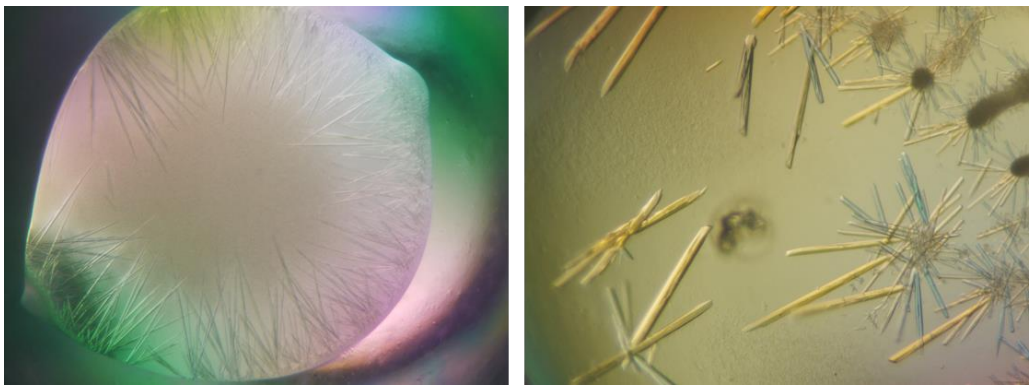


Abbildung 3.5-1: Kristalle durch Kokristallisation von IpgC-9,-4S mit dem Peptid IpaB10 unter Verwendung der von LUNELLI* et al.*[37] publizierten Bedingung.

Durch eine deutliche Reduktion der PEG-Konzentration wurde versucht, die Anzahl der Kristalle zu verringern. Doch dies hatte nur wenig Einfluss auf das Kristallwachstum. Einen deutlich größeren Effekt hatte die Veränderung des *pH*-Wertes. Als Puffersubstanz kam TRIS zum Einsatz. Während bei einem *pH*-Wert von 7.0 und 7.5 sehr viele kleine Nadeln wuchsen, waren die Nadeln bei einem *pH*-Wert von 8.0 bereits deutlich größer. Ein *pH*-Wert von 8.5 führte zu

einzelnen, großen Kristallen. Dieser *pH*-Wert wurde bei den nachfolgenden Optimierungsversuchen konstant gehalten. Da die Kristalle innerhalb sehr kurzer Zeit wuchsen (meist über Nacht), wurden Kristallisationsversuche bei niedrigerer Temperatur (10°C-Schrank) durchgeführt. Durch die geringere Temperatur konnte das Kristallwachstum verlangsamt werden (3-5 Tage). Die Kristalle besaßen zudem eine schönere Kristallform. Kristalle wuchsen mit *Seeding*, allerdings gelang die Kristallisation auch ohne. Es konnte durch *Seeding* kein deutlicher Unterschied beobachtet werden. Wurden ohne *Seeding* PEG-Konzentrationen von 17-20 % (*w*/*V*) benötigt, waren es mit *Seeding* 13-16 %. Die besten Kristalle konnten mit 15-19 % PEG 8000, 8 % (*V*/*V*) Ethylenglykol und 0.1 M TRIS *pH* 8.5 bei 10 °C erhalten werden. Die unter dieser Bedingung gewachsenen Kristalle sind in **Abbildung 3.5-2** gezeigt. Die Kristalle hatten größtenteils eine ausgeprägte trigonale Morphologie. Als Kryo-Reagenz wurde PEG 8000 in einer Endkonzentration von 25 % eingesetzt. Am eigenen Röntgengerät zeigten die Kristalle eine maximale Auflösung von 2.3 Å. Am Synchrotron in Berlin (*BESSY II*, *Beamline* 14.1) konnte ein Datensatz mit einer Auflösung von 1.88 Å gesammelt werden („mlm63“). Die Raumgruppe war R3 und damit nicht identisch zu den Raumgruppen, die von LUNELLI *et al*. bzw. LOKAREDDY *et al.* bestimmt worden waren. Bei LUNELLI *et al*. lag die Raumgruppe $C222_1$ vor, bei LOKAREDDY *et al*. die Raumgruppe $P3_121$.[37,40] Die Zellparameter des in dieser Arbeit erhaltenen Datensatzes betrugen 104.7, 104.7 und 89.9 Å, 90, 90 und 120°.

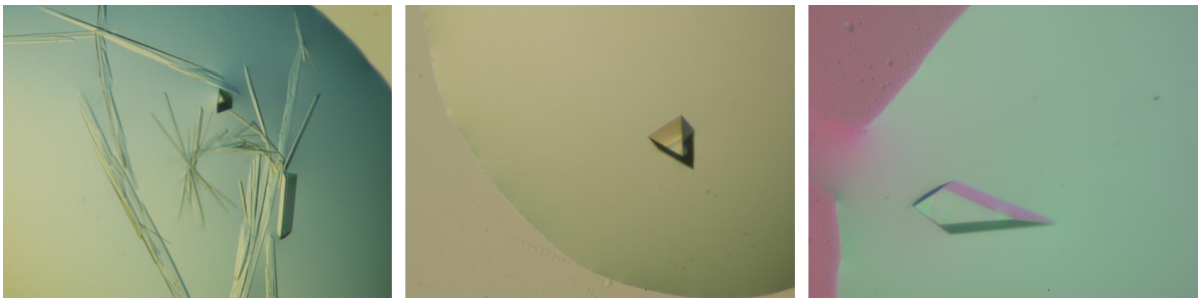


Abbildung 3.5-2: Kristalle von IpgC-9,-4S im Komplex mit dem Peptid IpaB10 nach erfolgreicher Optimierung der Bedingung von LUNELLI et al.[37].

Mit 1.88 Å ist die Auflösung des in dieser Arbeit erhaltenen Datensatzes zwar besser als die Auflösung von den bereits in der PDB deponierten Komplexstrukturen (vgl. **Tabelle 3.5-2**), allerdings war die Elektronendichte für das Peptid nicht sehr gut erkennbar und auch sonst überzeugte die Qualität der Elektronendichte nicht. Daher wurde die Struktur nicht weiter verfeinert. Auch die Erhöhung der eingesetzten Peptidmenge auf den 20-fachen bzw. 30-fachen K_D-Wert erbrachte keine verbesserte Elektronendichte für das Peptid. Es lässt sich nur vermuten, warum die Elektronendichte des Peptids trotz besserer Auflösung unzureichend

war. Der Grund dafür könnte eventuell sein, dass die ersten 32 Aminosäuren von IpgC nicht im Modell enthalten waren. Dieser Bereich des Proteins schien hier eine völlig andere Konformation einzunehmen, als in der Struktur von LUNELLI *et al.* beobachtet werden kann. Es war zwar Differenzelektronendichte für die *α*-Helix 1 beider Proteinketten vorhanden, doch der Einbau gestaltete sich aufgrund unzureichend definierter Elektronendichte für den langen *Loop* als sehr schwierig und gelang letzten Endes auch nicht unter Verwendung des *ARP/wARP Web Services,* einer automatisierten Software für makromolekularen Modellbau[104,105].

3.5.2. Kokristallisation von IpgC mit dem Bindungsepitop von MxiE

MARXTAL-*Screen* Nr. 1

Um Kristalle von IpgC im Komplex mit dem Bindungsepitop von MxiE zu erhalten, wurde zunächst am MARXTAL eine ausgiebige Suche nach einer geeigneten Kristallisationsbedingung durchgeführt. Diese umfasste 16 *Screens* mit je 96 unterschiedlichen Bedingungen (siehe **Kapitel 5.7**, **Tabelle 5.7-1**). Pro Bedingung wurden zwei Tropfen pipettiert. Einer der beiden Tropfen bestand aus 10 mg/mL IpgC0,-4S-Lösung und dem Peptid MxiE10S (10-facher K_D-Wert). Pro 800 µL Proteinlösung wurden 1.6 mg MxiE10S eingesetzt. Der zweite Tropfen beinhaltete ein anderes Peptid (siehe **Kapitel 3.5.3**). Leider konnten mithilfe dieses *Screens* keine Bedingungen ermittelt werden, die zum Entstehen von Kristallen führten.

MARXTAL-*Screen* Nr. 2

Später wurde ein weiterer *Screen* am MARXTAL durchgeführt. Dieses Mal wurde für die Kokristallisation mit MxiE10S (10-facher K_D-Wert) die Proteinvariante IpgC-9,-4S (10 mg/mL) verwendet. Hier konnte im Gegensatz zu dem *Screen*, welcher mit der Variante IpgC0,-4S durchgeführt worden war, eine deutliche Veränderung mancher Tropfen beobachtet werden. Darunter fielen die Bedingungen **Core I A12**, **Core III B5** und **JSCG D6**, die sich in ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich sind (siehe **Tabelle 3.5-3**). Ebenso war **MBC II A5** unter den in der engeren Auswahl befindlichen Bedingungen. Exakt die gleiche Bedingung war allerdings bereits aus der Literatur bekannt (vgl. **Tabelle 3.5-2**) und konnte nicht reproduziert werden.[40] Zudem gab es zwei Bedingungen, die auch im Tropfen mit zugegebenem IpaC10.5 ähnliche Ergebnisse lieferten, nämlich **Core III E3** und **MBC I H3**. Da es zwei vielversprechendere Kristallisationsbedingungen gab, wurden die oben genannten Bedingungen zunächst nicht getestet.

Tabelle 3.5-3: Zusammensetzung der bei MARXTAL-Screen Nr. 2 ermittelten Hits.

Screen	Zusammensetzung
Core I A12	0.2 M Magnesiumacetat, 20 % PEG 3350
Core III B5	0.2 M Natriumacetat, 0.1 M TRIS *pH* 8.5, 30 % PEG 4000
JSCG D6	0.2 M Magnesiumchlorid, 0.1 M TRIS *pH* 8.5, 20 % PEG 8000
MBC II A5	0.1 M ADA *pH* 6.5, 1 M Ammoniumsulfat
Core III E3	0.1 M MES *pH* 6.5, 1.6 M Ammoniumsulfat, 10 % (*V*/*V*) 1,4-Dioxan
MBC I H3	1.5 M Dikaliumhydrogenphosphat
Anions A4	0.1 M Natriumacetat *pH* 4.6, 0.6 M Trinatriumcitrat
Morpheus I A6	30 % (*w*/*V*) *EDO_P8K* (20 % (*V*/*V*) Ethylenglycol und 10 % PEG 8000), 0.1 M *Morpheus buffer 2 pH* 7.5 (0.05 M MOPS und 0.05 M HEPES, *pH* 7.5), 0.06 M *Morpheus divalents* (0.03 M $MgCl_2$ und 0.03 M $CaCl_2$)

In den Bedingungen **Anions A4** und **Morpheus I A6** konnte eindeutig Kristallwachstum beobachtet werden (siehe **Abbildung 3.5-3**).

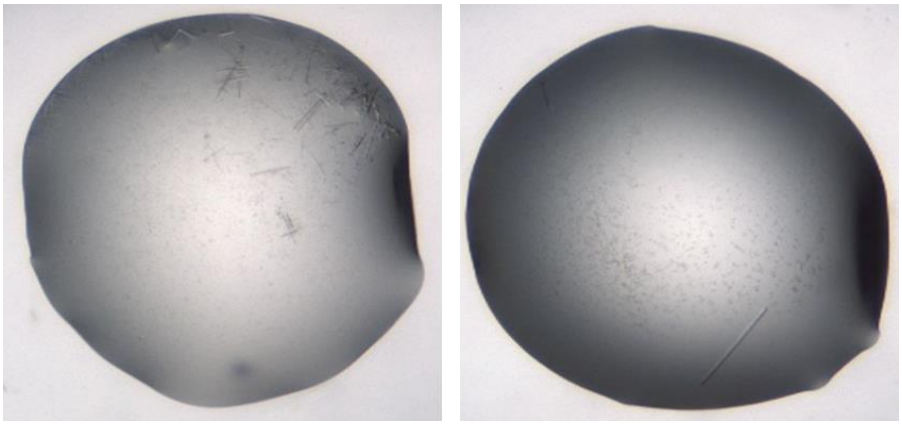


Abbildung 3.5-3: Kristalle aus dem MARXTAL-Screen mit IpgC-9,-4S und MxiE10S. *Links:* ***Anions A4.*** *Rechts:* ***Morpheus I A6.***

Diese beiden Bedingungen wurden im eigenen Labor nachgestellt. Die Reproduktion von **Anions A4** gelang, die Kristalle besaßen jedoch eine völlig andere Kristallform (Kristalle nicht gezeigt). Weitere Optimierungsversuche wurden im Verlauf dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht durchgeführt. Die Reproduktion von **Morpheus A6** führte nach wenigen Ansätzen zu Kristallen, die den im MARXTAL-*Screen* gewachsenen Kristallen sehr ähnlich sahen. Es handelte sich um lange Nadeln bzw. Stäbchen (siehe **Abbildung 3.5-4**). Die Reproduktion gelang unter Anwendung der *hanging drop*-Methode und mit einer leicht erhöhten Konzentration an *Morpheus divalents* (0.08-0.09 M). Im Reservoir befanden sich 300 µL der Kristallisationslösung. Der Tropfen bestand aus 1 µL Proteinlösung und 1 µL Kristallisationslösung. Diese Kristalle wurden anschließend als *Seed*-Kristalle verwendet.

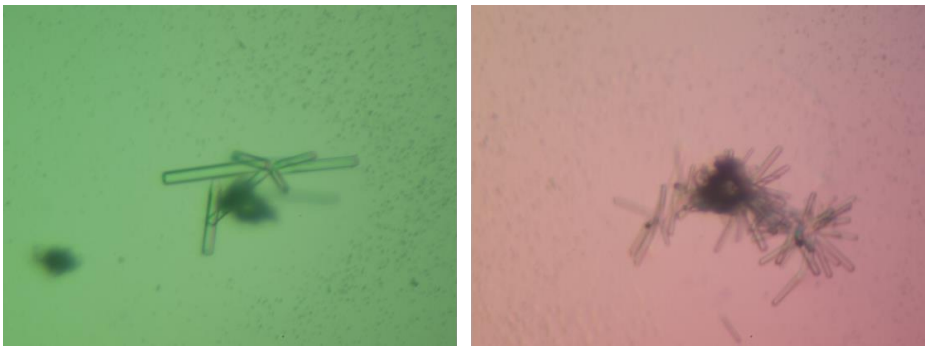


Abbildung 3.5-4: Kristalle nach erfolgreicher Reproduktion von Morpheus I A6 mit IpgC-9,-4S und MxiE10S.

Es wurden die Anteile an *EDO_P8K*, *Morpheus buffer 2* und *Morpheus divalents* variiert. Zusätzlich wurden die Anteile von PEG 8000 und Ethylenglykol in *EDO_P8K* und die Anteile an $MgCl_2$ und $CaCl_2$ in *Morpheus divalents* verändert. Außerdem wurde *Morpheus buffer 2* durch HEPES bzw. MOPS als Einzelkomponente mit unterschiedlichen *pH*-Werten ersetzt. Kristalle, die nach Optimierungsversuchen erhalten werden konnten, sind in **Abbildung 3.5-5** dargestellt. Die Kristalle hatten eine hexagonale Morphologie. Die beste Bedingung enthielt 30 % *EDO_P8K*, 0.1 M *Morpheus buffer 2 pH* 7.5, 0.06 M $CaCl_2$ und 0.02 M $MgCl_2$. Es konnten noch weitaus größere und dickere Kristalle erhalten werden, als in **Abbildung 3.5-5** gezeigt. Leider zeigte sich jedoch, dass Kristallwachstum in gleicher Weise stattfand, wenn auf die Zugabe von MxiE10S zum Kristallisationstropfen verzichtet wurde.

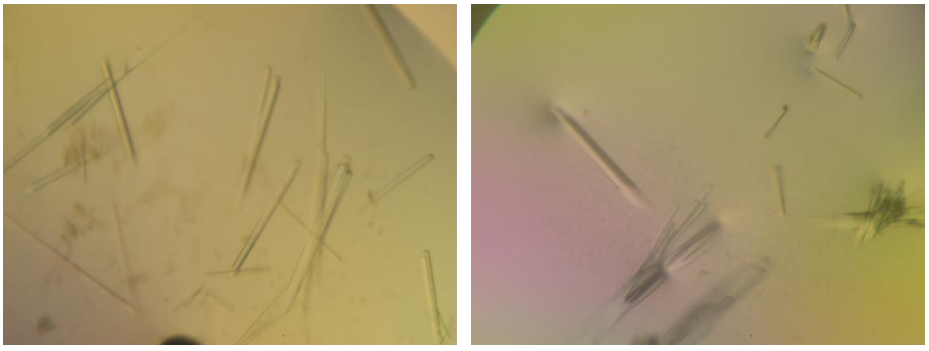


Abbildung 3.5-5: Kristalle nach erfolgreicher Optimierung von Morpheus I A6 mit IpgC-9,-4S und MxiE10S.

Es wurden Kristalle ‚gefischt', in Kryo-Puffer (+10 % PEG 8000) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Auflösung der Kristalle am eigenen Röntgengerät betrug 2.8-3.3 Å. Es wurde ein Kristall am Synchrotron vermessen, der in einem Tropfen mit hinzugefügtem Peptid gewachsen war, allerdings auch ein Kristall, der aus einem Tropfen ohne Peptid hervorging („mlm92" ohne MxiE10S, „mlm93" mit MxiE10S). Die Auflösung des Datensatzes von IpgC-9,-4S mit MxiE10S betrug 2.80 Å und die des Datensatzes von IpgC-9,-4S ohne MxiE10S betrug 2.40 Å. Die Raumgruppe war in beiden Fällen $P3_121$, die Zellparameter waren

ebenfalls identisch (122.1, 122.1 und 62.4 Å). Beide Datensätze waren nicht verzwillingt. Beim Betrachten der Struktur fiel auf, dass diese ähnlich war zu der *Apo*-Struktur, die in dieser Arbeit bestimmt werden konnte (siehe **Kapitel 3.8**). Mithilfe von *ARP/wARP* wurde die α-Helix 1 beider Ketten gebaut. Weitere Differenzelektronendichte, die auf ein gebundenes Peptid hingedeutet hätte, war nicht zu erkennen. Es musste also festgestellt werden, dass anstelle eines Komplexes aus Protein und Peptid allein das Protein kristallisiert worden war.

Die hier gefundene Bedingung könnte als Ersatz für die aus **Classics H4** hervorgegangene Bedingung für das *Apo*-Protein dienen, da hier keine Verzwilligung aufgetreten ist, zumindest nicht bei den zwei bislang vermessenen Kristallen. Eine Tendenz dieser Kristallisationsbedingung zur Verzwilligung kann allerdings dadurch nicht ausgeschlossen werden.

Kokristallisationsversuche mit der Bedingung für das *Apo*-Protein

Es wurde ein Versuch unternommen, die Komplexstruktur von IpgC-9,-4S mit MxiE10S durch Kokristallisation zu erhalten, indem lediglich zu der Kristallisationsbedingung für das *Apo*-Protein (vgl. **Kapitel 3.7**) MxiE10S hinzugegeben wurde. Von MxiE10S wurde der 20-fache K_D-Wert eingesetzt. Die sonstige Durchführung der Kristallisation blieb unverändert. Dabei wurden Kristalle erhalten, die in Form und Größe den *Apo*-Kristallen ähnlich waren. Die Struktur wurde bestimmt. Es musste allerdings auch hier festgestellt werden, dass keine zusätzliche Elektronendichte für MxiE10S vorhanden war. Es war auch hier lediglich das Protein, welches kristallisiert wurde und nicht der Komplex aus Protein und Peptid.

MARXTAL-*Screen* Nr. 3

Bei diesem *Screen* enthielt einer der beiden Tropfen das Volllängenprotein IpgC und das Peptid MxiE10S (20-facher K_D-Wert). Hier wurde das Volllängenprotein gewählt, da aufgrund bislang fehlender Ergebnisse Bedenken aufkamen, ob die in den anderen Varianten fehlenden Aminosäuren für die Interaktion mit MxiE10S doch notwendig sein könnten. Der *Screen* erfolgte bei 20 °C und führte zu einem vielversprechenden *Hit*, nämlich **MBC I B4**. Bei dieser Bedingung betrug die Proteinkonzentration 5 mg/mL. Die durch den *Screen* erhaltenen Kristalle sind in **Abbildung 3.5-6** gezeigt. Die Bedingung bestand aus 0.1 M Natriumkaliumtartrat, 0.1 M TRIS *pH* 8.5 und 0.4 M Magnesiumsulfat. Das in **Abbildung 3.5-6** links gezeigte Bild ist fünf Tage nach Ansetzen der Kristallplatten aufgenommen worden. Nach neun bzw. 14 Tagen wurde ein weiteres Bild aufgenommen. Beim Vergleich dieser Bilder fällt auf, dass die Kristalle

im Laufe der Zeit kleiner geworden waren, sich folglich also teilweise aufgelöst hatten. Reproduktionsversuche dieser Bedingung blieben ohne Erfolg.

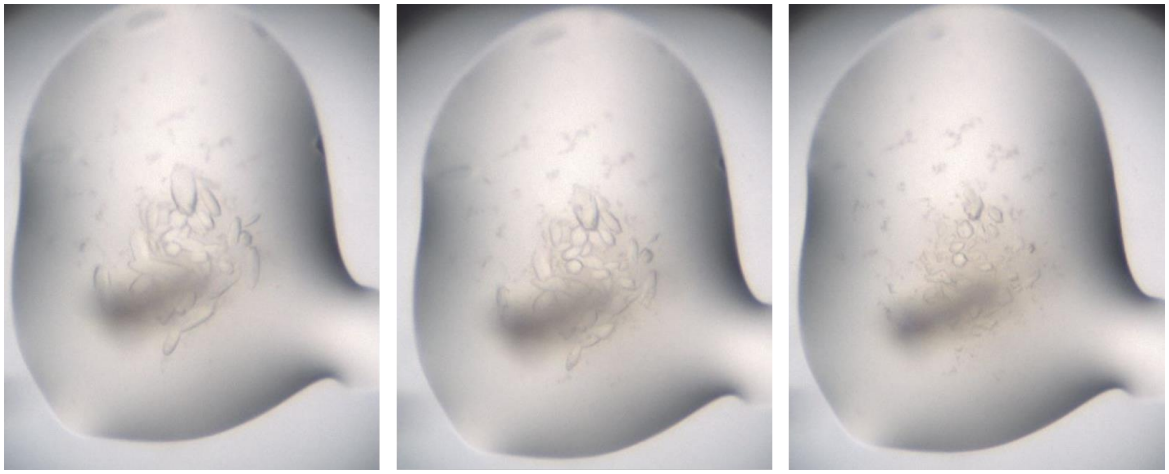


Abbildung 3.5-6: Kristalle der Bedingung MBC I B4 aus dem MARXTAL-Screen mit dem IpgC-Volllängenprotein und MxiE10S. *Von links nach rechts: Kristalle nach fünf Tagen, neun Tagen, 14 Tagen.*

3.5.3. Kokristallisation von IpgC mit dem Bindungsepitop von IpaC

MARXTAL-*Screens*

Um Bedingungen für die Kokristallisation von IpgC0,-4S bzw. IpgC-9,-4S mit dem Peptid IpaC10.5 zu identifizieren, wurden MARXTAL-*Screens* in Auftrag gegeben. Hierbei ergab sich jedoch eine Schwierigkeit. Die Löslichkeit des Peptids war so gering, dass davon auszugehen war, dass sich keine ausreichende Menge davon in Lösung befand. Der unlösliche Anteil wurde vor Durchführung der *Screens* abzentrifugiert. Beim Betrachten der Tropfen, welche während des MARXTAL-*Screens* erzeugt worden waren, konnten keine vielversprechenden Bedingungen ermittelt werden. Um die Löslichkeit des Peptids zu verbessern, wurde es an seinem C-Terminus um die Aminosäure Aspartat (D) erweitert. Das resultierende Peptid wurde als „IpaC11“ (Sequenz: LLKLSEQVQH**D**) bezeichnet. Leider stellte sich jedoch heraus, dass das von GENSCRIPT geordertе Peptid im Vergleich zu IpaC10.5 keine verbesserte Löslichkeit aufwies.

Verwendung der von LUNELLI *et al.* für IpgC0,-4S und das Bindungsepitop von IpaB publizierten Bedingung

In **Kapitel 3.5.1** wurde bereits die Reproduktion der Kristallisationsbedingung von LUNELLI *et al.* für IpgC0,-4S und das Bindungsepitop von IpaB beschrieben. Aus der Literatur ist bekannt, dass PopD und PopB (die IpaC- bzw. IpaB-orthologen Proteine aus *Pseudomonas aeruginosa*) in ähnlicher Weise mit PcrH (dem IpgC-orthologen Protein aus *Pseudomonas aeruginosa*) interagieren.[106,107] Daher wurde versucht, die Kristallisationsbedingung aus **Kapitel 3.5.1** für die Kokristallisation von IpgC-9,-4S und dem Bindungsepitop von IpaC zu verwenden. Die dort beschriebene Kristallisationsbedingung wurde übernommen. Es wurde lediglich eine größere Menge an IpaC11 eingesetzt, um bei möglicher Ausbildung des Komplexes eine bessere Elektronendichte für das Peptid zu erhalten. Das bei diesen Kristallisationsversuchen verwendete IpaC11-Peptid war freundlicherweise von DR. DANIELA MÜLLER (THM Gießen) synthetisiert worden und erwies sich als besser löslich als das von der Firma GENSCRIPT bezogene Peptid. Es wurde der 20-fache bzw. 30-fache K_D-Wert (von HASEWINKEL für IpaC10.5 bestimmt) eingesetzt (0.48-0.72 mg auf 120 µL Proteinlösung). Tatsächlich konnten hier Kristalle erhalten werden, welche die gleiche Morphologie aufwiesen wie die Kristalle, die auch mit dem Peptid IpaB10 erhalten worden waren. Durch Optimierungsversuche, welche lediglich aus der Variation der PEG-Konzentration und dem Verhältnis von Protein- zu Reservoirlösung im Kristallisationstropfen bestanden, konnten relativ große trigonale Stäbchen erhalten werden (siehe **Abbildung 3.5-7**). Eine PEG-Konzentration im Bereich von 20-25 % (*w*/*V*) eignete sich am besten. Einen positiven Effekt hatte zudem die Verwendung eines höheren Anteils an Proteinlösung im Kristallisationstropfen (beispielsweise 2.5:1 oder 2.0:1.5). Auch die Kristallisation bei niedrigerer Temperatur (10 °C) lieferte bessere Ergebnisse. Es konnte so beispielsweise ein länglicher Kristall erhalten werden, der eine Dicke von 216 µm aufwies (nicht gezeigt). Die Kristalle wurden in Kryo-Puffer (finale PEG-Konzentration: 30 %) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Am Synchrotron konnten zwei Datensätze mit einer Auflösung von 2.62 Å („mlc12“) bzw. 2.70 Å („mlc10“) gesammelt werden. Die Raumgruppe war auch hier R3, die Zellparameter waren ebenfalls identisch zu denen aus **Kapitel 3.5.1.** Trotz großer Bemühungen konnte leider in beiden Fällen keine Strukturlösung erzielt werden. Die Gründe dafür blieben unklar.

In Anwesenheit des Peptids MxiE10S konnte mit dieser Kristallisationsbedingung kein Kristallwachstum beobachtet werden. Ebenso wurde kein Kristallwachstum beobachtet, wenn versucht wurde, das Protein ohne die Zugabe eines Peptids zu kristallisieren. Daher könnte das hier beobachtete Kristallwachstum durchaus darauf hindeuten, dass IpaC11 strukturell einen ähnlichen Komplex mit IpgC eingeht, wie das IpaB-Peptid.

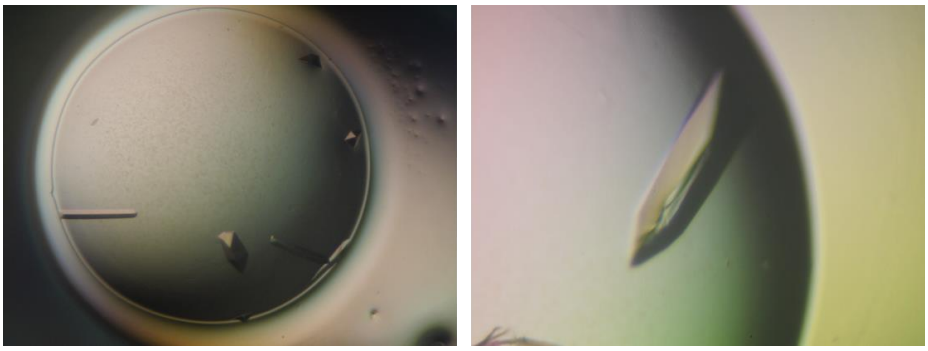


Abbildung 3.5-7: Kristalle durch Kokristallisation von IpgC-9,-4S mit IpaC11. *Diese Kristalle sind nach erfolgreicher Optimierung der aus der Literatur bekannten Bedingung für IpgC0,-4S und das Bindungsepitop von IpaB gewachsen (siehe* ***Kapitel 3.5.1****).*

3.5.4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte zwar die aus der Literatur bekannte Kristallisationsbedingung für das Chaperon IpgC mit dem Bindungsepitop von IpaB reproduziert werden, allerdings waren die Kokristallisationsversuche mit den Bindungsepitopen der Proteine MxiE und IpaC nicht erfolgreich. Eine Komplexstruktur von IpgC mit dem MxiE- bzw. IpaC-Peptid konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht erhalten werden.

Die Schwierigkeiten bei der Kokristallisation von Proteinen mit Peptiden liegen zum einen darin begründet, dass es Kristallen nicht anzusehen ist, ob sie ein gebundenes Peptid enthalten oder nicht. In dieser Arbeit konnte mit unterschiedlichen Bedingungen Kristallwachstum erzielt werden, allerdings stellte sich nach erfolgreicher Strukturbestimmung stets heraus, dass das Peptid nicht gebunden hatte.

Zum anderen ist bei Peptiden die weniger zeitintensive und Ressourcen-sparende *Soaking*-Methode, die bei Liganden zum Einsatz kommt, meist nicht zielführend. Das liegt daran, dass die in Proteinkristallen vorhandenen Lösungsmittelkanäle für Peptide häufig zu klein sind und die Interaktionsstellen aufgrund der Kristallpackung meist nicht frei zugänglich. Studien wie z.B. die von BALLONE *et al.*[108], bei denen Peptide in Proteinkristalle *gesoakt* wurden, bilden eher die Ausnahme. Dies erfordert eine Kristallpackung mit hohem Lösungsmittelgehalt und frei zugänglicher Interaktionsstelle. Bei der Kristallstruktur, die in **Kapitel 3.8** vorgestellt wird, ist die Bindestelle für IpaB teilweise durch Symmetrieäquivalente blockiert, sodass in diesem Fall die Komplexstruktur von IpgC und dem Bindungsepitop von IpaB durch *Soaking* nicht erhalten werden könnte.

Bei der Kokristallisation von Proteinen mit Peptiden muss zudem meist für jedes Peptid eine neue Kristallisationsbedingung gefunden werden, es sei denn, es handelt sich um Peptide von ähnlicher Länge und gleicher Interaktionsstelle.

Die Affinitäten, die zwischen Chaperonen und ihren Substraten gemessen werden, liegen üblicherweise im mikromolaren Bereich.[109] Diese geringen Affinitäten können bei der Kokristallisation eines Protein-Peptid-Komplexes zu Problemen führen. Kurze Sequenzen eines Proteins, die an der Interaktion mit einem Partnerprotein beteiligt sind, besitzen meist ohne einen Interaktionspartner keine Sekundärstruktur und liegen ungefaltet vor.[110] Die Energie, die bei der Bildung eines Kristalls durch Interaktion mit Symmetrieäquivalenten gewonnen

wird, liegt in etwa in der gleichen Größenordnung wie die Energie, die bei der Protein-Peptid-Komplexbildung frei wird.[110] Damit stehen diese beiden Prozesse in Konkurrenz zueinander.

An dieser Stelle soll noch einmal auf die Kokristallisationsversuche mit MxiE10S eingegangen werden. Wie in **Kapitel 3.5.2** beschrieben, wurde versucht, mithilfe der Kristallisationsbedingung des *Apo*-Proteins die Komplexstruktur für IpgC und MxiE10S zu erhalten. Kristallwachstum fand statt und die Kristalle sahen den *Apo*-Kristallen sehr ähnlich, allerdings konnte nach Strukturbestimmung keine Elektronendichte für das Peptid beobachtet werden. Wie lässt sich das erklären? Es wäre zu erwarten gewesen, dass entweder das Peptid mit einem Bereich des Proteins interagiert, der sich im *Interface* des in der asymmetrischen Einheit vorhandenen Dimers befindet und es folglich zu keiner Kristallbildung kommt. Andererseits könnte auch eine völlig neue Kristallform entstehen oder das Peptid könnte mit einem Bereich des Proteins interagieren, der frei zugänglich ist, sodass es in der Elektronendichte detektiert wird. Hier kommt eventuell die im vorherigen Abschnitt angesprochene Kompetition zwischen der Interaktion mit Symmetrieäquivalenten und der Protein-Peptid-Komplexbildung zum Tragen. Es könnte sein, dass die Affinität des Peptids nicht ausreicht, um im *Interface* des Dimers zu binden, um so die Kristallbildung zu verhindern bzw. die Bildung einer neuen Kristallform zu begünstigen.

In der Literatur werden viele Methoden beschrieben, wie durch Protein-*Engineering* die Kristallisation von Proteinen erleichtert werden kann.[111,112] Allerdings gibt es nur wenig Literatur darüber, wie ungewollte Kristallpackungsinteraktionen verhindert werden können. Durch Verringerung der Interaktionen mit Symmetrieäquivalenten (beispielsweise durch Mutation interagierender Aminosäuren) wird zwar die Protein-Peptid-Komplexbildung wahrscheinlicher, allerdings nimmt gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit ab, dass es überhaupt zur Kristallbildung kommt. Im Falle der Wechselwirkung von IpgC mit MxiE kommt hinzu, dass die genaue Interaktionsstelle unbekannt ist und daher rationale Protein-*Engineering*-Methoden nicht wirklich weiterhelfen. Letztendlich ist auch die Kokristallisation von Proteinen mit Peptiden größtenteils ein ‚*trial and error*'-Prozess, wie auch die Kristallisation eines *Apo*-Proteins.

3.6. Kristallisationsversuche mit IpgC

3.6.1. Verwendung von IpgC0,-4S

Versuch der Reproduktion bekannter Bedingungen

Zu Beginn dieser Arbeit existierten in der Literatur bereits fünf Kristallisationsbedingungen für das Protein IpgC (siehe **Tabelle 3.6-1**).[37,40,113] Drei davon bewirken die Kristallisation des *Apo*-Proteins, die beiden anderen die Kokristallisation von IpgC mit dem Bindungsepitop von IpaB. Alle für das *Apo*-Protein bekannten Bedingungen sollten getestet werden.

Tabelle 3.6-1: Bekannte IpgC-Kristallisationsbedingungen für das* Apo-*Protein.

Referenz	Proteinvariante	PDB-Code (Auflösung)	Kristallisationsbedingung
BARTA *et al.*[113]	$IpgC^{10-155}$ (IpgC-9,0S)	3ks2 (3.30 Å)	0.2 M $MgCl_2$ x 6 H_2O 0.1 M BIS-TRIS *pH* 6.5 25 % PEG 3350
BARTA *et al.*[113]	$IpgC^{21-155}$	-	0.1 M HEPES *pH* 7.5 2 M Ammoniumformat
LUNELLI *et al.*[37]	$IpgC^{1-151}$ (IpgC0,-4S)	3gyz (2.15 Å)	0.1 M ADA *pH* 6.5 1 M Ammoniumsulfat

Mit allen drei Bedingungen wurden Kristallplatten angesetzt. Dabei wurden die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile in der Reservoirlösung variiert. Auch die Puffersubstanz wurde durch andere Puffersubstanzen ersetzt und andere *pH*-Bereiche wurden getestet. Das Verhältnis von Reservoir- zu Proteinlösung im Kristallisationstropfen wurde variiert. Leider war es jedoch nicht möglich, auch nur eine dieser Bedingungen im eigenen Labor zu reproduzieren.

Reproduktion und Optimierung der Bedingung **Core IV E8**

Um dennoch eine Kristallisationsbedingung für IpgC zu ermitteln, wurde ein Kristallisations-*Screen* am MARXTAL in Auftrag gegeben. Es wurden dort Platten mit 13 kommerziell erhältlichen Kits und jeweils 96 verschiedenen Bedingungen angesetzt (siehe **Kapitel 5.7.1**). Die dafür verwendete Proteinlösung bestand aus 10.7 mg/mL IpgC0,-4S in 10 mM HEPES *pH* 7.5, 150 mM NaCl und 3 mM DTT. Die Platten wurden bei 18 °C gelagert. Es konnte eine Bedingung ermittelt werden, die Kristalle entstehen ließ. Die Bedingung **Core IV E8** führte zu sieben stäbchenförmigen Kristallen (siehe **Abbildung 3.6-1**). Die Kristalle erschienen nach etwa sechs Tagen und erreichten nach ungefähr sechs Wochen ihre finale Größe. Die entsprechende Kristallisationslösung bestand aus 1 M Natriumkaliumtartrat, 0.2 M Lithiumsulfat und 0.1 M TRIS *pH* 7.0.

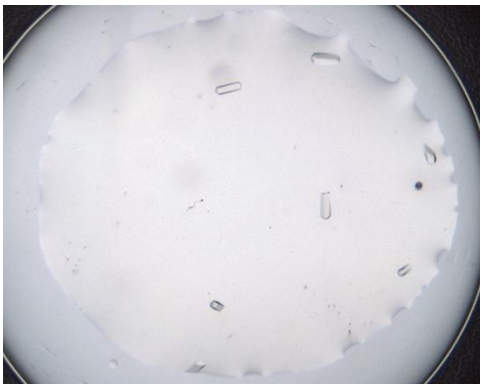


Abbildung 3.6-1: Kristalle der Bedingung Core IV E8 aus dem MARXTAL-Screen mit IpgC0,-4S.

Kristalle aus diesem Tropfen wurden ‚gefischt', in Kristallisationslösung mit hinzugefügtem Kryo-Reagenz (30 % Glycerol) überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und am Deutschen Elektronensynchrotron (*DESY*, Hamburg) vermessen. Sie zeigten nur geringes Streuvermögen (≥ 6 Å), was vermutlich an ihrer geringen Größe lag. Allerdings konnte den Streubildern entnommen werden, dass es sich hierbei um Proteinkristalle handelte (Streubilder nicht gezeigt). Es folgte der Versuch, diese Kristallisationsbedingung im eigenen Labor zu reproduzieren. Dazu kam zunächst die *hanging drop*-Methode zum Einsatz. Anfangs wurden Originallösungen der Firma QIAGEN *(NeXtal Stock Solutions)* und frisches Protein (direkt nach erfolgter Proteinreinigung) verwendet. Im Reservoir befanden sich 500 µL der jeweiligen Kristallisationslösung. Der Kristallisationstropfen bestand aus 2 µL Protein- und 2 µL Reservoirlösung. Die Kristallplatten wurden bei 18 °C gelagert. Das Testen unterschiedlicher Konzentrationen an Lithiumsulfat (0.1-0.25 M), unterschiedlicher Konzentrationen an Natriumkaliumtartrat (0.6-1.2 M) und die Verwendung unterschiedlicher Puffersubstanzen mit verschiedenen *pH*-Werten führten letztendlich zum Erfolg. Nach etwa vier Wochen konnten Kristalle in den ersten Tropfen beobachtet werden (siehe **Abbildung 3.6-2**). Meist sah es aus, als sei ein großer Kristall in sehr viele kleine Kristalle zerfallen. Der große Kristall besaß raue, die kleineren Kristalle dagegen scharfe Kanten.

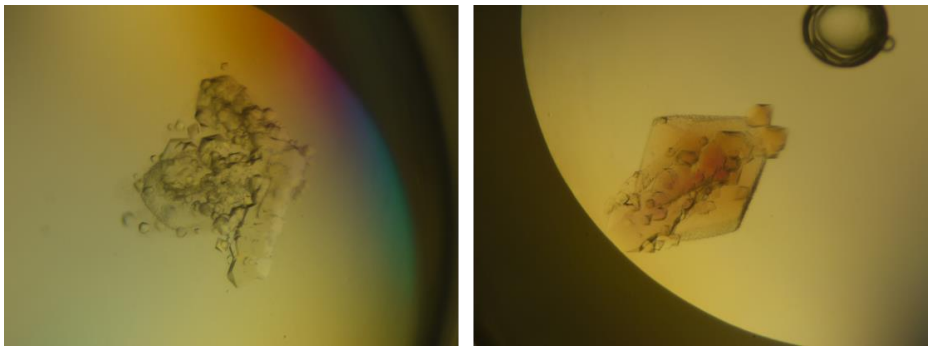


Abbildung 3.6-2: IpgC0,-4S-Kristalle nach erfolgreicher Reproduktion von Core IV E8 im eigenen Labor.

Unter Verwendung von 0.9-1 M Natriumkaliumtartrat, 0.1 M HEPES *pH* 6.5 bzw. 0.1 M TRIS *pH* 7 und 0.1-0.2 M Lithiumsulfat konnten Kristalle erhalten werden. Unter Verwendung selbst hergestellter Lösungen konnten ebenfalls Kristalle erhalten werden und ebenso, wenn Protein verwendet wurde, welches nach erfolgter Reinigung zunächst bei -80 °C eingefroren wurde. Leider dauerte es stets mehrere Wochen, bis Kristalle auf den Platten zu erkennen waren. Daher wurde versucht, die Kristallisationsdauer mithilfe der *streak-seeding*-Methode zu verkürzen. Durch diese Methode konnten Kristalle binnen weniger Tage beobachtet werden (siehe **Abbildung 3.6-3**). In der Zwischenzeit war auf die *sitting-drop*-Methode gewechselt worden, welche sich ebenfalls als zielführend erwiesen hatte.

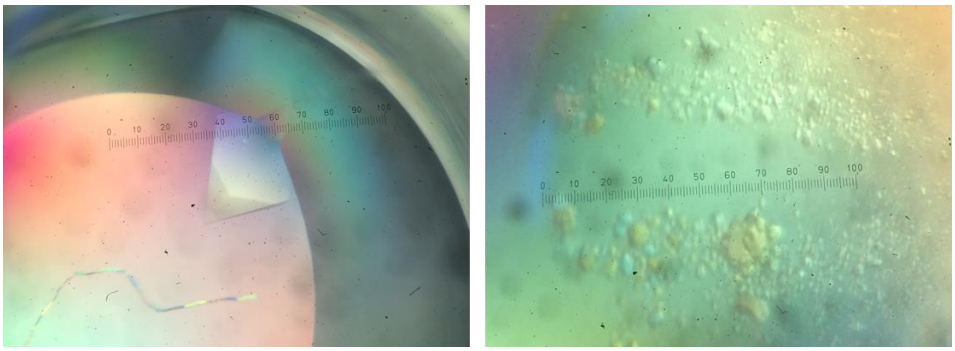


Abbildung 3.6-3: Durch* Seeding *gewachsene IpgC0,-4S-Kristalle der Bedingung Core IV E8.

Veränderung des Verhältnisses von Protein- zu Reservoirlösung im Kristallisationstropfen

Um die Kristallisation weiter zu optimieren, wurde der Anteil an Protein- zu Reservoirlösung im Kristallisationstropfen variiert. Es wurden sowohl 1.5 µL Protein- und 1 µL Reservoirlösung als auch 1.5 µL Reservoir- und 1 µL Proteinlösung getestet. Ein höherer Anteil an Reservoirlösung führte zu einer höheren Anzahl an optisch schöneren Kristallen. Die durch Optimierungsversuche erhaltenen Kristalle sind in **Abbildung 3.6-4** gezeigt. Auch bei einer Temperatur von 4 °C wuchsen Kristalle. Die Kristallisation bei 4 °C hatte einen Vorteil. Die Kristalle klebten nicht am Boden fest und konnten daher leichter ‚gefischt' werden.

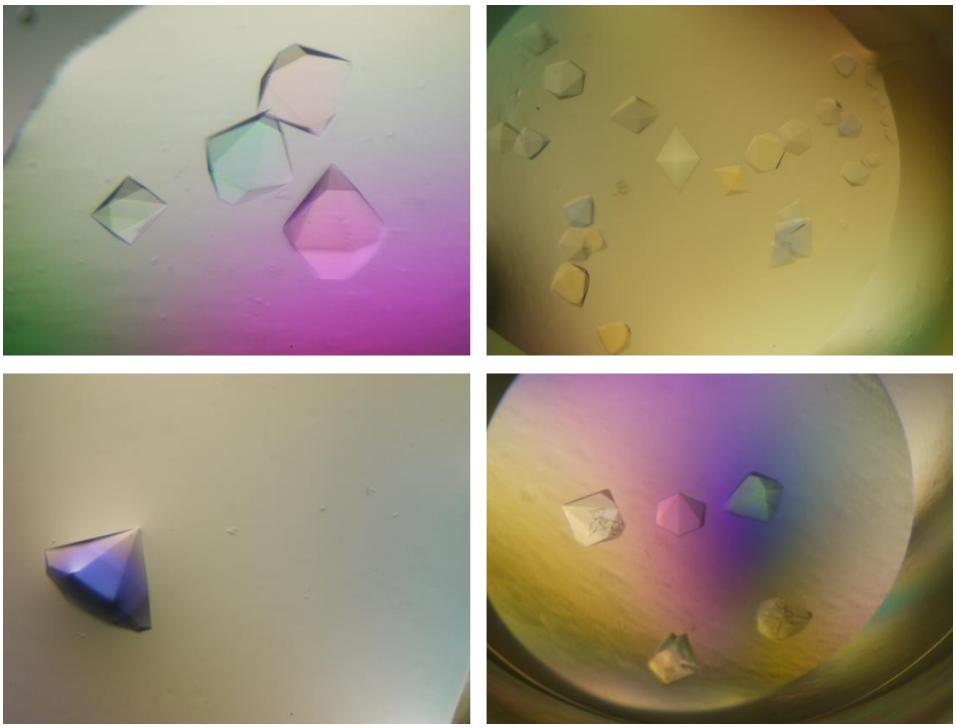


Abbildung 3.6-4: IpgC0,-4S-Kristalle der Bedingung Core IV E8 nach Optimierung im eigenen Labor.

Verwendung von Glycerol als Additiv

Auf der Suche nach hilfreichen Additiven wurde u.a. Glycerol getestet. Bei Zugabe von 5, 10, 15 bzw. 20 % Glycerol konnte immer noch Kristallwachstum beobachtet werden. Glycerol begünstigte sogar die Kristallisation. Dies lässt sich damit begründen, dass ein Kristallisationstropfen mit Glycerol eine deutlich höhere Viskosität aufweist und dadurch bei Anwendung der *streak-seeding*-Methode mehr *Microseed*-Kristalle im neuen Kristallisationstropfen verbleiben.

Die oben beschriebenen Kristalle wurden in Kryo-Puffer überführt und ‚gefischt'. Als Kryo-Reagenz wurden 35 % Glycerol eingesetzt. Trotz großer Optimierungserfolge hinsichtlich des Aussehens der Kristalle konnte am eigenen Röntgengerät nur eine Auflösung von maximal 6 Å erzielt werden. Es wurden Kristalle an verschiedenen Synchrotron-Einrichtungen vermessen (*ELETTRA* (Trieste, Italien), *ESRF* (Grenoble, Frankreich) und *DESY* (Hamburg, Deutschland)). Dort betrug die maximale Auflösung der Kristalle 3 Å. Es stellte sich heraus, dass die Kristalle mit 70 % einen sehr hohen Lösungsmittelgehalt besaßen, was vermutlich der Grund für das schlechte Streuvermögen war. Da auch mittels Additiv-*Screen* keine Verbesserung erzielt werden konnte, wurde auf weitere Optimierungsversuche verzichtet.

3.6.2. Suche nach einer leichter zu kristallisierenden IpgC-Variante unter Anwendung des Konzepts der „*Surface Entropy Reduction*“

Bei der Suche nach einer Proteinvariante, die leichter zu kristallisieren ist, wurde ein Webserver namens „*Surface Entropy Reduction Prediction Server*“, kurz *SERp Server*, verwendet. Dieser Webserver hilft beim Design von Proteinvarianten unter Anwendung der Oberflächenentropiereduktion. Mithilfe des *SERp Servers* konnten drei Cluster identifiziert werden. Diese drei Cluster sind in **Abbildung 3.6-5** gezeigt. Die Cluster sind so angeordnet, dass das Cluster mit dem höchsten *Score*, das heißt mit der höchsten Wahrscheinlichkeit auf Erfolg, an erster Stelle aufgeführt wird. Die Aminosäuren besitzen eine abweichende Nummerierung, da der Server mit einer am N-Terminus verkürzten Variante verwendet wurde. Geeignete Kandidaten weisen üblicherweise einen *Score* von drei oder höher auf. Nach diesem Kriterium kamen zwei Cluster in Frage. Cluster #1 mit einem *Score* von 4.23 umfasste die Aminosäuren 122-125 (hier:114-117), bestehend aus Lys122, Ala123, Lys124 und Glu125. Das Cluster enthielt drei vorgeschlagene Mutationen. Lys122, Lys124 und Glu125 sollten zu Alanin mutiert werden. Diese Aminosäuren gehören zu *α*-Helix 7 (siehe **Abbildung 3.6-6**). Auch das zweite vorgeschlagene Cluster, welches die Aminosäuren 137-140 (hier:129-132) umfasste, besaß mit 3.01 einen *Score* von größer als drei. Auch hier enthielt das Cluster drei Aminosäuren, die zu Alanin mutiert werden sollten, erneut zwei Lysine (Lys138 und Lys140) und ein Glutamat (Glu137). Zwischen Lys138 und Lys140 befindet sich Leu139, welches zwar zum Cluster gehörte, aber dem Vorschlag entsprechend nicht mutiert werden sollte. Cluster #2 befindet sich am N-Terminus von *α*-Helix 8 (siehe **Abbildung 3.6-6**). Cluster #3 besaß einen *Score* unterhalb von drei (2.59) und war demzufolge von den drei Clustern am wenigsten erfolgsversprechend. Es umfasste nur die Aminosäure Lys101 (hier: Lys93), welche zu Alanin mutiert werden sollte. Dieses Lysin ist Teil eines *Loops* und damit das einzige Cluster, welches Aminosäuren eines *Loops* beinhaltete (siehe **Abbildung 3.6-6**), was eigentlich erfolgversprechender erscheint, als Aminosäuren einer *α*-Helix zu mutieren.[114] Der Beitrag der Sekundärstrukturvorhersage hat sich bei Cluster #3 positiv auf den *Score* ausgewirkt. Jedoch war der *Score* insgesamt noch deutlich geringer als der von Cluster #1 bzw. #2. Dies dürfte daran liegen, dass hier nur eine Aminosäure mutiert werden konnte, weil sich keine weiteren Aminosäuren in der Nähe befanden, die ebenfalls für eine Mutation in Frage gekommen wären.

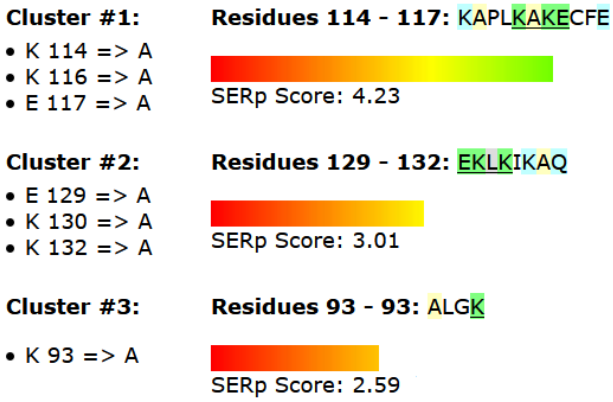


***Abbildung 3.6-5: Darstellung der Ergebnisse des* SERp Servers.** *Für Aminosäuren (engl.* residues*) wird der Einbuchstabencode verwendet. Die Nummer der Aminosäuren stimmt nicht mit den tatsächlichen Positionen der Aminosäuren im Protein überein, da aufgrund der verkürzten Variante Aminosäure 9 als Aminosäure 1 angesehen wurde. Aminosäuren 114-117 entsprechen daher 122-125, Aminosäuren 129-132 entsprechen 137-140 und Aminosäure 93 besitzt die Nummer 101. Die im Cluster enthaltenen Aminosäuren sind unterstrichen. Grün hinterlegt sind Aminosäuren, die für eine Mutation zu Alanin vorgeschlagen werden. Hellblau hinterlegt sind zusätzliche Aminosäuren mit hoher Entropie. Grau hervorgehoben sind Aminosäuren, die innerhalb eines vorgeschlagenen Clusters liegen, jedoch nicht mutiert werden sollen, und gelb hinterlegt sind Aminosäuren mit niedriger Entropie.*

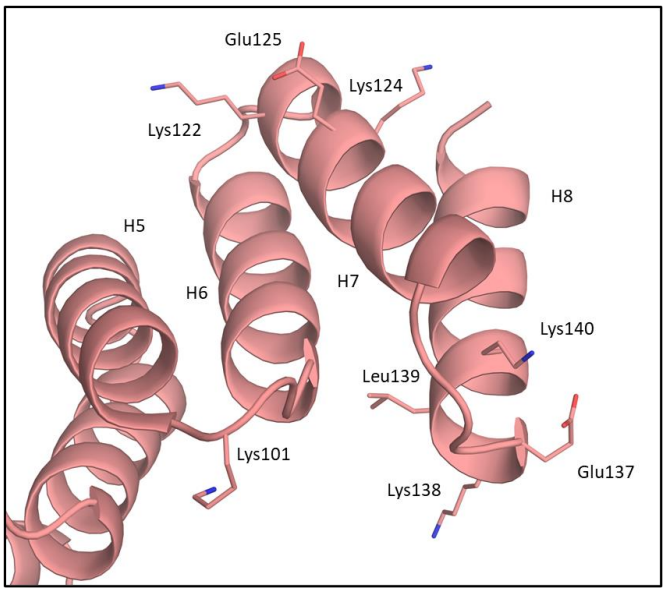


***Abbildung 3.6-6: Position der drei vorgeschlagenen Cluster im Protein.** Das Protein ist als Bändermodell dargestellt. Die Aminosäuren, die Bestandteil der drei Cluster sind, sind zusätzlich als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome sind rosa, O-Atome rot und N-Atome blau. Ala123 ist in dieser Abbildung nicht zu erkennen, da sich die Seitenkette auf der Rückseite der entsprechenden α-Helix befindet. Lys101 ist Teil der Schleife, die α-Helix 5 und 6 miteinander verbindet. Lys122-Glu125 befinden sich am N-Terminus von α-Helix 7. Glu137-Lys140 befinden sich am N-Terminus von α-Helix 8. Für diese Abbildung wurde die Struktur mit dem PDB-Code 3gyz[37] verwendet.*

Es wurde Cluster #1 ausgewählt, da es den höchsten *Score* besaß. Zur Herstellung einer für die Kristallisation geeigneten Proteinvariante wurden die in Cluster #1 enthaltenen vorgeschlagenen Mutationen eingeführt. Lysin122, Lysin124 und Glu125 wurden zu Alanin mutiert. Als Templat diente IpgC-9,-4S. Für die Mutagenese kam das *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (AGILENT TECHNOLOGIES) zur Anwendung. Die Produktion der Proteinvariante wurde entsprechend der Produktion von IpgC bzw. der trunkierten Varianten IpgC0,-4S und IpgC-9,-4S durchgeführt (siehe **Kapitel 5.3.13**).

Die Reinigung dieser IpgC-Variante bestand zunächst, identisch zur Reinigung von IpgC bzw. der trunkierten Varianten, aus einer GSH- und einer anschließenden DEAE-Säulenchromatographie. Das Chromatogramm der GSH-Säule (siehe **Abbildung 3.6-7**) deutete allerdings bereits darauf hin, dass sich nur sehr wenig Protein unter den löslichen Zellbestandteilen befand. Die maximale UV-Absorption betrug etwa 210 mAu. Im Vergleich dazu lag die maximale UV-Absorption bei einer Reinigung der trunkierten Variante IpgC-9,-4S im Bereich von 1400 mAu. Der Peak in **Abbildung 3.6-7** weist gegen Ende der Elution eine seltsame Form auf. Diese lässt sich durch die geringe Absorption erklären, da geringe Mengen an Verunreinigungen bei einer sehr kleinen Proteinmenge stärker ins Gewicht fallen.

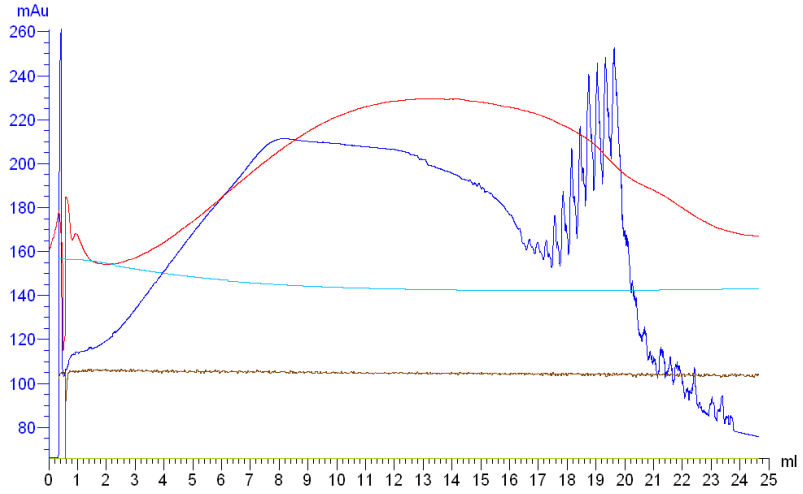


Abbildung 3.6-7: Chromatogramm der GSH-Säule der Reinigung von IpgC-9,-4S-K122A-K124A-E125A. *Auf der Abszisse ist das Elutionsvolumen in mL aufgetragen und auf der Ordinate die UV-Absorption in mAu. Die UV-Absorption ist als dunkelblaue Kurve dargestellt, die Leitfähigkeit als rote Kurve, der Anteil an Puffer B als grüne Kurve (hier konstant bei 0 %), die Temperatur als hellblaue Kurve und der Druck als braune Kurve.*

Auch das Chromatogramm der DEAE-Säule (siehe **Abbildung 3.6-8**) zeigt Peaks mit einer sehr geringen maximalen UV-Absorption. Es ist anzunehmen, dass Peak 1 durch Verunreinigungen verursacht wurde und Peak 2 den Proteinpeak darstellt. Die Proteinmenge war nach der DEAE-Säule bereits so gering, dass auf die eigentlich noch folgende SEC-Säule verzichtet wurde, da es dort noch einmal zu einem nicht unerheblichen Proteinverlust gekommen wäre. Die Reinigung wurde an diesem Punkt abgebrochen.

Eine so geringe Proteinmenge, die kaum einen Peak im Chromatogramm und ebenso keine zu erkennenden Banden auf der SDS-PAGE (hier nicht gezeigt) erzeugt, ist nicht ausreichend für die Durchführung weiterer Experimente, da besonders für die Proteinkristallisation große Mengen an Protein benötigt werden. An diesem Punkt hätte eventuell das Expressionsprotokoll optimiert werden müssen. Allerdings ist anzunehmen, dass die drei vorgenommenen Mutationen zu einer drastischen Veränderung der Proteinlöslichkeit geführt haben. Es wurden keine weiteren Optimierungsversuche durchgeführt, da zeitgleich andere Experimente zum Erfolg geführt hatten.

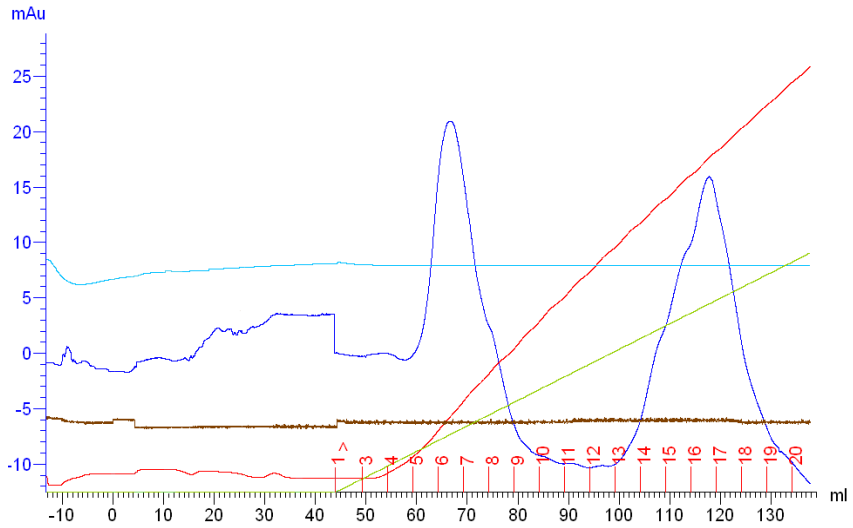


Abbildung 3.6-8: Chromatogramm der DEAE-Säule der Reinigung von IpgC-9,-4S-K122A-K124A-E125A. *Auf der Abszisse ist das Elutionsvolumen in mL aufgetragen und auf der Ordinate die UV-Absorption in mAu. Die UV-Absorption ist als dunkelblaue Kurve dargestellt, die Leitfähigkeit als rote Kurve, der Anteil an Elutionspuffer als grüne Kurve, die Temperatur als hellblaue Kurve und der Druck als braune Kurve. Die Nummern der gesammelten Fraktionen sind als rote Zahlen angegeben. Der Laufmittelgradient wurde nach etwa 45 mL Elutionsvolumen gestartet, ebenso das Sammeln der Fraktionen.*

3.6.3. Verwendung von IpgC-9,-4S

In bereits deponierten Kristallstrukturen von IpgC wurde beobachtet, dass die ersten Aminosäuren am N-Terminus aufgrund fehlender Elektronendichte nie eingebaut werden konnten. Da sich Kristallisationsversuche mit IpgC0,-4S als wenig vielversprechend herausgestellt hatten, wurde versucht, eine zusätzlich am N-Terminus um neun Aminosäuren verkürzte Proteinvariante („IpgC-9,-4S“) für die Kristallisation zu verwenden. Diese Variante war bereits von HASEWINKEL hergestellt, jedoch für keinerlei Experimente verwendet worden.[102]

MARXTAL-*Screen* mit IpgC-9,-4S und *X-TEW* als hinzugefügtes Additiv

Mit IpgC-9,-4S wurde erneut ein Kristallisations-*Screen* am MARXTAL durchgeführt, wobei pro Bedingung zwei unterschiedliche Tropfen pipettiert wurden. Für den ersten Tropfen wurde IpgC-9,-4S mit einer Konzentration von 9.6 mg/mL verwendet, der zweite Tropfen bestand aus IpgC-9,-4S (ebenfalls 9.6 mg/mL) und einem hinzugefügten Additiv. Dieses Additiv trägt den Namen „Anderson-Evans-Polyoxidwolframat“ (*X-TEW*, $[TeW_6O_{24}]^{6-}$). Eine schematische Struktur dieses Additivs ist in **Abbildung 3.6-9** gezeigt. Es wird in der Proteinkristallographie eingesetzt, da es einen positiven Einfluss auf die Qualität von Proteinkristallen haben soll und zudem die Strukturlösung noch nicht aufgeklärter Proteinstrukturen aufgrund der enthaltenen Wolframatome und des dadurch erzeugten anomalen Signals vereinfacht.[115] Mit seiner hohen negativen Ladung geht es bevorzugt über Lysine bzw. Arginine auf der Proteinoberfläche elektrostatische Interaktionen mit dem Protein ein. Es kann somit als Brücke zwischen zwei Proteinmolekülen wirken.[115] Das Additiv wurde zur Proteinlösung in einer finalen Konzentration von 1 mM hinzugegeben.

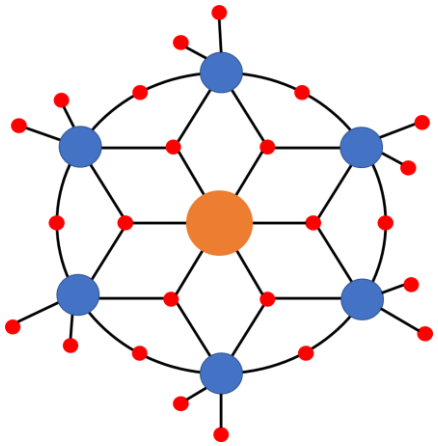


Abbildung 3.6-9: 2D-Kugel-Stab-Modell des Additivs* X-TEW *$[TeW_6O_{24}]^{6-}$. *Das Telluratom ist in Orange gezeigt, die sechs Wolframatome in Blau und die 24 Sauerstoffatome in Rot. Koordinationen sind als schwarze Linien dargestellt.*

Reproduktion der mit *X-TEW* erzielten Kristallisations-*Hits*

Dieser MARXTAL-*Screen* lieferte mehrere durchaus vielversprechende Bedingungen. Die aussichtsreichsten Tropfen waren die, bei denen *X-TEW* zum Protein hinzugefügt worden war. Es waren die Bedingungen **Cryos A1** und **Morpheus I B5**, die Kristalle erzeugten. Unter der Bedingung **Cryos A1** waren sehr viele Kristalle entstanden (siehe **Abbildung 3.6-10** links). Die zweite Bedingung – **Morpheus I B5** – führte zu einem großen Kristall am Rand des Tropfens (siehe **Abbildung 3.6-10** rechts). Die Zusammensetzung der entsprechenden Kristallisationsbedingungen ist in **Tabelle 3.6-2** aufgelistet.

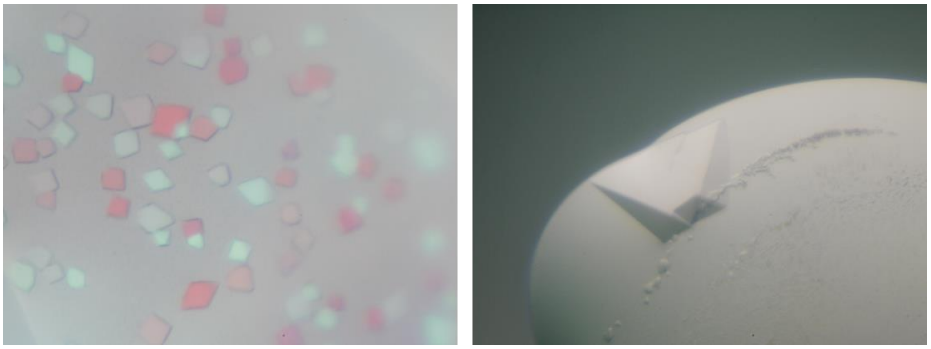


Abbildung 3.6-10: MARXTAL-Hits mit IpgC-9,-4S und X-TEW. *Links:* ***Cryos A1****. Rechts:* ***Morpheus I B5****.*

Kristalle aus der Bedingung **Cryos A1** wurden ‚gefischt' (ohne zusätzliches Kryo-Reagenz, da Glycerol in der Bedingung enthalten war), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und am Synchrotron in Berlin (*BESSY II*, *Beamline* 14.1) vermessen. Überraschenderweise streuten die Kristalle bis 2.45 Å („ML-A43"). Dabei besaßen sie bereits eine raue Oberfläche, da sie zum Zeitpunkt des ‚Fischens' schon etwas älter waren. Die Kristalle besaßen die Raumgruppe $P4_12_12$ und einen Lösungsmittelgehalt von 46 %. Somit konnten Kristalle erhalten werden, die einen geringeren Lösungsmittelgehalt aufwiesen und eine bessere Auflösung hatten, als die in **Kapitel 3.6.1** beschrieben Kristalle.

***Tabelle 3.6-2: Zusammensetzung der mit* X-TEW *erhaltenen* Hits.**

Screen	Zusammensetzung
Cryos A1	0.0085 M Kobalt(II)chlorid, 0.085 M Natriumacetat *pH* 4.6, 0.85 % 1,6-Hexandiol, 15 % Glycerol
Morpheus I B5	30 % *P550MME_P20K* (20 % PEG 550-Monomethylether, 10 % PEG 20000), 0.1 M *Morpheus buffer* 2 (0.05 M MOPS und 0.05 M HEPES, *pH* 7.5) 0.09 M *Morpheus halogens* (0.03 M NaBr, 0.03 M NaF und 0.03 M NaI)

Beim Betrachten der Struktur fiel allerdings auf, dass die zwei in der asymmetrischen Einheit vorhandenen Proteinketten mit ihrer konkaven Seite ein *X-TEW*-Molekül umschlossen hatten. Diese Struktur wurde daher nur als eingeschränkt geeignet angesehen, da gerade die konkave Seite von IpgC mit Interaktionspartnern wechselwirkt und diese hier nicht frei zugänglich war. Es hätte eine Verdrängung von *X-TEW* erfolgen müssen, um an dieser Stelle Interaktionsstudien im Kristall durchführen zu können. Da das Entstehen von Kristallen in dieser Lösung ohnehin nicht im eigenen Labor reproduziert werden konnte, wurde diese Bedingung aufgegeben.

Der Kristall, der mit **Morpheus I B5** erhalten worden war, wurde leider beim Versuch, ihn zu ‚fischen', vollkommen zerstört, da er am Boden der Kristallisationsplatte festklebte. Er konnte daher nicht vermessen werden. Allerdings konnten die Kristallbruchstücke noch für *Seeding*-Experimente genutzt werden.

Die Reproduktion von **Morpheus I B5** gelang. Es wurden keine Originallösungen bestellt, sondern selbst hergestellte Lösungen verwendet, da so die einzelnen Konzentrationen besser variiert werden konnten. Die Herstellung der Lösungen war nicht trivial. Hier mussten die Angaben vom Hersteller des *Screens* genau beachtet werden. Ohne *Seeding* und der Variation der einzelnen Konzentrationen wuchsen keine Kristalle. Unter Anwendung der *streak-seeding*-Methode konnte jedoch in einem breiten Konzentrationsfenster von *P550MME_P20K* (26-32 %) und *Morpheus halogens* (0.09-0.18 M) die Entstehung von Nadeln beobachtet werden. Die Kristalle besaßen somit eine vollkommen andere Morphologie als der bei MARXTAL gewachsene Kristall. Dies lag eventuell daran, dass die Kristallisationsplatte, auf der der Kristall aus dem MARXTAL-*Screen* gewachsen war, einen heftigen Stoß erlitten hatte. Das war im Nachhinein daran zu erkennen, dass viele Tropfen auf dieser Platte nicht mehr vorhanden waren. Somit konnte natürlich die Bedingung, unter der der große dreidimensionale Kristall gewachsen war, schlecht reproduziert werden. Es stellte sich durch einen weiteren MARXTAL-*Screen* heraus, dass auch ohne die Verwendung von *X-TEW* unter dieser Bedingung Kristalle wuchsen. Die so erhaltenen Kristalle sind in **Abbildung 3.6-11** links dargestellt. Hier handelte es sich um sehr lange stäbchenförmige Kristalle, welche den im eigenen Labor erhaltenen Kristallen sehr ähnelten (siehe **Abbildung 3.6-11** rechts). Allerdings zeigten sowohl die bei MARXTAL ohne *X-TEW* gewachsenen Kristalle, als auch die durch Reproduktion im eigenen Labor erhaltenen Kristalle mit *X-TEW* nur ein sehr schwaches Streuvermögen. Weitere Optimierungsversuche führten leider nicht zum erhofften Erfolg.

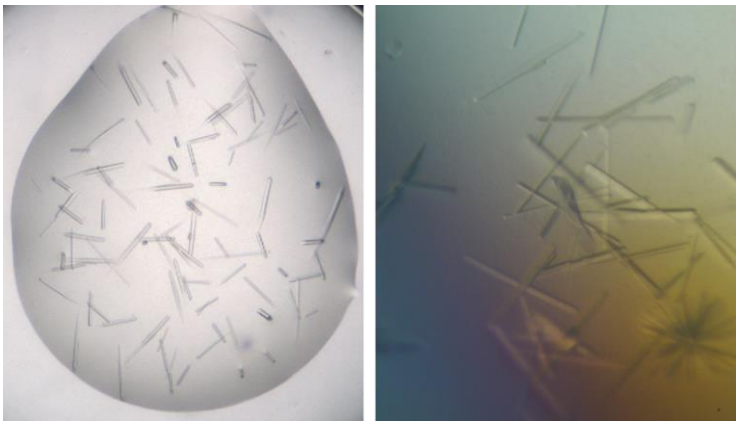


Abbildung 3.6-11: IpgC-9,-4S-Kristalle der Bedingung Morpheus I B5. *Links: Kristalle aus dem* MARXTAL-Screen *ohne* X-TEW *als Additiv. Rechts: Kristalle nach erfolgreicher Reproduktion mit* X-TEW *als Additiv.*

<u>Reproduktion der ohne *X-TEW* erzielten Kristallisations-*Hits*</u>

Der mit IpgC-9,-4S durchgeführte MARXTAL-*Screen* lieferte nicht nur *Hits* mit *X-TEW,* sondern auch einige *Hits* ohne das Additiv. Allerdings sahen diese *Hits* im Vergleich nicht so vielversprechend aus (siehe **Abbildung 3.6-12**). Teilweise handelte es sich nur um Phasentrennung (**JCSG G2**), teilweise um sogenannte „Quasi-Kristalle“ (**Classics H4**, **Core III B4**, **MBC I B4**). Bei einer Phasentrennung bildet eine zuvor gelöste Verbindung eine zweite flüssige Phase. Quasi-Kristalle besitzen zwar lokal eine regelmäßige Anordnung, allerdings sind sie insgesamt nicht vollkommen periodisch aufgebaut. In einer Bedingung war am Rand des Tropfens ein Kristall-Cluster zu erkennen (**Core IV B9**). Die Zusammensetzungen der hier genannten Bedingungen sind in **Tabelle 3.6-3** aufgeführt.

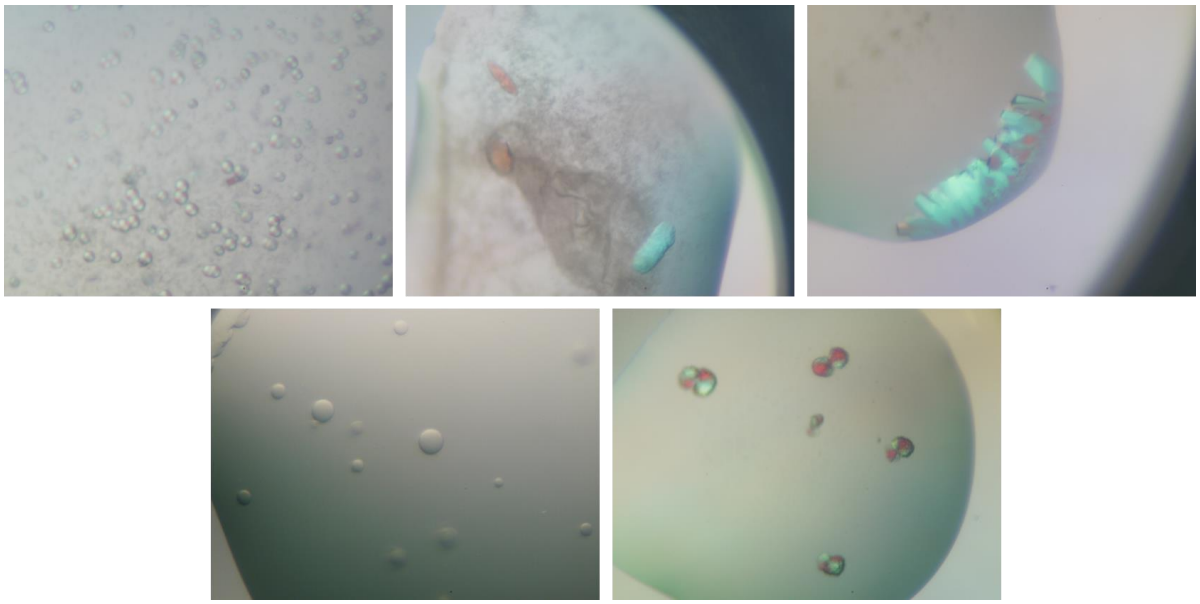


Abbildung 3.6-12: MARXTAL-*Hits *mit IpgC-9,-4S ohne den Zusatz von* X-TEW.** *Oben von links nach rechts:* ***Classics H4, Core III B4, Core IV B9*. Unten von links nach rechts:* ***JCSG G2, MBC I B4****.*

Tabelle 3.6-3: Zusammensetzung der beim MARXTAL-Screen ohne X-TEW ermittelten Hits.

Screen	**Zusammensetzung**
JCSG G2	0.02 M $MgCl_2$, 0.1 M HEPES *pH* 7.5, 22 % Polynatriumacrylat 5100
Classics H4	0.2 M $MgCl_2$, 0.1 M TRIS *pH* 8.5, 30 % PEG 4000
Core III B4	1.6 M Ammoniumdihydrogenphosphat, 0.08 M TRIS *pH* 8.5, 20 % Glycerol
MBC I B4	0.3 M $Mg(NO_3)_2$, 0.1 M TRIS *pH* 8.0, 20 % PEG 2000, 2.17 % MPD
Core IV B9	identisch zu **Classics H4**

Auch diese Bedingungen wurden teilweise versucht zu reproduzieren. Begonnen wurde mit **MBC I B4**. Durch Variation der Konzentrationen (MPD: 0-6 % (*V*/*V*), TRIS: 0.1-0.2 M, PEG 2000: 15-30 % (*w*/*V*), $Mg(NO_3)_2$: 0.2-0.4 M) und unter Verwendung der beim MARXTAL-*Screen* gewachsenen „Kristalle“ als *Seed*-Kristalle konnten erste kristallähnliche Formen erhalten werden. Sie ähnelten deutlich den „Kristallen“ aus dem MARXTAL-*Screen*. Leider konnte durch Optimierungsversuche keine verbesserte Kristallform erhalten werden.

3.7. Kristallisation von IpgC-9,-4S mit Classics H4

Da die Bedingungen **Classics H4** und **Core IV B9** zu 100 % identisch waren und in beiden Bedingungen Kristalle bzw. kristallähnliche Formen beobachtet werden konnten, wurden diese Bedingungen ebenfalls getestet. Im Folgenden wird diese Bedingung nur noch als **Classics H4** bezeichnet. Es fiel auf, dass diese Bedingung der Kristallisationsbedingung von BARTA *et al*., welche aus 0.1 M BIS-TRIS *pH* 6.5, 25 % (*w*/*V*) PEG 3350 und 0.2 M $MgCl_2$ besteht, sehr ähnelte.[113] Der Unterschied bestand zum einen in der Puffersubstanz und dem *pH*-Wert des Puffers, zum anderen in Konzentration und molarer Masse des verwendeten PEGs. Daher wurde versucht, sowohl **Classics H4** als auch die Bedingung von BARTA *et al*. zu reproduzieren. Die Reproduktion der Bedingung von BARTA *et al*. war in vorherigen Versuchen unter Verwendung der Proteinvariante IpgC0,-4S misslungen. Unter Verwendung von IpgC-9,-4S war jedoch die Reproduktion in beiden Fällen erfolgreich. Die Bedingung **Classics H4** sah allerdings nach ersten Reproduktionsversuchen vielversprechender aus als die von BARTA *et al*. ermittelte Bedingung. Kristalle – entstanden durch Reproduktion der Bedingung **Classics H4** – sind in **Abbildung 3.7-1** mittig dargestellt. Im eigenen Labor benötigten die Kristalle ohne *Seeding* einige Wochen, bis sie unter dem Mikroskop zu erkennen waren. Durch Erhöhung der $MgCl_2$-Konzentration und Verringerung des *pH*-Wertes konnten große Erfolge bei der Optimierung dieser Bedingung erzielt werden. Es wuchsen weniger Kristalle, diese waren jedoch viel größer. Erste *Seeding*-Experimente führten zunächst nicht zum Erfolg. Die in **Abbildung 3.7-1** rechts dargestellten Kristalle wuchsen über einen Zeitraum von vier Wochen und waren ohne *Seeding* entstanden. Sie waren stäbchenförmig und besaßen eine hexagonale Morphologie.

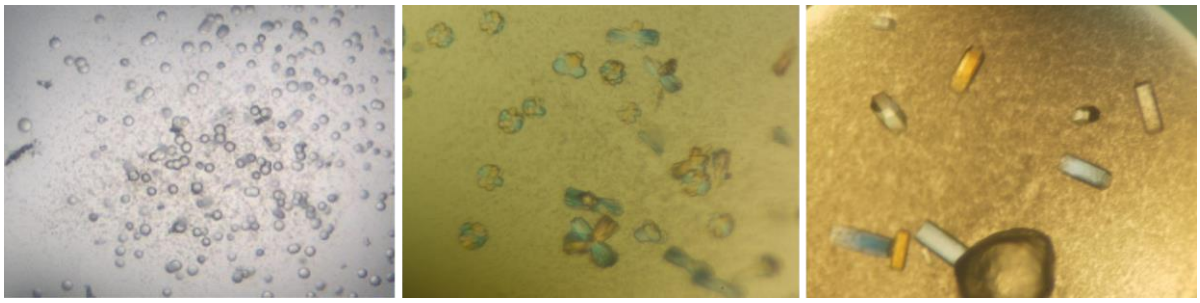


Abbildung 3.7-1: IpgC-9,-4S-Kristalle durch Reproduktion und Optimierung von Classics H4*. Von links nach rechts:* MARXTAL-Hit *(0.2 M $MgCl_2$, 0.1 M TRIS* pH *8.5, 30 % (w/V) PEG 4000), Kristalle nach erfolgreicher Reproduktion (0.2 M $MgCl_2$, 0.1 M TRIS* pH *8.5, 30 % PEG 4000), Kristalle nach erfolgreicher Optimierung (0.3 M $MgCl_2$, 0.05 M TRIS* pH *7.0, 30 % PEG 4000).*

3.7.1. Testen der Kristalle auf ihr Streuvermögen

Die in **Abbildung 3.7-1** rechts dargestellten Kristalle wurden ‚gefischt' und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Ein zusätzliches Kryo-Reagenz wurde nicht verwendet. Am eigenen Röntgengerät wurden die Kristalle auf ihre Streufähigkeit hin untersucht. Die Kristalle zeigten ein hervorragendes Streuvermögen und in den Diffraktionsbildern waren darüber hinaus keine Eisringe zu erkennen, die auf ein fehlendes Kryo-Reagenz hingedeutet hätten. Es konnte ein erster Datensatz am eigenen Röntgengerät aufgenommen werden. Die Auflösung betrug 2.19 Å. Am Synchrotron in Berlin *(BESSY II)* wurden später ebenfalls einige Datensätze solcher Kristalle aufgenommen. Die Auflösung dort war teilweise noch einmal um etwa ein halbes Ångström besser als am eigenen Röntgengerät. Die Streubilder zeigten ein leicht anisotropes Streuverhalten, das heißt, das Streuvermögen des Kristalls war abhängig von seiner Orientierung zum Röntgenstrahl (siehe **Abbildung 3.7-2**).

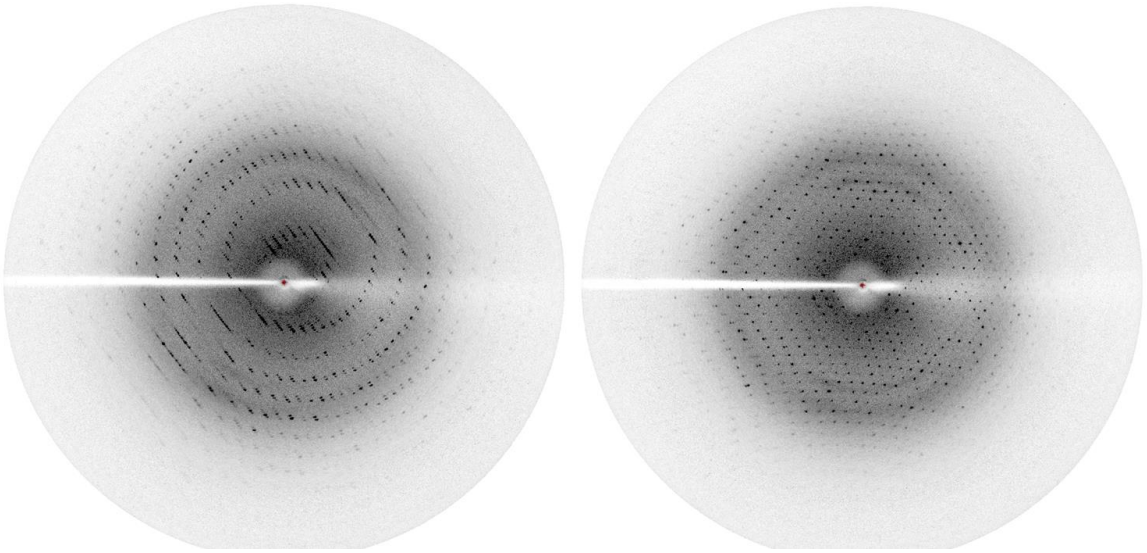


Abbildung 3.7-2: Diffraktionsbilder eines IpgC-9,-4S-Kristalls. *Aufgenommen wurden diese Diffraktionsbilder bei einem Kristall-zu-Detektorabstand von 175 mm und einer Belichtungszeit von 300 s. Das linke Bild wurde bei einem φ-Winkel von 0° aufgenommen und das rechte Bild bei einem φ-Winkel von 90°. Dieser Kristall zeigte eine Auflösung von 2.19 Å am eigenen Röntgengerät* (MAR345).

3.7.2. Probleme bei der Bestimmung der korrekten Raumgruppe

Die Bestimmung der Raumgruppe gestaltete sich anfangs als sehr schwierig. Dies lag zum einen an der Tatsache, dass den meisten Datensätzen durch automatisches Prozessieren eine falsche Raumgruppe ($P6_222$) zugeordnet worden war, wie sich später herausstellte. Bei sieben von acht Datensätzen, die zu Beginn aufgenommen wurden, war dies der Fall. Nur einem Datensatz wurde automatisch die Raumgruppe $P3_121$ zugewiesen. Es kam der Verdacht auf, dass viele Kristalle, die mit dieser Bedingung gewachsen waren, verzwillingt waren. Die Datensätze wurden mit dem Programm *Phenix Xtriage* des *Phenix* Paketes[116,117] auf Verzwilligung (engl. *twinning*) hin untersucht. *Phenix Xtriage* zeigte an, dass die beobachteten Intensitäten signifikant von den zu erwartenden Intensitäten für einen normalen Datensatz abwichen und somit auf Verzwilligung hinwiesen. Durch das automatische Prozessieren konnte bereits vor Verwendung von *Phenix Xtriage* erkannt werden, welche Datensätze verzwillingt waren und welche nicht. Dies lag daran, dass alle verzwillingten Kristalle eine höhere Symmetrie vortäuschten, als sie tatsächlich besaßen.

Zum anderen lagen die Schwierigkeiten bei der Strukturbestimmung am Modell, welches für den molekularen Ersatz verwendet wurde. Es wurde die Struktur mit dem PDB-Code 3gyz verwendet, eine *Apo*-Struktur von IpgC mit einer Auflösung von 2.15 Å.[37] Bei dieser Struktur befanden sich zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Für den molekularen Ersatz wurde sowohl Kette A, als auch Kette B und ebenso das Dimer getestet. Es konnte jedoch keine Lösung erhalten werden. Eine Lösung für den molekularen Ersatz konnte erst durch Löschen der ersten 32 Aminosäuren erzielt werden. Diese wurden gelöscht, weil vermutet wurde, dass diese Aminosäuren in der vorliegenden Struktur eine völlig andere Konformation eingenommen hatten, als es in den bisher bekannten Strukturen von IpgC der Fall war. Unter Verwendung von Kette A aus 3gyz ohne die ersten 32 Aminosäuren konnte letztendlich die Struktur bestimmt werden. Die korrekte Raumgruppe lautete $P3_221$. Die Strukturbestimmung erfolgte mit dem einzigen Datensatz, der nicht verzwillingt war (PDB-Code: 6scb). Die Auflösung betrug 1.58 Å.

3.7.3. Umgang mit Verzwilligung

Die Kristalle, die ‚gefischt' und für die Datensammlung verwendet wurden, boten eigentlich keinen Anlass anzunehmen, sie seien verzwillingt. Sie waren perfekt gewachsen und wiesen eine hexagonale Stäbchenform auf (siehe **Abbildung 3.7-3** links). Wurden jedoch andere Kristalle betrachtet, die gelegentlich ebenfalls zum Vorschein kamen, konnten Unregelmäßigkeiten in der Beschaffenheit festgestellt werden. Diese Kristalle besaßen unregelmäßige Kanten und Einkerbungen (siehe **Abbildung 3.7-3** rechts).

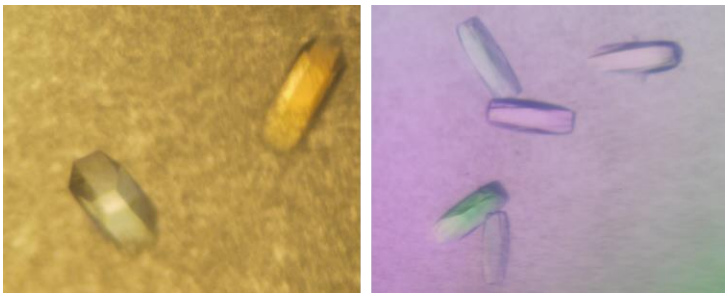


***Abbildung 3.7-3: IpgC-9,-4S-Kristalle**. Links: Perfekt aussehende Kristalle mit hexagonaler Stäbchenform. Rechts: Kristalle, die auf Verzwilligung hindeuten könnten.*

Es konnten weitere Besonderheiten festgestellt werden. In **Abbildung 3.7-4** links ist ein Kristall zu erkennen, der so aussieht, als seien zwei trigonale Stäbchen ineinander verwachsen, das eine um 60° zum anderen verdreht. In der Mitte von **Abbildung 3.7-4** ist ein Kristall zu erkennen, der eine perfekte trigonale Morphologie aufweist. In der gleichen Abbildung (rechts) ist ein Kristall gezeigt, der eine perfekte hexagonale Morphologie aufweist. Alle Kristalle, die zur Bestimmung der *Apo*-Struktur und für spätere *Soaking*-Experimente verwendet wurden, besaßen eine hexagonale Morphologie, wie sie in **Abbildung 3.7-4** rechts zu sehen ist. Kristalle mit einer perfekten trigonalen Morphologie waren eher die Ausnahme. Kristalle, wie sie in **Abbildung 3.7-4** links gezeigt sind, konnten häufig (allerdings nicht ganz so gut zu erkennen) vorgefunden werden, wurden aber für Strukturbestimmungen nicht verwendet.

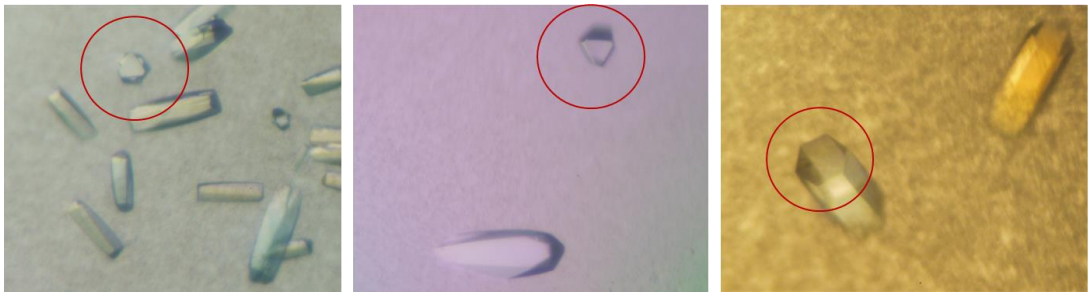


***Abbildung 3.7-4: IpgC-9,-4S-Kristalle mit unterschiedlicher Morphologie**. Mit Rot umkreist sind die Kristalle, die im obigen Abschnitt beschrieben werden. Links: Kristall, der aus zwei ineinander verwachsenen trigonalen Stäbchen besteht, wobei das eine Stäbchen um 60° zum anderen verdreht ist. Mitte: Kristall mit einer perfekten trigonalen Morphologie. Rechts: Kristall mit einer perfekten hexagonalen Morphologie.*

3.7.4. Allgemeine Probleme bei der Durchführung der Kristallisation

Bei der Kristallisation gab es einige Schwierigkeiten. Zum einen dauerte es ohne *Seeding* mehrere Wochen, bis die Kristalle groß genug waren, um für *Soaking*-Experimente verwendet werden zu können. Mit *Seeding* konnte zwar die Wachstumsdauer deutlich verringert werden, allerdings durften *Seed*-Kristalle nicht sehr alt sein. Die Kristalle zeigten nämlich nach etwa drei Monaten keinerlei Streuvermögen mehr und waren daher auch für *Seeding*-Experimente ungeeignet. Die mittels *sitting-drop*-Methode gewachsenen Kristalle klebten überwiegend am Boden der Kristallplatte fest und konnten nur schwer davon abgelöst werden. Sie wurden beim Versuch, sie vom Boden zu lösen, häufig zerstört. Auch das Einfetten der Vertiefungen führte nur zu einer geringen Verbesserung. Beim Ernten der Kristalle bzw. beim Überführen der Kristalle in *Soaking*-Lösung machte die auf dem Tropfen befindliche Haut Probleme. Auch kam es vor, dass Kristalle, die sich unmittelbar unter der Haut befanden, versehentlich mit ihr entfernt wurden. Hinzu kam, dass alle paar Monate ein neuer *Screen* durchgeführt werden musste, um weitere Kristalle zu erhalten. Immer wieder musste die PEG-Konzentration, der *pH*-Wert und die $MgCl_2$-Konzentration angepasst werden. Dies mag zum einen daran gelegen haben, dass eine neue Proteincharge verwendet wurde, deren Konzentration und Reinheit von der vorherigen Charge ein wenig abwich. Zum anderen lag es daran, dass je nach Jahreszeit unfreiwillig bei anderen Temperaturen kristallisiert wurde (16-23 °C). Die Kristallisation von IpgC erwies sich als sehr temperaturempfindlich. Im späteren Verlauf konnten ebenso Kristalle bei einer Temperatur von 26 °C erhalten werden. Bei dieser Temperatur wurden deutlich größere Kristalle erhalten als bei niedrigeren Temperaturen. Weiterhin hat sich gezeigt, dass PEG 4000, welches zum Kristallisieren verwendet wurde, zwingend von der Firma ROTH stammen muss. Der Versuch, PEG 4000 der Firma MERCK zu verwenden, war nicht erfolgreich. Insgesamt war das Ansetzen sehr vieler Kristallplatten notwendig, um ausreichend Kristalle mit optimaler Größe und Beschaffenheit zu erhalten. Der Prozentsatz an verzwillingten Kristallen variierte. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen verzwillingten Kristallen und den verwendeten Konzentrationen der einzelnen Komponenten beobachtet werden.

3.7.5. Stabilitätsprüfungen gegenüber Dimethylsulfoxid

Um die Kristalle für ein Fragment-*Screening* nutzen zu können, wurde zunächst ihre Stabilität in Anwesenheit von Dimethylsulfoxid (DMSO) geprüft, da die Fragmente als einmolare Stammlösungen in 100 % DMSO vorlagen. Für das Fragment-*Screening* sollte eine Fragmentkonzentration von 100 mM verwendet werden, das heißt, die Kristalle sollten idealerweise einen Gehalt von 10 % DMSO tolerieren. Daher wurden Kristalle in Lösungen mit unterschiedlicher DMSO-Konzentration überführt und nach einer Stunde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Ihre Streufähigkeit wurde anhand von zwei Testbildern (90° zueinander) überprüft. Es konnte festgestellt werden, dass die Auflösung der Kristalle mit zunehmender Konzentration an DMSO abnahm, obwohl nur eine Stunde *gesoakt* wurde. In **Abbildung 3.7-5** ist die Auflösung der Kristalle gegen die Konzentration an DMSO aufgetragen. Es wurden DMSO-Konzentrationen von 0-12 % in 2%-Schritten getestet. Auch wenn jeweils nur ein Kristall pro DMSO-Konzentration getestet wurde, kann dennoch ein Trend beobachtet werden. Der Kristall, der in eine Lösung mit 10 % DMSO überführt worden war, streute nur noch bis etwa 2.9 Å am eigenen Röntgengerät. Diese Auflösung wurde gerade noch als ausreichend für ein Fragment-*Screening* angesehen. Aufgrund der schlechteren Auflösung bei einem Gehalt von 10 % DMSO wurde allerdings die *Soaking*-Zeit für das Fragment-*Screening* auf maximal eine Stunde begrenzt. Eine längere *Soaking*-Zeit hätte die Auflösung wahrscheinlich noch weiter herabgesetzt.

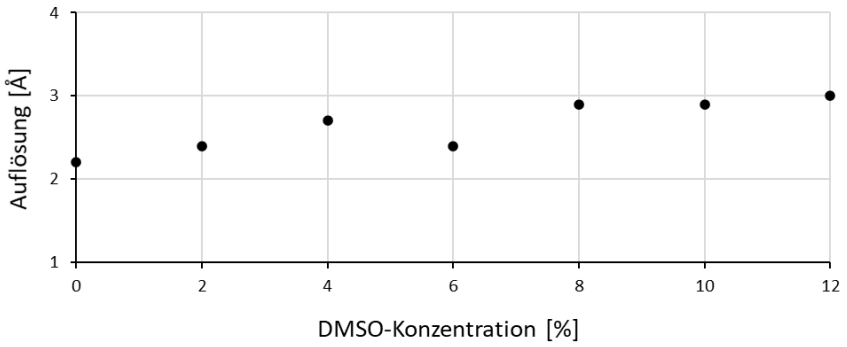


Abbildung 3.7-5: Abhängigkeit der Auflösung von der DMSO-Konzentration. *Auf der Abszisse ist die in der* Soaking*-Lösung enthaltene DMSO-Konzentration in % aufgetragen, auf der Ordinate ist die Auflösung in Å dargestellt. Messpunkte sind als schwarze Punkte gezeigt.*

3.7.6. Diskussion

HASEWINKEL versuchte im Laufe seiner Promotion das IpgC-Volllängenprotein zu kristallisieren. Dies stellte sich jedoch als äußerst schwierig heraus. Daraufhin erzeugte er eine am C-Terminus um vier Aminosäuren verkürzte Proteinvariante, IpgC0,-4S. Bei LUNELLI *et al.* wurde nämlich darüber berichtet, dass die Kristallisation von IpgC durch Deletion der vier letzten Aminosäuren erleichtert wird.[37] HASEWINKEL[102] etablierte ein Reinigungsprotokoll für IpgC0,-4S, welches später von JÜNGEL[118] noch einmal optimiert wurde, um für die Kristallisation ausreichend reines Protein zu erhalten. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll baute auf das Protokoll von JÜNGEL auf. JÜNGEL konnte während ihrer Promotion durch TSA-Experimente bereits optimale Pufferbedingungen ermitteln, unter denen IpgC eine hohe Thermostabilität zeigte. Diese Pufferbedingungen wurden in der vorliegenden Arbeit übernommen. Ebenso konnte JÜNGEL anhand dynamischer Lichtstreuung (DLS) zeigen, dass IpgC in diesem Puffersystem monodispers und frei von Proteinaggregaten vorliegt. Damit hatte sie bereits gute Voraussetzungen für eine erfolgreiche Kristallisation geschaffen. JÜNGEL konnte eine erste Kristallisationsbedingung für IpgC und das Bindungsepitop von MxiE ermitteln. Diese Bedingung führte zu einem 2.6 Å-Datensatz. Es konnte jedoch keine Elektronendichte für das Peptid beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Kristallisationsbedingung für das *Apo*-Protein ermittelt werden, welche Kristalle mit einer Auflösung von mindestens 2.0-2.5 Å entstehen lässt, um ein Fragment-*Screening* durchführen zu können. Zunächst wurde dafür ebenfalls die Proteinvariante IpgC0,-4S verwendet. Mithilfe eines MARXTAL-*Screens* konnte eine Bedingung ermittelt werden, die der Bedingung von JÜNGEL sehr ähnlich war, obwohl zuvor die Reproduktion ihrer Bedingung nicht zum Erfolg geführt hatte. Die so ermittelte Bedingung führte jedoch zu Kristallen, die kein ausreichendes Streuvermögen besaßen. Der Grund dafür war sehr wahrscheinlich der zu hohe Lösungsmittelgehalt (70 %).

Der Lösungsmittelgehalt von Proteinkristallen liegt normalerweise im Bereich von 26-65 %, im Durchschnitt bei 43 %, wie MATTHEWS bereits 1968 anhand 116 verschiedener Kristallformen festgestellt hatte.[119] Dies macht deutlich, dass ein Lösungsmittelgehalt von 70 % selbst für Proteinkristalle sehr hoch ist. Der hohe Lösungsmittelgehalt ist oft ein entscheidender Grund für die bescheidene Streufähigkeit von Proteinkristallen. Daher erscheint für eine gute Streufähigkeit ein niedrigerer Lösungsmittelgehalt von Vorteil. Wenn es allerdings um

biochemische Untersuchungen wie z.B. die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen geht, ist dagegen ein höherer Lösungsmittelgehalt wünschenswert, denn mit einem höheren Lösungsmittelgehalt wird die lokale Umgebung um das Protein im Kristall mit der Situation in Lösung vergleichbarer.[42] Weiterhin sind bei hohem Lösungsmittelgehalt die Lösungsmittelkanäle größer und erleichtern somit das Eindiffundieren von Ligand-Molekülen.

Aufgrund der Tatsache, dass auch eine Optimierung der gefundenen Kristallisationsbedingung zu keinem besseren Streuvermögen geführt hatte und auch keine andere Bedingung für die Proteinvariante IpgC0,-4S gefunden worden war, wurde versucht, mithilfe von Protein-*Engineering*-Methoden eine leichter kristallisierbare Proteinvariante zu ermitteln. Mithilfe eines Webservers *(SERp Server*[114]*)* wurde eine Proteinvariante unter Anwendung der Oberflächenentropiereduktion ermittelt. Dabei wurden dem Vorschlag entsprechend die entropiereichen Aminosäuren Lys122, Lys124 und Glu125 zu Alanin mutiert.

Die Proteinkristallisation ist ein vorwiegend entropiegetriebener Prozess. Das klingt erst einmal verwunderlich, denn bei der Kristallisation ordnen sich Proteinmoleküle in einem Gitter regelmäßig an. Da wäre zunächst einmal ein Entropieverlust naheliegender. Warum kommt es dennoch zu einem Entropiegewinn bei der Kristallisation? Es sind die um die Proteinmoleküle regelmäßig angeordneten Wassermoleküle, die für den Entropiegewinn sorgen. Diese müssen bei Ausbildung von Kristallkontakten weichen und liegen anschließend ungeordnet vor.[120] Neben diesem entropisch günstigen Effekt bei der Ausbildung von Kristallkontakten existiert ebenso ein gegenläufiger Effekt. Aminosäuren, die sich auf der Oberfläche des Proteins befinden, beeinflussen nicht nur das Wassernetzwerk (kurze Seitenketten lassen eine höhere Ordnung der Wassermoleküle zu), beim Kontakt mit einem weiteren Proteinmolekül verlieren lange Seitenketten auf der Proteinoberfläche (z.B. Lysine und Glutamate) an Flexibilität. Hier kommt es also zu einem Entropieverlust.[120] Studien haben gezeigt, dass bereits durch Mutation einzelner Aminosäuren auf der Oberfläche die Kristallisation eines Proteins deutlich verbessert werden kann, da durch gezielte Mutagenese ein solcher Entropieverlust verringert wird.[121,122]

Einerseits sind Lysine und Glutamate in einem solchen Fall prädestiniert dafür, mutiert zu werden. Andererseits sind gerade diese Aminosäuren auf der Proteinoberfläche für eine gute Proteinlöslichkeit wichtig. Eine gute Löslichkeit des Proteins ist für eine aussichtsreiche Kristallisation ebenso von Bedeutung. Liegt das Problem bei mangelnder Löslichkeit des Proteins

– für die Kristallisation sind hohe Proteinkonzentrationen erforderlich – so werden auch häufig hydrophobe Aminosäuren auf der Proteinoberfläche durch Lysine ersetzt.[123]

Die Tatsache, dass die mithilfe des *SERp Servers* ermittelte Proteinvariante nicht gereinigt werden konnte, hatte höchstwahrscheinlich mit der Löslichkeit zu tun. Durch die drei vorgenommenen Mutationen – zwei Lysine und ein Glutamat wurden zu Alanin mutiert – wurde die Proteinlöslichkeit sehr wahrscheinlich zu stark negativ beeinflusst. Vielleicht wäre ein Austausch der Aminosäuren durch Serin erfolgreicher gewesen, da so die Löslichkeit nicht ganz so stark beeinflusst worden wäre. Vielleicht wäre es aber auch sinnvoller gewesen, eine Proteinvariante mit weniger Mutationen zu wählen. Da wäre jedoch nur das mithilfe des *SERp Servers* ermittelte Cluster #3 in Frage gekommen, bei dem Lys101 durch Alanin hätte ersetzt werden sollen. Lysine sind die am meisten lösungsmittelexponierten Aminosäuren in Proteinen. Lysine machen im Durchschnitt 12-15 % der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche eines Proteins aus. Daher macht es durchaus Sinn, einen Lysin-Rest zu mutieren, da sie meistens auf der Proteinoberfläche lokalisiert sind.[120] Im Falle von IpgC wäre die in Cluster #3 vorgeschlagene Mutation jedoch nicht unbedingt sinnvoll gewesen. Spätere Kapitel zeigen, dass gerade Lys101 im Dimer-*Interface* eine entscheidende Rolle spielt. Lys101 ist zwar Teil einer Schleife, in der ermittelten Kristallstruktur aber durch seine Lage von entscheidender Bedeutung. Allerdings wäre bei Verwendung einer solchen Proteinvariante eventuell ein ganz anderes Dimer erzeugt worden und es wären andere Fragment-*Hits* ermittelt bzw. deutlich weniger *Hits* gefunden worden.

Lysine sind eigentlich eher selten im *Interface* anzutreffen. Wenn jedoch Informationen über die Struktur eines Proteins fehlen, ist die Entscheidung, welche Aminosäure zum Erhalt einer besser kristallisierbaren Variante mutiert werden soll, schwierig. Bei IpgC lagen zwar Informationen über die dreidimensionale Struktur vor, allerdings lagen auch Informationen darüber vor, dass IpgC verschiedene Dimer-Anordnungen einnehmen kann[37,113]. Der *SERp Server* berücksichtigt zwar Sekundärstruktur und Konservierung der einzelnen Aminosäuren, letztendlich besteht jedoch immer ein gewisses Risiko bei der Veränderung einer Primärsequenz.

Zeitgleich mit dem Prinzip der Oberflächenentropiereduktion wurde ein weiterer Ansatz verfolgt, um eine Proteinvariante zu erhalten, die leichter zu kristallisieren ist. Aufgrund der Tatsache, dass in allen bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Strukturen die ersten neun Aminosäuren von IpgC fehlgeordnet waren, wurde beschlossen, eine Proteinvariante für die

Kristallisation zu wählen, bei der nicht nur die letzten vier Aminosäuren fehlten, sondern zusätzlich weitere neun Aminosäuren am N-Terminus. Bei der Kristallisation wirken sich ungefaltete, flexible Proteinbereiche meist sehr störend aus. Daher wird die Eliminierung flexibler N- bzw. C-Termini dringend empfohlen. Eine erschwerte Kristallisation aufgrund eines flexiblen N-Terminus lässt sich damit begründen, dass aufgrund dieser Flexibilität die Anlagerung eines weiteren Proteinmoleküls erschwert ist. So lässt sich eventuell auch der hohe Lösungsmittelgehalt der IpgC0,-4S-Kristalle erklären. Vielleicht war aufgrund des vorhandenen flexiblen N-Terminus keine dichtere Packung möglich. Die Verwendung von trunkierten Proteinvarianten ist die am häufigsten verwendete Methode des Protein-*Engineerings*[123] und führte auch in der vorliegenden Arbeit letztendlich zum Erfolg.

Letztlich stellt sich die Frage, ob die Anwendung von Protein-*Engineering*-Methoden immer von Vorteil ist. Es ist wahrscheinlich eine Frage des richtigen Maßes. Natürlich steht erst einmal die Kristallisation eines Proteins im Vordergrund, denn ohne eine erfolgreiche Kristallisation können keine strukturellen Informationen über das Protein gewonnen werden. Allerdings stellt sich spätestens beim Erhalt erster Ergebnisse die Frage, inwieweit die am Protein vorgenommenen Änderungen das Ergebnis beeinflusst haben könnten. Beispielsweise könnte es sein, dass die Kristallisation des Volllängenproteins zu einem anderen Dimer geführt hätte, als es in dieser Arbeit für die Proteinvariante IpgC-9,-4S beobachtet werden konnte. Vielleicht ist daher das „richtige“ Dimer von IpgC noch nicht bekannt, da alle bislang bekannten Strukturen mit verkürzten Proteinvarianten erzeugt wurden. Letztendlich sind Änderungen nützlich und häufig auch notwendig, aber Änderungen am Protein sollten immer mit Bedacht durchgeführt und Ergebnisse kritisch hinterfragt werden.

3.8. Hochauflösende Kristallstruktur von IpgC-9,-4S

3.8.1. Neuartige Konformation des flexiblen Proteinbereichs

Die Struktur von IpgC-9,-4S konnte trotz anfänglicher Schwierigkeiten bestimmt und in der PDB deponiert werden (PDB-Code: 6scb). Es befinden sich zwei Moleküle in der kristallographischen asymmetrischen Einheit. Die in **Kapitel 3.7.2** bereits beschriebenen Probleme bei der Strukturbestimmung lagen tatsächlich daran, dass der flexible Teil des Proteins in der hier beschriebenen Struktur eine völlig andere Konformation eingenommen hatte. Zum flexiblen Bereich des Proteins gehören α-Helix 1 (Aminosäuren 1-20) und die zwischen α-Helix 1 und α-Helix 2 befindliche Schleife (Aminosäuren 21-32) (siehe **Abbildung 3.8-1**, Aminosäuren in Gold hervorgehoben). Diese für den molekularen Ersatz entfernten Aminosäuren wurden mithilfe des *ARP/wARP Web Services* eingebaut.[104,105] Interessanterweise konnte Kette A erst ab Aminosäure 24 eingebaut werden, Kette B dagegen war abgesehen von Gln151 vollständig in der Elektronendichte zu erkennen. In **Abbildung 3.8-1** ist die F_o-F_c-Differenzelektronendichte vor Einbau der fehlenden 32 Aminosäuren von Kette B dargestellt.

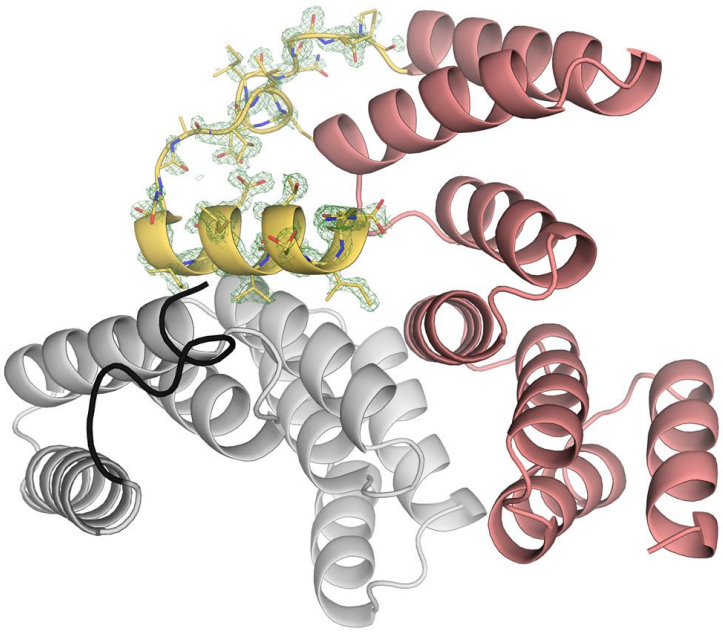


***Abbildung 3.8-1**: **Neuartige Konformation des flexiblen Proteinbereichs.** Das Dimer der asymmetrischen Einheit ist als Bändermodell dargestellt. Die Aminosäuren 24-32 der Kette A sind in Schwarz und die Aminosäuren 33-151 der Kette A in Grau dargestellt. Die Aminosäuren 9-32 der Kette B sind in Gold und die Aminosäuren 33-150 in Rosa gezeigt. Die F_o-F_c-Differenzelektronendichte ist als grünes Netz bei 2.5 σ dargestellt. Die Aminosäuren in diesem Bereich sind zusätzlich als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome sind gold, O-Atome rot, N-Atome blau und S-Atome gelb.*

3.8.2. Dimerisierung

Beim Betrachten der Symmetrieäquivalente dieser Kristallstruktur fiel auf, dass ein weiteres Dimer in Frage kommt. Die beiden möglichen Dimere sind in **Abbildung 3.8-2** dargestellt. Dimer-1 – in **Abbildung 3.8-2** links dargestellt – entspricht dem Dimer in der kristallographischen asymmetrischen Einheit. Dimer-2 – in **Abbildung 3.8-2** rechts gezeigt – besteht aus Kette A der kristallographischen asymmetrischen Einheit und Kette B eines Symmetrieäquivalents.

Mithilfe des *PISA Servers*[124] wurden beide Dimer-Kontaktflächen analysiert. *PISA* ermittelte für Dimer-1 eine Kontaktfläche von 1022.8 Å^2 und für Dimer-2 eine Kontaktfläche von 851.2 Å^2. Die geschätzte freie Solvatationsenergie, die bei Ausbildung des jeweiligen Dimers gewonnen wird, beträgt in beiden Fällen -73.2 kJ/mol. Dimere mit einer Kontaktfläche kleiner als 1000 Å^2, wie es bei Dimer-2 der Fall ist, werden auch als transiente Dimere bezeichnet. Transiente Dimere sind kurzlebiger. *In vivo* besteht ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation.[125] *PISA* konnte für Dimer-1 vier H-Brücken und eine Salzbrücke im *Interface* ermitteln. Für Dimer-2 konnten drei H-Brücken und sechs Salzbrücken ermittelt werden (siehe **Tabelle 3.8-1**).

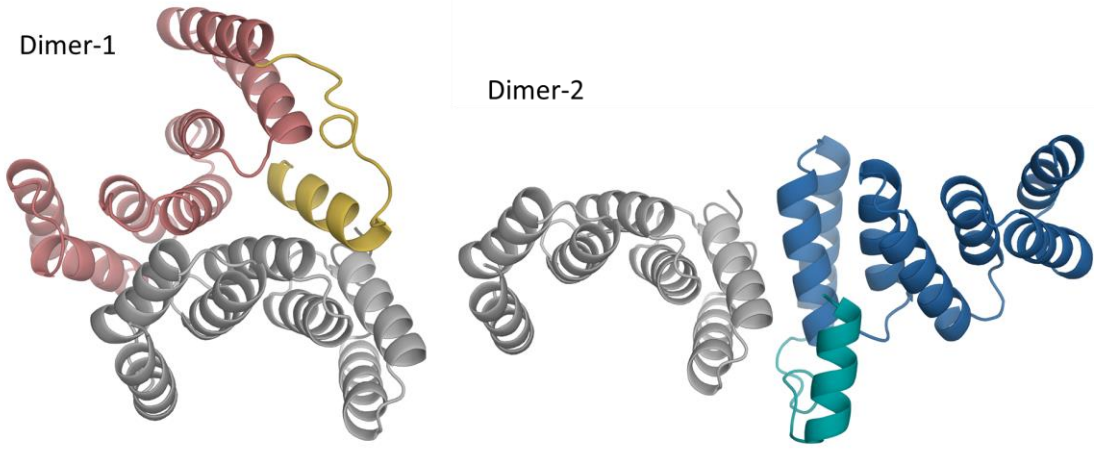


Abbildung 3.8-2: Zwei mögliche IpgC-Dimere. *Links: Dimer-1. Rechts: Dimer-2. Das Protein ist als Bändermodell dargestellt. Kette A ist jeweils grau und besitzt die gleiche Orientierung. Die Aminosäuren 9-32 der Kette B sind in Dimer-1 gold und in Dimer-2 türkis. Die Aminosäuren 33-150 der Kette B sind in Dimer-1 rosa und in Dimer-2 blau.*

Tabelle 3.8-1: Übersicht über die im* Interface *ausgebildeten H-Brücken und Salzbrücken.

Dimer	H-Brücken	Salzbrücken
1	AsnB102 - GluA125 AlaB18 - TyrA80 AspB91 - LysA101 AspB91 - TyrA68	AspB91 - LysA101
2	GlyB9 - GluA53 (2x) ThrB13 - GluA54	ArgB60 - GluA53 (2x) GlyB9 - GluA53 (2x) AspB17 - ArgA51 (2x)

Die vier H-Brücken im *Interface* von Dimer-1 sind relativ gleichmäßig über die Kontaktfläche verteilt. Sie besitzen eine Länge von 2.3 bis 2.8 Å. Bei der Interaktion zwischen AspB91 und LysA101 handelt es sich gleichzeitig um eine Salzbrücke. Die im *Interface* von Dimer-2 ausgebildeten H-Brücken und Salzbrücken liegen alle relativ dicht beieinander und erstrecken sich nicht über die gesamte Kontaktfläche. An allen drei H-Brücken sind Aminosäuren von α-Helix 1 (türkis gefärbte α-Helix in **Abbildung 3.8-3** rechts) beteiligt, ebenso an vier der sechs Salzbrücken. Nur ArgB60 geht zwei weitere Salzbrücken mit Kette A ein. Hier wird die Bedeutung von α-Helix 1 für die Stabilität des Dimers deutlich. Ausgebildete H-Brücken liegen im Bereich von 2.6 bis 2.8 Å, vorhandene Salzbrücken zwischen 3.1 und 3.6 Å.

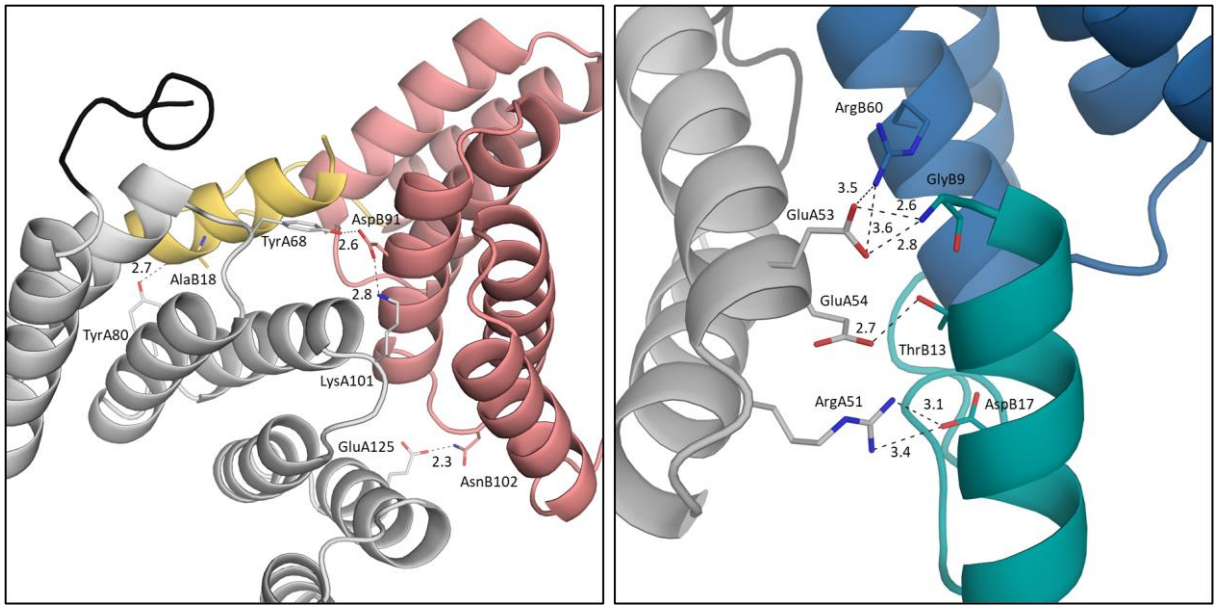


Abbildung 3.8-3: Ausgebildete H-Brücken und Salzbrücken im* Interface *der Dimere. *Das Protein ist als Bändermodell dargestellt. Die an Interaktionen beteiligten Seitenketten sind zusätzlich als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome sind in der entsprechenden Farbe der Kette dargestellt, O-Atome sind rot und N-Atome blau. Links: Dimer-1. Kette A ist in Schwarz (Aminosäuren 24-32) bzw. in Grau (Aminosäuren 33-151) gezeigt, Kette B in Gold (Aminosäuren 9-32) bzw. in Rosa (Aminosäuren 33-150). Rechts: Dimer-2. Kette A ist auch hier grau gefärbt, Kette B türkis (Aminosäuren 9-32) bzw. blau (Aminosäuren 33-150). H-Brücken und Salzbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien gezeigt, ihre Abstände sind in Å angegeben.*

Im *Interface* von Dimer-1 beruht die Interaktion von α-Helix 1 der Kette B mit Kette A fast ausschließlich auf Van-der-Waals- (VdW-) Wechselwirkungen (siehe **Abbildung 3.8-4** links). α-Helix 1 befindet sich in einer Mulde, die von den α-Helices 3-5 der Kette A ausgebildet wird. Wird das *Interface* von Dimer-2 näher betrachtet, so fällt auch hier auf, dass überwiegend VdW-Wechselwirkungen stattfinden. An diesen Wechselwirkungen ist α-Helix 3 beider Proteinketten beteiligt, genauer gesagt die Aminosäuren Leu25, Phe46, Val57, Phe58, Phe61 und Ile64 beider Proteinketten. Auffällig ist die parallele Anordnung der Phe-Seitenketten, wodurch π-π-Wechselwirkungen möglich sind.

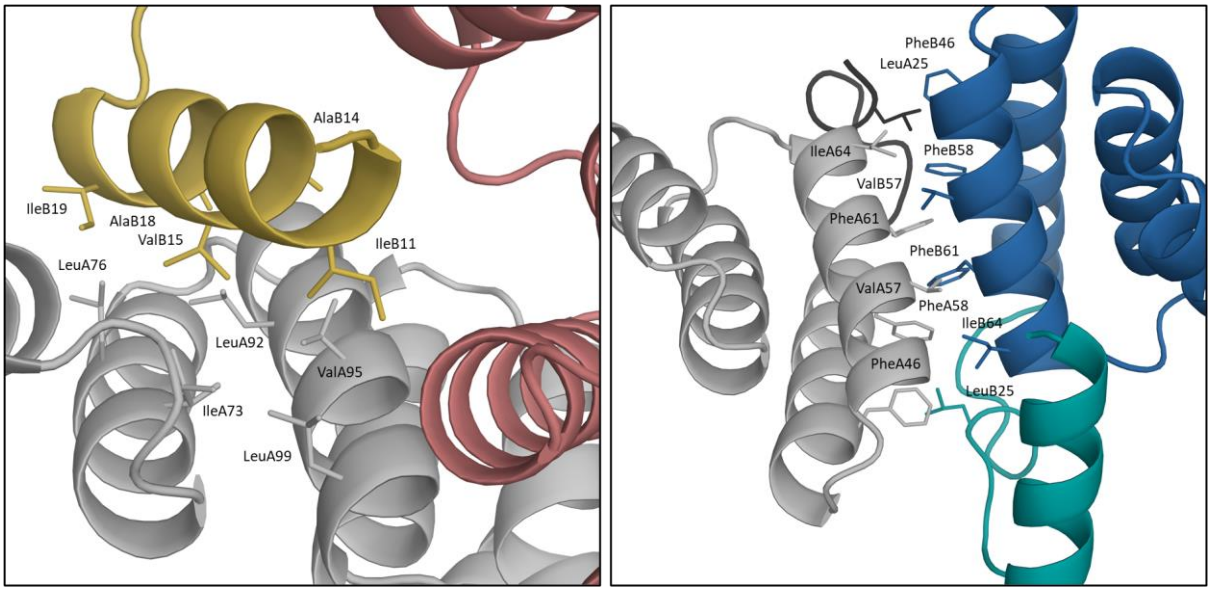


Abbildung 3.8-4: VdW-Wechselwirkungen im* Interface *der Dimere. *Das Protein ist als Bändermodell dargestellt. Die im* Interface *befindlichen Seitenketten sind als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome sind in der entsprechenden Farbe der Kette dargestellt. Links: Dimer-1. Kette A ist in Grau gezeigt, Kette B in Gold (Aminosäuren 9-32) bzw. in Rosa (Aminosäuren 33-150). Rechts: Dimer-2. Kette A ist schwarz (Aminosäuren 24-32) bzw. grau (Aminosäuren 33-151) gefärbt, Kette B türkis (Aminosäuren 9-32) bzw. blau (Aminosäuren 33-150).*

Um eine quantitative Aussage über die hydrophoben Wechselwirkungen in den *Interfaces* beider Dimere machen zu können, wurde das Programm *Contacsym*[126,127] verwendet. Dieses Programm listet alle Interaktionen auf, die zwischen zwei Proteinketten ausgebildet werden. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 3.8-2** gezeigt.

***Tabelle 3.8-2: Interaktionen in den* Interfaces *beider Dimere, ermittelt mit* Contacsym.**

Interaktionen	**im *Interface* von Dimer 1**	**im *Interface* von Dimer 2**
kurze H-Brücke	1	0
H-Brücke	6	4
Salzbrücke	1	4
kurze VdW-Wechselwirkungen	1	2
VdW-Wechselwirkungen	130	130
gesamt	139	140

Wird die Anzahl der von *Contacsym* ermittelten H-Brücken bzw. Salzbrücken mit der Anzahl verglichen, die mithilfe von *PISA* ermittelt wurde, können Abweichungen festgestellt werden. Dies liegt daran, dass *PISA* und *Contacsym* unterschiedliche Kriterien zur Erkennung solcher Interaktionen heranziehen (siehe **Kapitel 5.7.6**). Werden die ermittelten VdW-Wechselwirkungen miteinander verglichen, so fällt auf, dass im *Interface* der beiden Dimere exakt gleich viele Interaktionen dieser Art vorliegen (130). Auch die Gesamtzahl an Interaktionen ist mit 139 bzw. 140 fast identisch. Zudem ist die Summe an H-Brücken und Salzbrücken mit jeweils 8 ebenfalls identisch. Diese Werte bestätigen somit die gleich hohe freie Solvatationsenergie beider Dimere, die von *PISA* berechnet wurde (-73.2 kJ/mol). **Tabelle 3.8-2** macht zudem deutlich, dass die Anzahl an VdW-Wechselwirkungen mit einem Faktor von 16.5 deutlich höher ist als die Summe an H-Brücken und Salzbrücken.

Typischerweise liegt die Anzahl an ausgebildeten H-Brücken eines Protein-*Interfaces* zwischen 5 und 10 pro 1000 Å².[124] Dimer-1 bestätigt mit sieben H-Brücken diesen Bereich (siehe **Tabelle 3.8-2**). Dimer-2 liegt mit vier H-Brücken darunter, allerdings ist das ausgebildete *Interface* auch kleiner als 1000 Å². Der Beitrag dieser H-Brücken zur freien Solvatationsenergie ist allerdings eher gering, da auch im Lösungsmittel Wasser bei Vorliegen einzelner Proteinketten an diesen Positionen H-Brücken ausgebildet werden können. Den weitaus größeren Beitrag zur freien Solvatationsenergie liefern die im *Interface* zustande kommenden VdW-Wechselwirkungen.[124]

3.8.3. Vergleich mit anderen bereits ermittelten Dimer-Anordnungen

In beiden Dimeren ist der flexible Teil des Proteins maßgeblich an der Ausbildung des jeweiligen Dimers beteiligt. LUNELLI *et al*. konnten bereits durch Deletion der ersten 21 Aminosäuren zeigen, dass ein Dimer ohne diese Aminosäuren nicht mehr ausgebildet werden kann und das Protein aggregiert.[37] BARTA *et al*. konnten jedoch nachweisen, dass das Protein durch Deletion nur der ersten zehn Aminosäuren immer noch als Dimer in Lösung vorliegt.[113] Es ist anzunehmen, dass auch bei der in dieser Arbeit verwendeten Proteinvariante ein Dimer in Lösung vorliegt, da hier im Vergleich zu BARTA *et al*. nur die letzten vier Aminosäuren zusätzlich entfernt wurden. Die in dieser Arbeit verwendete Proteinvariante kann somit als Kombination der von LUNELLI *et al.* und BARTA *et al*. verwendeten Varianten angesehen werden, da bei BARTA *et al.* die ersten neun Aminosäuren und bei LUNELLI *et al.* die letzten vier Aminosäuren fehlten.[37,113]

Wird die hier beschriebene Dimer-Struktur mit allen bereits bekannten Strukturen von IpgC bzw. dessen Orthologen verglichen, so fällt auf, dass hier ein bislang noch nicht beschriebener Dimerisierungsmodus vorliegt. Beobachtet werden konnten bislang folgende Anordnungen der beiden Untereinheiten: *head-to-head*, *back-to-back* und *head-to-back*. In **Abbildung 3.8-5 a-c** sind diese drei Anordnungen dargestellt. **Abbildung 3.8-5 a** zeigt die *head-to-head*-Anordnung des Chaperons SycD aus *Yersinia enterocolitica*, die bei BÜTTNER *et al.*[128] beschrieben wird. Diese Anordnung konnte in einigen anderen Strukturen ebenfalls beobachtet werden.[37,106,113] In der in dieser Arbeit ermittelten Struktur kann eine ähnliche Dimer-Anordnung beobachtet werden. Wie bereits im vorherigen Abschnitt ausgeführt wurde, ist hier jedoch im Vergleich zu den bereits publizierten Strukturen α-Helix 1 an der Ausbildung des Dimer-*Interfaces* maßgeblich beteiligt. Dies war bei den Strukturen von BÜTTNER *et al.* bzw. JOB *et al.* so nicht möglich, da dort trunkierte Proteinvarianten verwendet worden waren, in denen die ersten 20 Aminosäuren fehlten.[106,128] Bei LUNELLI *et al.* waren diese Aminosäuren zwar vorhanden, jedoch nicht am Aufbau des *head-to-head*-Dimer-*Interfaces* beteiligt.[37] Weiterhin unterscheiden sich die bislang ermittelten *head-to-head*-Anordnungen meist in der Orientierung der zweiten Kette. In **Abbildung 3.8-5 b** ist die *back-to-back*-Anordnung des Chaperons PcrH aus *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt, die von JOB *et al.* beobachtet werden konnte.[106] Auch diese Dimer-Form tritt in weiteren Strukturen auf.[107,128] Bei dieser Dimer-Variante kommt die Wechselwirkung über die beiden konvexen Seiten der Superhelices zustande. Auch hier konnte bislang aufgrund des Fehlens der entsprechenden Aminosäuren keine Beteiligung von α-Helix 1 beobachtet werden. Bei JOB *et al.* wird zudem über die auffällig

wenigen Interaktionen zwischen den beiden Proteinketten berichtet.[106] In der vorliegenden Arbeit konnte eine Dimer-Anordnung erhalten werden, die ebenfalls als *back-to-back*-Anordnung bezeichnet werden kann (siehe **Abbildung 3.8-5 e**). Allerdings ist hier wiederum *α*-Helix 1 der einen Proteinkette maßgeblich an der Interaktion mit der anderen Proteinkette beteiligt. Werden die in **Abbildung 3.8-5 b** und **e** gezeigten *back-to-back*-Anordnungen miteinander verglichen, so fällt auf, dass die beiden Proteinketten aus **e** viel enger aneinander liegen, als es in **b** der Fall ist. Eine weitere Assemblierung konnte von LUNELLI *et al.* beobachtet werden, die als *head-to-back*-Anordnung bezeichnet werden kann. Bei dieser Art der Dimerisierung wird ebenfalls die Bedeutung von *α*-Helix 1 deutlich. LUNELLI *et al.* und LOKAREDDY *et al.*[40] sind bislang die einzigen, die diese Anordnung beobachten konnten. Werden die Dimere aus **Abbildung 3.8-5 c** und **e** miteinander verglichen, so fällt auf, dass *α*-Helix-1 in beiden Fällen in der Furche liegt, die von den *α*-Helices 3-5 ausgebildet wird.

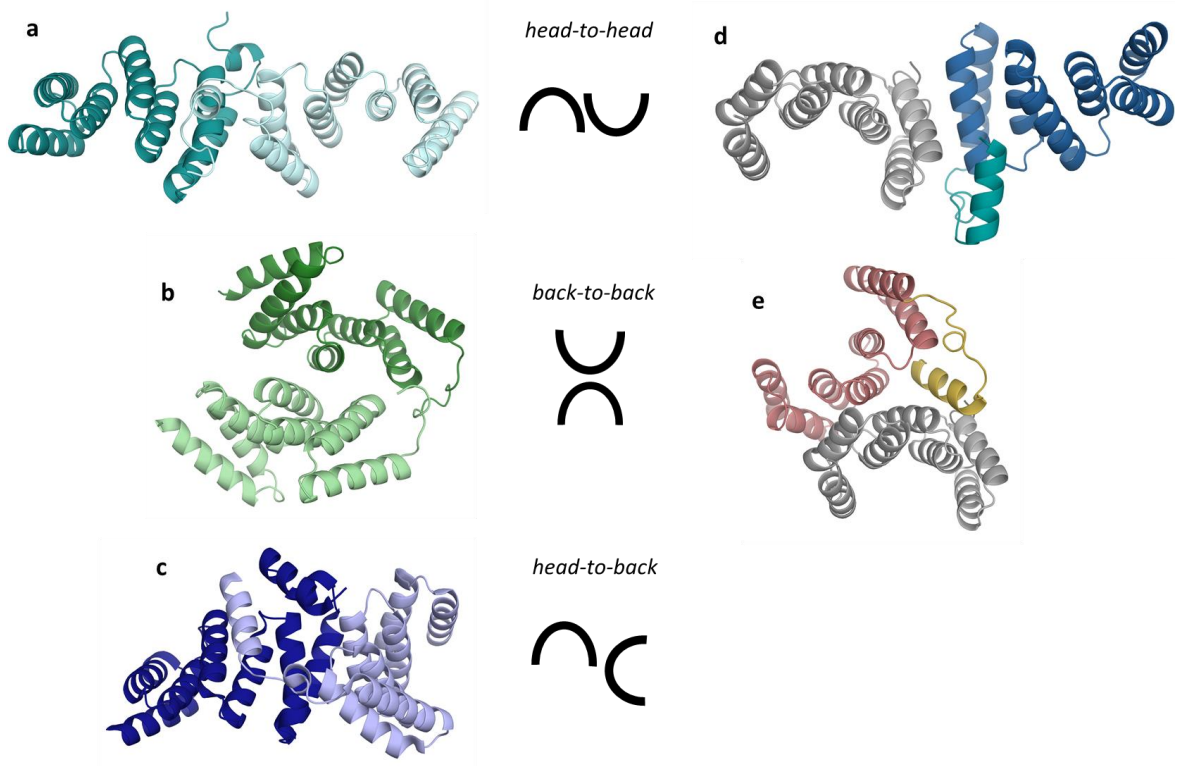


Abbildung 3.8-5: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Dimere mit bereits bekannten Dimer-Anordnungen von IpgC bzw. dessen Orthologen. a*:* head-to-head-*Anordnung von SycD (PDB-Code: 2vgx[128]). **b**:* back-to-back-*Anordnung von PcrH (PDB-Code: 2xcc[106]). **c**:* head-to-back-*Anordnung von IpgC (PDB-Code: 3gyz[37]). **d**:* head-to-head-*Anordnung der in dieser Arbeit ermittelten* Apo-*Struktur (PDB-Code: 6scb). **e**:* back-to-back-*Anordnung der in dieser Arbeit ermittelten* Apo-*Struktur (PDB-Code: 6scb). Alle Proteinketten sind als Bändermodelle dargestellt, dabei sind die beiden Proteinketten, die das Dimer ausbilden, jeweils unterschiedlich farbig dargestellt. In der Mitte sind schematische Darstellungen der drei Dimer-Anordnungen gezeigt.*

3.8.4. Magnesium- und Chlorid-Ionen

In der Kristallstruktur konnten neben 250 Wassermolekülen auch zwei Magnesium- (Mg-) sowie zwei Chlorid- (Cl-) Ionen eingebaut werden. Es handelt sich um zwei Mg-Ionen, deren sechs Koordinationsstellen jeweils allesamt mit Wassermolekülen besetzt sind (siehe **Abbildung 3.8-6**). Die Sauerstoffatome dieser Wassermoleküle sitzen dabei jeweils an den Ecken eines gedachten Oktaeders. Der Abstand zwischen Mg-Ion und O-Atomen der Wassermoleküle liegt zwischen 1.9 und 2.2 Å. Bei der Kristallisation wurde Magnesiumchlorid-Hexahydrat verwendet. Es macht den Anschein, als hätten die Mg-Ionen, welche somit nur indirekt mit dem Protein interagieren, ihre Hydrathülle erst gar nicht abgestreift. Interessant ist die Bindestelle von Mg-2. Dieses befindet sich im *Interface* von Dimer-1 und dürfte dort vermutlich für eine zusätzliche Stabilisierung sorgen. Mg-2 interagiert indirekt (über seine erste Hydrathülle) mit den Aminosäuren GlyB22 und AspB27. Diese beiden Aminosäuren sind Teil der sehr flexiblen und langen Schleife, die α-Helix 1 mit α-Helix 2 verbindet. Über seine zweite Hydrathülle interagiert Mg-2 außerdem mit AlaB18 und AspA91 (siehe **Abbildung 3.8-6** rechts). Mg-1 dagegen interagiert mit Kette B der asymmetrischen Einheit und Kette A eines Symmetrieäquivalents. Die Position von Mg-1 ist allein durch die Kristallpackung bedingt, da das benachbarte Symmetrieäquivalent nicht für die Ausbildung eines möglichen Dimers in Frage kommt. Der Bindungsmodus ist daher nicht gezeigt. Dieses Mg-Ion befindet sich in der Nähe der Schleife, die α-Helix 7 und α-Helix 8 (H7 und H8) der Kette B miteinander verbindet. Die $2F_o$-F_c-Elektronendichte beider Mg-Ionen und der Bindungsmodus von Mg-2 sind in **Abbildung 3.8-6** dargestellt.

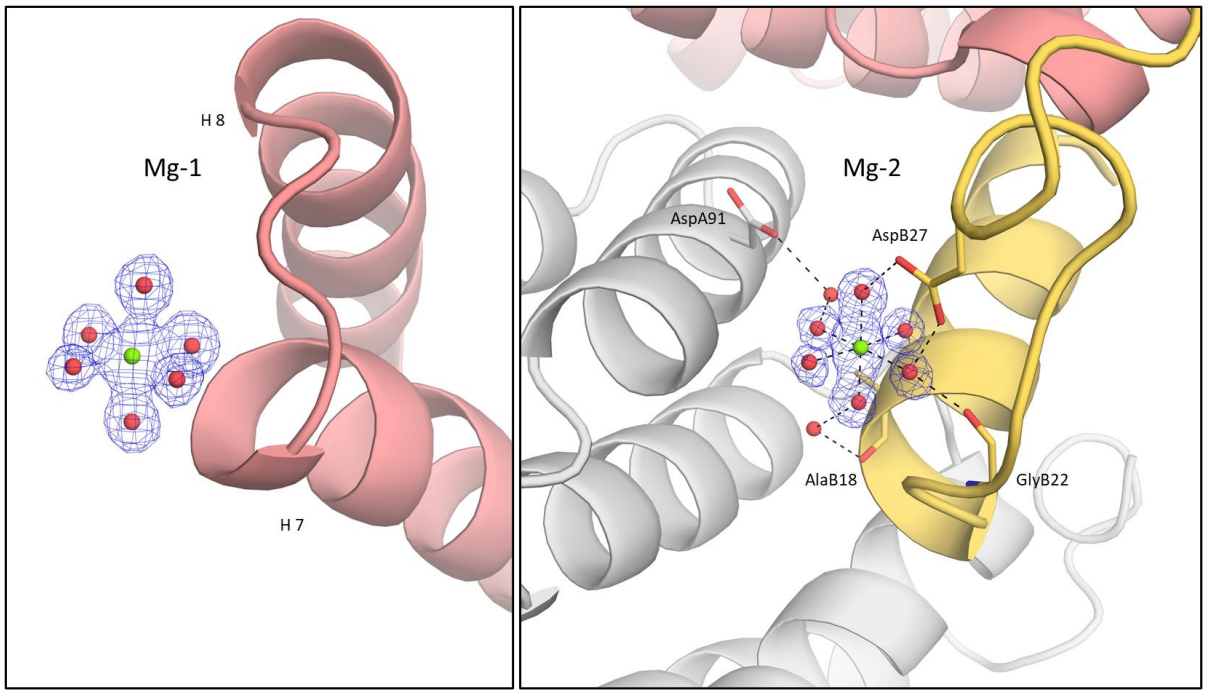


Abbildung 3.8-6: Zwei hexahydratisierte Mg-Ionen. *Alle sechs Koordinationsstellen beider Mg-Ionen sind durch Wassermoleküle besetzt. Links: Mg-1 mit seiner ersten Hydrathülle. Rechts: Bindungsmodus von Mg-2. Das Protein ist als Bändermodell dargestellt. Kette A ist in Grau gezeigt, Kette B in Gold (Aminosäuren 9-32) bzw. Rosa (Aminosäuren 33-150). Die an Interaktionen beteiligten Aminosäuren sind im Falle von Mg-2 zudem als Stäbchenmodell gezeigt. Dabei sind O-Atome in Rot dargestellt. Interaktionen sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt. Beide Mg-Ionen sind als grüne Kugeln und die O-Atome der H_2O-Moleküle als rote Kugeln gezeigt. Dargestellt ist die $2F_o$-F_c-Elektronendichte als blaues Netz bei 1.0 σ.*

Weiterhin konnten in der Struktur zwei Chlorid-Ionen beobachtet werden. Diese konnten beide durch ein anomales Signal bestätigt werden. Beide Chlorid-Ionen befinden sich jeweils am N-Terminus einer α-Helix. Dies liegt wahrscheinlich darin begründet, dass eine α-Helix ein relativ hohes Dipolmoment besitzt, welches sich durch die vielen kleinen Dipolmomente der Carbonylgruppen der Amidbindungen ergibt.[129] Daher kommt es am N-Terminus zur Ausbildung einer positiven Partialladung, was das Binden eines negativ geladenen Ions bzw. Moleküls begünstigt. Das erste Chlorid-Ion (Cl-1) interagiert jeweils mit dem Rückgrat-Stickstoff von LeuA121 und LysA122 und zusätzlich mit einem Wassermolekül (siehe **Abbildung 3.8-7** links). Die Interaktion mit Rückgrat-Stickstoffen ist für Chlorid-Ionen sehr typisch.[130] Cl-2 zeigt ebenfalls diese Art der Interaktion. Es ist durch die Rückgrat-Stickstoffe von GlyB9 (N-Terminus der Kette B) und SerB12 und zwei Wassermoleküle koordiniert (siehe **Abbildung 3.8-7** rechts).

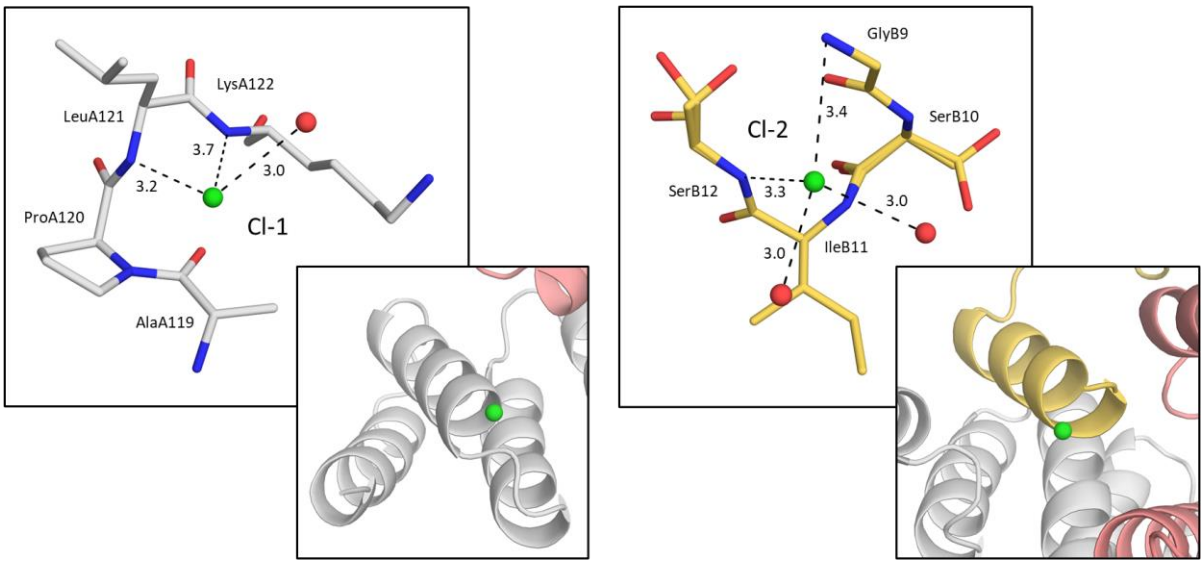


Abbildung 3.8-7: Zwei Chlorid-Ionen am N-Terminus einer α-Helix. *Links: Cl-1. Rechts: Cl-2. Für beide Chlorid-Ionen ist sowohl der Bindungsmodus gezeigt als auch eine Ansicht aus größerer Entfernung, die die Position am N-Terminus einer α-Helix verdeutlichen soll. Die benachbarten Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. Dabei sind C-Atome in Grau bzw. in Gold, N-Atome in Blau und O-Atome in Rot gezeigt. Die Chlorid-Ionen sind als grüne Kugeln dargestellt. Interaktionen sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt, ihre Abstände sind in Å angegeben. In den Abbildungen, in denen die Position der Chlorid-Ionen aus größerer Entfernung dargestellt ist, ist das Protein als Bändermodell gezeigt. Dabei ist Kette A grau und Kette B gold (Aminosäuren 9-32) bzw. rosa (Aminosäuren 33-150).*

3.9. Röntgenkristallographisches Fragment-*Screening* an IpgC

Eine aus 96 strukturell verschiedenen Verbindungen bestehende Fragment-Bibliothek, auch bekannt unter dem Namen *„Frag Xtal Screen“*, wurde verwendet, um IpgC einem röntgenkristallographischen Fragment-*Screening* zu unterziehen. Mithilfe dieses Fragment-*Screenings* konnten zehn Fragmente als Binder identifiziert werden. Diese *Hits* konnten an fünf unterschiedlichen Stellen des Proteins aufgefunden werden. Sieben Fragment-*Hits* besitzen die gleiche Bindestelle (siehe **Abbildung 3.9-1**). Zwei Fragmente konnten an mehr als nur einer Position eingebaut werden. In **Tabelle 3.9-1** sind alle Fragment-*Hits* mit JENA-Identifikationsnummer (JENA-ID) und Strukturformel dargestellt. Die Strukturen aller weiteren Fragmente der 96er Fragment-Bibliothek sind bei HASSAAN *et al.*[71] zu finden.

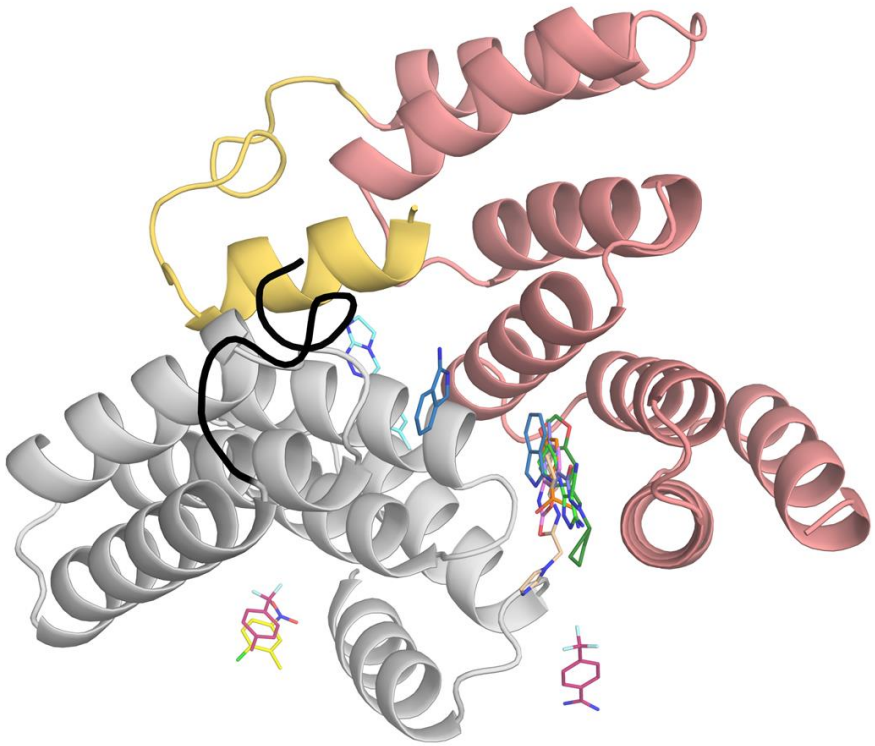
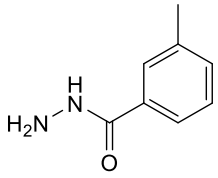
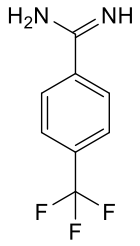
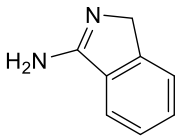
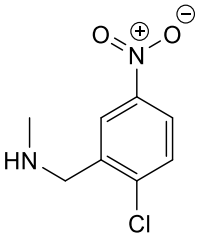
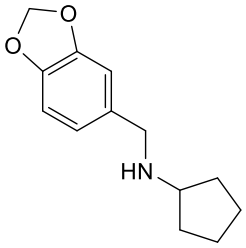
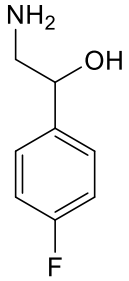
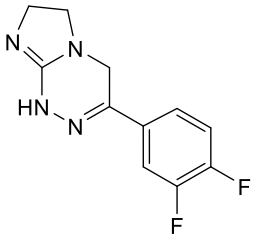
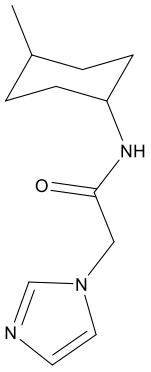
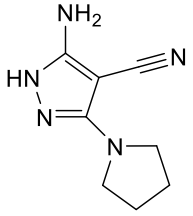
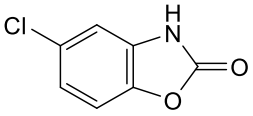


***Abbildung 3.9-1: Röntgenkristallographisch identifizierte Fragment*-Hits.** *Das Protein ist als Bändermodell dargestellt. Dabei ist Kette A schwarz (Aminosäuren 24-32) bzw. grau (Aminosäuren 33-151), Kette B gold (Aminosäuren 9-32) bzw. rosa (Aminosäuren 33-150). Die identifizierten Fragment-*Hits *sind als Stäbchenmodelle dargestellt, dabei besitzen jeweils die C-Atome der Fragmente eine unterschiedliche Farbe. N-Atome sind blau, O-Atome rot, F-Atome hellblau und Cl-Atome grün. Das Protein in dieser Abbildung wurde mithilfe der* Apo-*Struktur (PDB-Code: 6scb) erzeugt.*

***Tabelle 3.9-1: JENA-IDs und Strukturformeln der identifizierten Fragment*-Hits.**

JENA-ID	Strukturformel	JENA-ID	Strukturformel
J1		**J33**	
J2		**J36**	
J6		**J45**	
J11		**J52**	
J20		**J66**	

3.9.1. *Interface*-Tasche 1

Sieben von zehn Fragment-*Hits* besitzen die gleiche Protein-Bindestelle. Diese befindet sich in einer Tasche zwischen den Proteinketten A und B im *Interface* des Dimers der asymmetrischen Einheit (Dimer-1). Diese Tasche wird im Folgenden als „*Interface*-Tasche 1“ bezeichnet. Gebildet wird diese Tasche durch die Schleife zwischen *α*-Helix 5 und 6 der Kette A und der Rückseite der *α*-Helices 5-7 der Kette B (siehe **Abbildung 3.9-2**). Bei LUNELLI *et al*. wird die Rückseite der *α*-Helices 5-7 auch als Nebenfurche (engl. *minor groove*) beschrieben, wo evtl. Substrate binden können.[37] Diese Tasche besteht im hinteren Teil aus hydrophoben Aminosäuren (PheA97, PheB97, AlaB94, ValB107 und LeuB129). Im hinteren, unteren Teil befinden sich die Aminosäureseitenketten von TyrA104, HisA133 und TyrB104. Am Eingang zur Tasche sind die Aminosäuren AsnA102 und GluB125 lokalisiert. Diese beiden Aminosäuren verschließen in der *Apo*-Struktur die Tasche größtenteils. AsnA102 ist zeitgleich zusammen mit LysA101 Teil der Schleife zwischen *α*-Helix 5 und 6 der Kette A. Weitere am Aufbau dieser Tasche beteiligte Aminosäuren sind CysB126, GlnB114 und ThrB110.

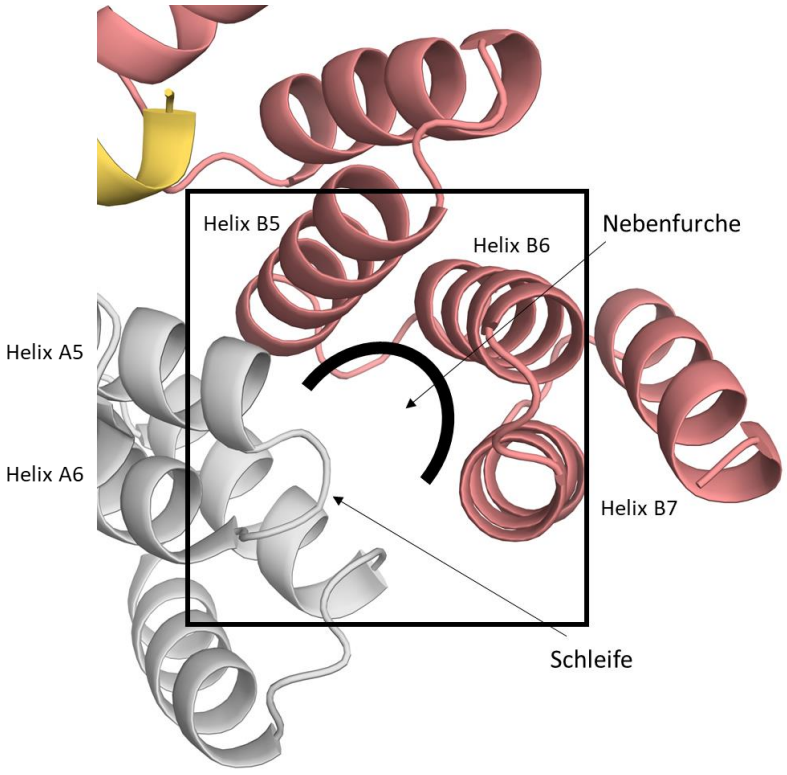


Abbildung 3.9-2:* Interface-*Tasche 1. Interface-*Tasche 1 befindet sich im* Interface *des Dimers und wird gebildet durch die Rückseite der* α*-Helices 5-7 der Kette B und der Schleife zwischen* α*-Helix 5 und 6 der Kette A. Das Protein ist als Bändermodell dargestellt. Kette A ist in Grau gezeigt, Kette B in Gold (Aminosäuren 9-32) bzw. in Rosa (Aminosäuren 33-151). Diese Abbildung wurde mithilfe der* Apo*-Struktur (PDB-Code: 6scb) erzeugt.*

3.9.2. Bindungsmodus von J20

J20 ist eines der Fragmente, die in *Interface*-Tasche 1 gebunden haben. Es konnte mit einer Besetzung von 100 % eingebaut werden. **J20** ist so in der Tasche positioniert, dass der Pyrrolidinring mit den unpolaren Aminosäuren im hinteren Bereich der Tasche hydrophobe Wechselwirkungen eingeht (siehe **Abbildung 3.9-3**). Über den Stickstoff der Nitrilgruppe geht **J20** eine H-Brücke mit dem Carbamoyl-Stickstoff von GlnB114 ein. Weiterhin gehen beide Stickstoffe des Pyrazolrings eine H-Brücke mit jeweils einem H_2O-Molekül ein. Über eines dieser H_2O-Moleküle geht **J20** eine indirekte Interaktion mit Kette A des Proteins ein, nämlich durch die ausgebildete H-Brücke zwischen dem H_2O-Molekül und der Hydroxygruppe von TyrA104. Die Aminogruppe von **J20** zeigt in Richtung Taschenеingang und geht eine schwache H-Brücke (3.5 Å) mit dem Rückgrat-Carbonyl-Sauerstoff von LysB122 ein. Im Vergleich zur *Apo*-Struktur ist die Seitenkette von GluB125 fehlgeordnet, obwohl eine direkte H-Brücke mit der Aminogruppe des Fragments denkbar gewesen wäre. Sie wurde aufgrund unzureichender Elektronendichte nicht eingebaut. Der Bindungsmodus und die F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte sind in **Abbildung 3.9-3** dargestellt.

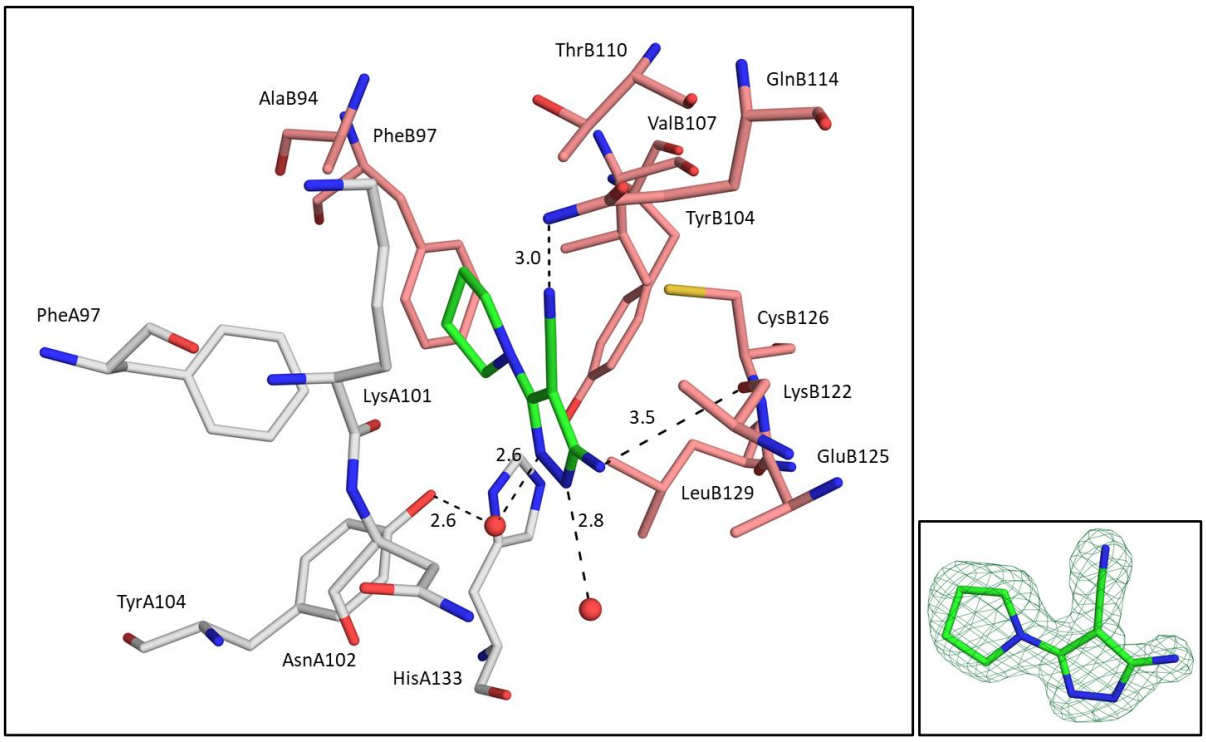


Abbildung 3.9-3: Bindungsmodus und **F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte von J20 (PDB-Code: 7axy).*** *Links: Bindungsmodus von* ***J20****. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa.* ***J20*** *ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt. C-Atome von* ***J20*** *sind in Grün gezeigt. N-Atome sind blau, O-Atome rot und S-Atome gelb. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt, ihre Abstände sind in Å angegeben. Mit dem Fragment interagierende H_2O-Moleküle sind als rote Kugeln gezeigt. Rechts: Darstellung der* F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte des Fragments bei 3.0 σ als grünes Netz.*

3.9.3. Bindungsmodus von J2

J2 kann ebenfalls in *Interface*-Tasche 1 beobachtet werden. Bei diesem Fragment handelt es sich um 1H-Isoindol-3-amin. Auch **J2** konnte mit einer Besetzung von 100 % eingebaut werden. Es besitzt mit seinem sechsgliedrigen aromatischen Ring ebenso wie **J20** einen hydrophoben Anteil. Dieser ist im hinteren Bereich der Tasche lokalisiert und geht hydrophobe Wechselwirkungen mit den dort befindlichen Aminosäuren ein (siehe **Abbildung 3.9-4**). Über seine zwei Stickstoffe geht **J2** polare Wechselwirkungen ein. Eine H-Brücke besteht zwischen der Aminogruppe des Fragments und der Carboxygruppe von GluB125. GluB125 verschließt den Eingang zur Tasche, ähnlich wie in der *Apo*-Struktur. Zudem wird eine H-Brücke zwischen der Aminogruppe und einem H_2O-Molekül ausgebildet. Eine weitere H-Brücke besteht zwischen dem Indol-Stickstoff und einem H_2O-Molekül, welches wiederum eine H-Brücke mit TyrA104 ausbildet. Somit interagiert auch **J2** indirekt mit Kette A des Proteins. Durch dieses zusätzliche H_2O-Molekül wird der Eingang zur Tasche vollständig verschlossen.

Wird die hier beobachtete Bindetasche mit der *Apo*-Struktur verglichen, fällt die abweichende Konformation von HisA133 ins Auge. In der *Apo*-Struktur bildet HisA133 eine H-Brücke mit TyrA104 und eine H-Brücke mit TyrB104 aus. Hier kann keine Interaktion mit TyrA104 beobachtet werden. An dieser Stelle ist unklar, warum diese Interaktion nicht mehr zustande kommt, da TyrA104 trotz gebundenem Fragment weiterhin als H-Brücken-Donor zur Verfügung steht. TyrA104 interagiert in der vorliegenden Struktur lediglich mit einem H_2O-Molekül, welches jedoch ebenso in der *Apo*-Struktur vorliegt.

Es konnte ein zweites Molekül von **J2** („**J2-2**“) in der Elektronendichte beobachtet werden. Dieses Molekül ist oberhalb von *Interface*-Tasche 1 lokalisiert. In **Abbildung 3.9-5** ist zusätzlich zur Position von **J2-2** die Position von **J2** gezeigt, um die räumliche Nähe der beiden Bindungspositionen zu veranschaulichen. **J2-2** geht über seine Aminogruppe eine H-Brücke mit einem H_2O-Molekül ein. Dieses H_2O-Molekül interagiert nicht direkt mit dem Protein, da es sich hierbei um ein H_2O-Molekül der zweiten Hydrathülle handelt. Weiterhin geht **J2-2** über den Indol-Stickstoff eine H-Brücke mit der Carboxygruppe von AspB91 ein. AspB91 interagiert über den anderen Sauerstoff der Carboxygruppe mit LysA101. Dabei handelt es sich um eine der zuvor erwähnten, im *Interface* von Dimer-1 vorhandenen H-Brücken (siehe **Kapitel 3.8.2**). Die Besetzung von **J2-2** wurde auf 85 % verfeinert.

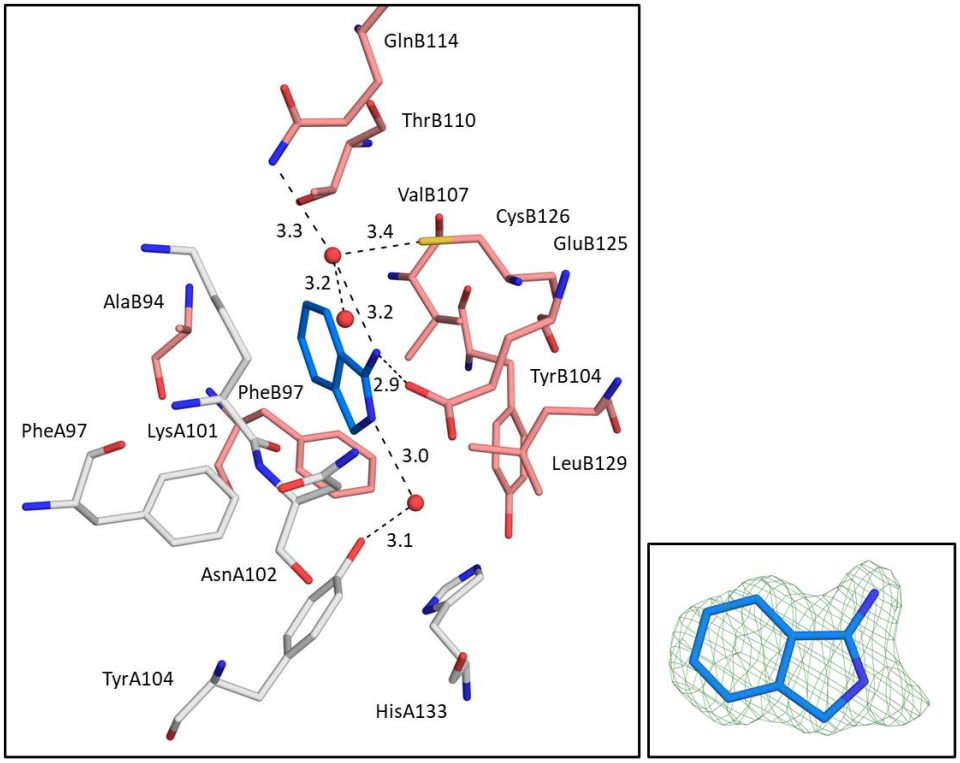


Abbildung 3.9-4: Bindungsmodus und F_o-F_c-Omit-Elektronendichte von J2 (PDB-Code: 7ayw). *Links: Bindungsmodus von **J2**. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa. **J2** ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt. C-Atome von **J2** sind mittelblau. N-Atome sind dunkelblau, O-Atome rot und S-Atome gelb. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt, ihre Abstände sind in Å angegeben. H_2O-Moleküle sind als rote Kugeln abgebildet. Rechts: Darstellung der* F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte des Fragments bei 3.0 σ als grünes Netz.*

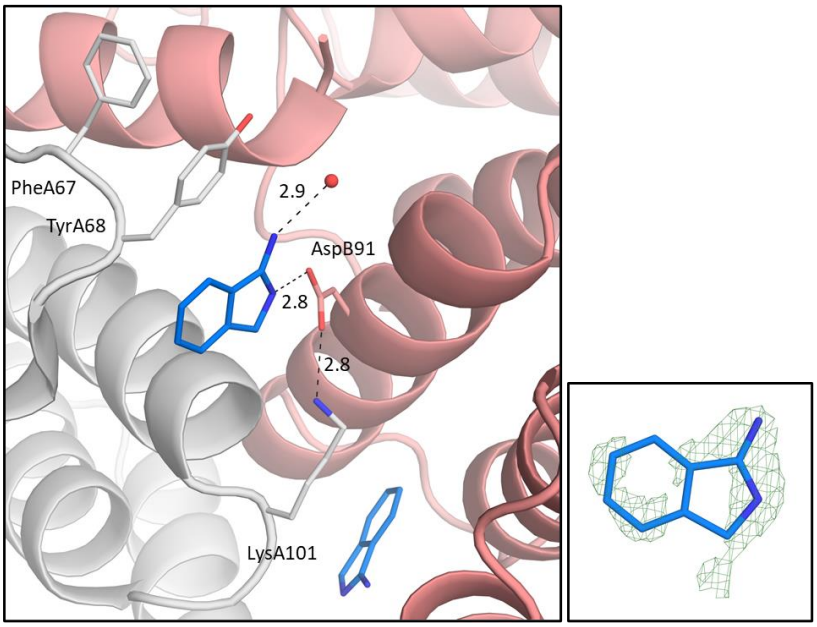


Abbildung 3.9-5: Bindungsmodus und F_o-F_c-Omit-Elektronendichte von J2-2 (PDB-Code: 7ayw). *Links: Bindungsmodus von **J2-2**. Das Protein ist als Bändermodell dargestellt. Kette A ist grau und Kette B rosa. Seitenketten ausgewählter Aminosäuren sind zusätzlich als Stäbchenmodelle gezeigt, dabei sind C-Atome in der entsprechenden Farbe der Proteinkette dargestellt, O-Atome rot und N-Atome blau. **J2** und **J2-2** sind als Stäbchenmodelle dargestellt, die entsprechenden C-Atome sind mittelblau. Das H_2O-Molekül ist als rote Kugel gezeigt. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt, ihre Abstände sind in Å angegeben. Rechts: Darstellung der* F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte des Fragments bei 3.0 σ als grünes Netz.*

In der vorliegenden Struktur sind die Seitenketten der Aminosäuren PheA67 und TyrA68 in der Elektronendichte klar definiert, wohingegen diese in vielen anderen Strukturen meist fehlgeordnet sind bzw. eine zweite Konformation einnehmen. Die zweite Konformation von TyrA68 ist hier aufgrund des gebundenen Fragment-Moleküls nicht möglich, da **J2-2** diesen Platz einnimmt. Zudem wird die hier vorliegende Konformation von TyrA68 durch π-π-Wechselwirkungen mit **J2-2** stabilisiert.

Nach Einbau von **J2-2** verblieb in Molekülnähe F_o-F_c-Differenzelektronendichte, die eventuell auf eine zweite Orientierung von **J2-2** hindeuten könnte. Allerdings war diese zu schlecht definiert, um den Einbau einer zweiten Orientierung zu ermöglichen. Dennoch soll dies hier Erwähnung finden. In **Abbildung 3.9-6** ist daher eine zweite mögliche Orientierung von **J2-2** gezeigt. Zusätzlich ist die verbleibende Differenzelektronendichte gezeigt, die genau dort positioniert ist, wo die Aminogruppe einer möglichen zweiten Orientierung lokalisiert sein könnte. Die Aminogruppe des Fragment-Moleküls würde so eine H-Brücke mit dem Rückgrat-Sauerstoff von LeuA99 ausbilden. Die H-Brücke zwischen Indol-Stickstoff und AspB91 bliebe in leicht abgewandelter Form bestehen. Die verbleibende Differenzelektronendichte kann nicht durch ein H_2O-Molekül verursacht worden sein, da der Abstand zwischen einem solchen H_2O-Molekül und **J2-2** zu gering wäre.

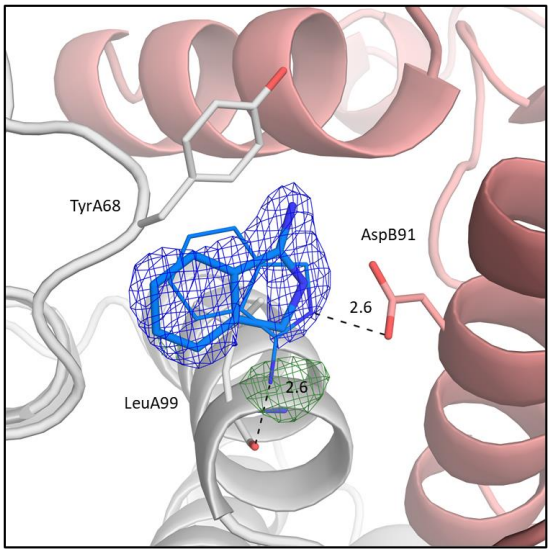


Abbildung 3.9-6: Bindungsmodus einer möglichen zweiten Orientierung von J2-2. *Das Protein ist als Bändermodell dargestellt. Kette A ist grau und Kette B rosa. Seitenketten ausgewählter Aminosäuren sind zusätzlich als Stäbchenmodelle gezeigt, dabei sind C-Atome in der entsprechenden Farbe der Proteinkette dargestellt, O-Atome rot und N-Atome blau.* ***J2-2*** *ist ebenfalls als Stäbchenmodell dargestellt, seine C-Atome sind mittelblau. Die zweite mögliche Orientierung von* ***J2-2*** *ist mit einem geringeren Stäbchenradius dargestellt. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien angedeutet, ihre Abstände sind in Å angegeben. Die* $2F_o$-F_c*-Elektronendichte nach Einbau von* ***J2-2*** *ist als blaues Netz bei 1.0 σ und die verbleibende* F_o-F_c*-Differenzelektronendichte als grünes Netz bei 3.0 σ dargestellt.*

3.9.4. Bindungsmodus von J1

Ein weiteres Fragment, welches in *Interface*-Tasche 1 gebunden hat, ist **J1**. Auch **J1** konnte mit einer Besetzung von 100 % verfeinert werden. Ebenso wie die zwei zuvor beschriebenen Fragment-*Hits* besitzt auch **J1** einen hydrophoben Molekülanteil, der im hinteren Bereich der Tasche lokalisiert ist. Dabei handelt es sich um einen 3-Methylphenyl-Rest. Dieser geht hydrophobe Wechselwirkungen mit den dort befindlichen Aminosäuren ein (siehe **Abbildung 3.9-7**). Der andere Teil des Fragments ist in Richtung Taschencingang gerichtet. Dort geht **J1** über den endständigen Stickstoff der Carbonsäurehydrazid-Gruppe eine H-Brücke mit dem Rückgrat-Carbonyl-Sauerstoff von LysB122 ein. Denkbar gewesen wäre eine weitere direkte H-Brücke zwischen dem anderen Stickstoff der Carbonsäurehydrazid-Gruppe und der Seitenkette von AsnA102, allerdings konnte diese aufgrund unzureichender Elektronendichte nicht eingebaut werden. In Richtung TyrA104 werden keine weiteren H-Brücken ausgebildet. Dort sitzt, wie in den zuvor beschriebenen Strukturen auch, ein H_2O-Molekül, welches mit TyrA104 durch Ausbildung einer H-Brücke in Wechselwirkung tritt. Dieses H_2O-Molekül geht jedoch, wenn überhaupt, nur eine sehr schwache Wechselwirkung mit dem Fragment ein, denn der Abstand ist mit 4.7 Å sehr groß. Die Lage der Seitenkette von GluB125 war in der Elektronendichte nicht zu erkennen, weshalb diese in **Abbildung 3.9-7** fehlt.

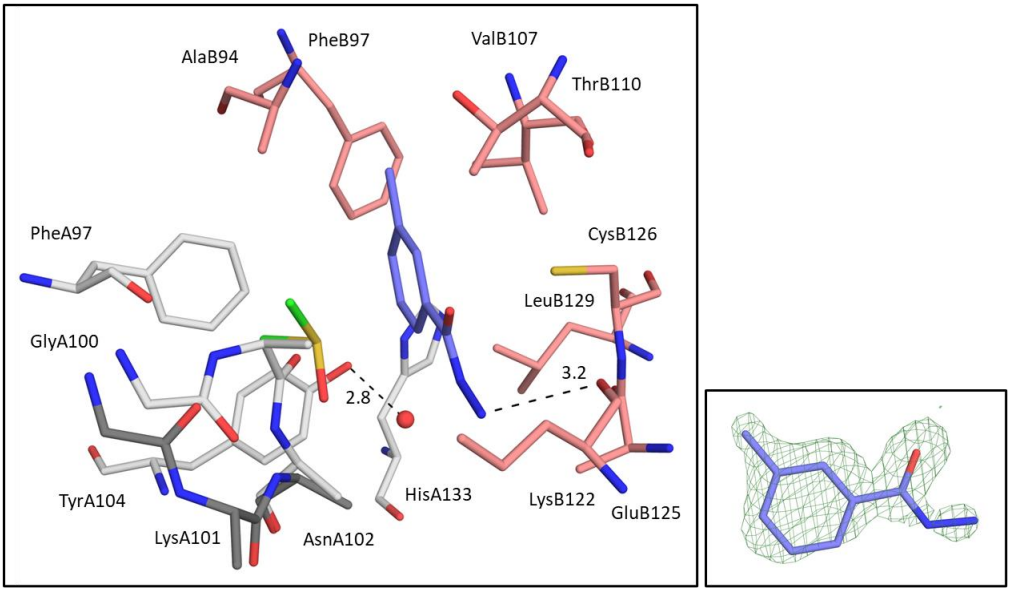


Abbildung 3.9-7: Bindungsmodus und **F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte von J1 (PDB-Code: 7nl8)***. *Links: Bindungsmodus von **J1**. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa. **J1** ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt. C-Atome von **J1** sind in Lila dargestellt. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb und die C-Atome des DMSO-Moleküls grün. Die C-Atome der „offenen" Konformation der Schleife sind in einem dunkleren Grauton gezeigt. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt, ihre Abstände sind in Å angegeben. Wassermoleküle sind als rote Kugeln abgebildet. Rechts: Darstellung der* F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte des Fragments bei 3.0 σ als grünes Netz.*

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Fragmenten ist **J1** anscheinend in der Lage, eine Konformationsänderung der Schleife, bestehend aus AlaA98-AsnA102, zu bewirken. Es konnten zwei unterschiedliche Konformationen dieser Schleife in der Differenzelektronendichte beobachtet werden (siehe **Abbildung 3.9-8** links). In **Abbildung 3.9-8** ist ihre „offene" Konformation durch einen dunkleren Grauton hervorgehoben. Die Besetzung der geschlossenen Konformation konnte auf 47 % verfeinert werden. Dementsprechend beträgt die Besetzung der offenen Konformation 53 %. Die Seitenketten von LysA101 und AsnA102 konnten aufgrund unzureichender Elektronendichte in beiden Fällen nicht eingebaut werden.

Nach Einbau dieser beiden Konformationen verblieb jedoch an Position des C_α-Atoms von LysA101 der geschlossenen Konformation Differenzelektronendichte. Die Vermutung, es könne sich hierbei um ein DMSO-Molekül handeln, wurde durch ein anomales Signal für den Schwefel des DMSO-Moleküls in der anomalen Dichtekarte bestätigt (nicht gezeigt). Es wurde daher an dieser Stelle ein DMSO-Molekül eingebaut. Da dieses DMSO-Molekül nur vorliegen kann, wenn sich die Schleife in ihrer offenen Konformation befindet, wurde die Besetzung des DMSO-Moleküls entsprechend auf 53 % gesetzt. In **Abbildung 3.9-8** rechts ist die Elektronendichte nach Einbau der Schleife und des DMSO-Moleküls gezeigt. Der Sauerstoff des DMSO-Moleküls geht eine H-Brücke mit dem Hauptketten-Amid von AsnA102 der offenen Konformation ein, deren Länge 2.7 Å beträgt (H-Brücke in **Abbildung 3.9-8** nicht gezeigt).

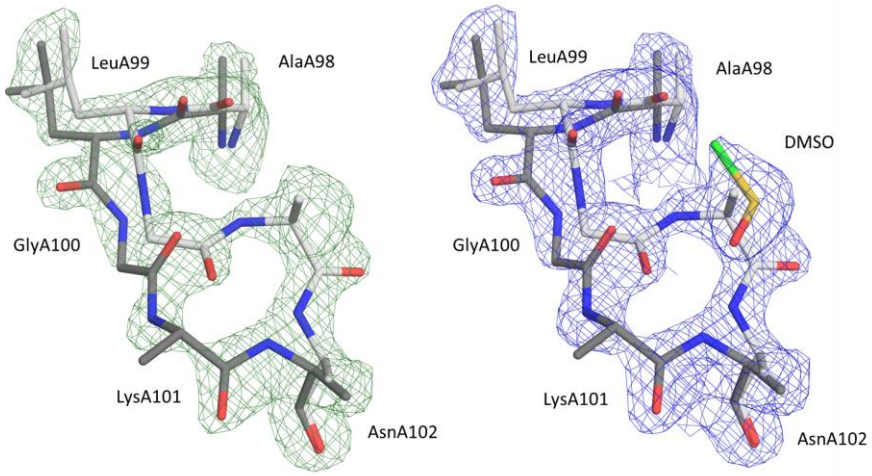


Abbildung 3.9-8: F_o-F_o-Differenzelektronendichte und 2F_o-F_c-Elektronendichte der zwei* Loop-*Konformationen. *Dargestellt sind die Aminosäuren Ala98, Leu99, Gly100, Lys101 und Asn102 der Kette A als Stäbchenmodelle. Die Seitenketten der Aminosäuren Lys101 und Asn102 waren in der Elektronendichte nicht zu erkennen und sind somit auch nicht eingebaut worden. Die C-Atome der geschlossenen Konformation sind in Hellgrau dargestellt, die C-Atome der offenen Konformation in Dunkelgrau. O-Atome sind rot, N-Atome blau und S-Atome gelb. Die C-Atome des DMSO-Moleküls sind in Grün gezeigt. Links: Darstellung der F_o-F_c-Differenzelektronendichte vor Einbau dieser Aminosäuren als grünes Netz bei 3.0 σ. Rechts: Darstellung der 2F_o-F_c-Elektronendichte nach Einbau der Aminosäuren und des DMSO-Moleküls als blaues Netz bei 1.0 σ.*

3.9.5. Bindungsmodus von J45

Auch **J45** befindet sich in *Interface*-Tasche 1. Der *para*-Fluorphenyl-Ring ist im hinteren Bereich der Tasche positioniert und geht hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Protein ein. Durch die Aminogruppe, die in Richtung Tascheneingang zeigt, geht **J45** eine H-Brücke mit einem H_2O-Molekül ein, welches wiederum mit dem Rückgrat-Sauerstoff von LysB122 interagiert. Zudem bildet **J45** zwei weitere H-Brücken mit seiner freien Hydroxygruppe aus. Einmal interagiert es mit dem Rückgrat-Sauerstoff von LysA101 der geschlossenen Konformation. Zudem besteht eine H-Brücke mit einem weiteren H_2O-Molekül, welches wiederum mit der Hydroxygruppe von TyrA104 eine H-Brücke ausbildet. Wie in der Struktur mit **J1** (PDB-Code: 7nl8) konnte auch hier eine zweite Konformation der Schleife in das Strukturmodell eingebaut werden. In **Abbildung 3.9-9** sind der Bindungsmodus von **J45** sowie die zwei Konformationen der Schleife dargestellt.

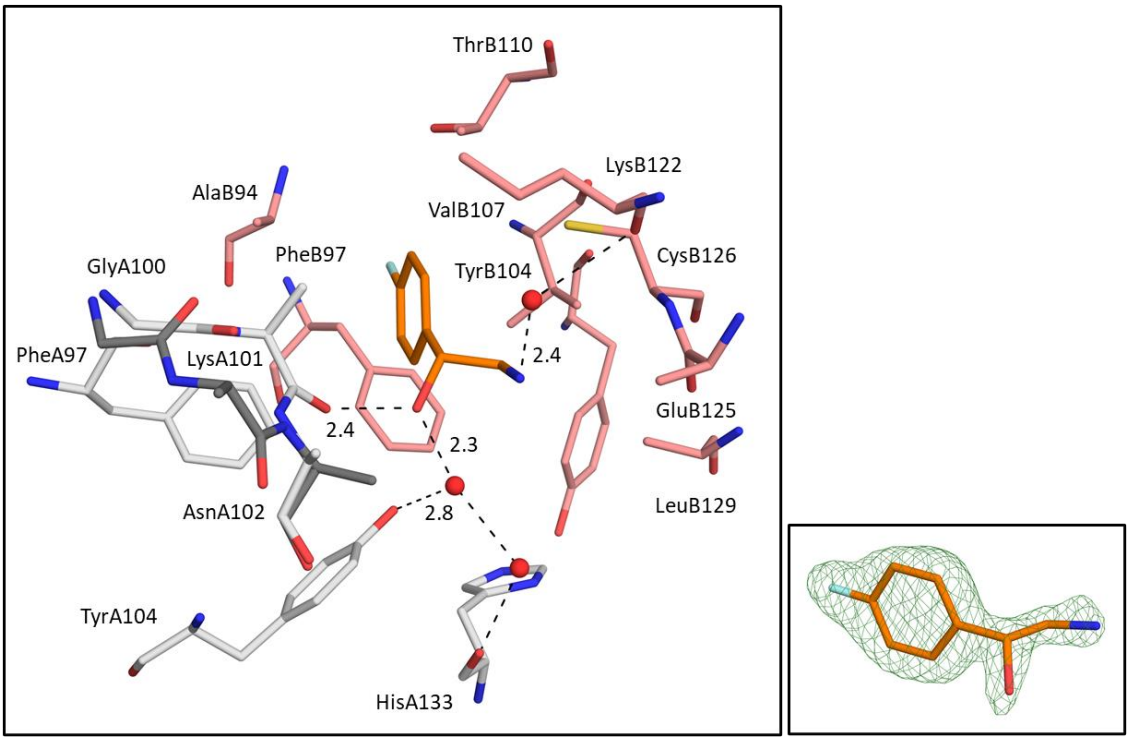


Abbildung 3.9-9: ***Bindungsmodus und*** **F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte von J45 (PDB-Code: 7nrg).*** *Links: Bindungsmodus von* ***J45****. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa.* ***J45*** *ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt. C-Atome von* ***J45*** *sind in Orange gezeigt. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb und F-Atome hellblau. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt, ihre Abstände sind in Å angegeben. Wassermoleküle sind als rote Kugeln abgebildet. Rechts: Darstellung der* F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte des Fragments bei 3.0 σ als grünes Netz.*

Die Besetzung von **J45** wurde auf 85 % gesetzt. Sie wurde zwar zunächst auf 91 % verfeinert, allerdings besaß **J45** mit einer Besetzung von 91 % an der Position des F-Atoms negative F_o-F_c-Differenzelektronendichte. Die geschlossene Konformation der Schleife nimmt eine Besetzung von 45 % ein. Die Seitenketten von LysA101 und AsnA102 waren auch in dieser Struktur fehlgeordnet. Die vom Fragment ausgehenden sehr kurzen H-Brücken zeigen an, dass das Fragment und die geschlossene Konformation der Schleife eventuell gleichzeitig existieren können. Das Fragment scheint die Schleife zu einem gewissen Prozentsatz nach außen zu drücken, um in der Tasche genügend Platz zu finden bzw. die Position in der Tasche einnehmen zu können. Auch in dieser Struktur besitzt HisA133 eine von der *Apo*-Struktur abweichende Konformation, obwohl auch hier TyrA104 nicht als H-Brücken-Donor vom Fragment benötigt wird.

Ebenso ist hier erneut zusätzliche Differenzelektronendichte an Position des C_α-Atoms von LysA101 der geschlossenen Konformation zu beobachten (siehe **Abbildung 3.9-10**). Allerdings konnte hier für das DMSO-Molekül keine passende Orientierung gefunden werden, in der die Abstände zu umliegenden Aminosäuren groß genug gewesen wären. Zudem konnte kein anomales Signal an dieser Position beobachtet werden, weshalb auf den Einbau eines DMSO-Moleküls verzichtet wurde.

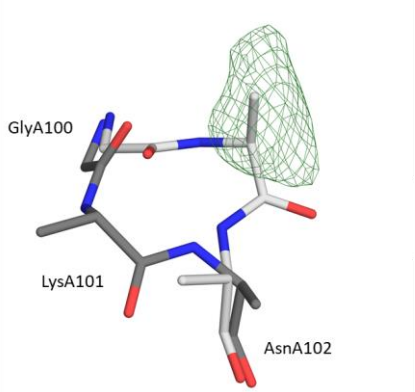


Abbildung 3.9-10: Zusätzliche F_o-F_o-Differenzelektronendichte an Position des C_α-Atoms von LysA101 der geschlossenen Konformation. *Dargestellt sind die Aminosäuren Gly100, Lys101 und Asn102 der Kette A als Stäbchenmodelle. Die Seitenketten der Aminosäuren Lys101 und Asn102 waren in der Elektronendichte nicht zu erkennen und wurden daher auch nicht eingebaut. C-Atome der geschlossenen Konformation sind in Hellgrau dargestellt, C-Atome der offenen Konformation in Dunkelgrau. O-Atome sind rot und N-Atome blau. Die verbleibende F_o-F_c-Differenzelektronendichte nach Einbau der zwei Konformationen ist als grünes Netz bei 3.0 σ gezeigt.*

3.9.6. Bindungsmodus von J66

Ein weiteres Fragment, welches in *Interface*-Tasche 1 gebunden hat, ist **J66**. Die Besetzung des Fragments wurde auf 85 % gesetzt. Sie wurde zwar zwischenzeitlich auf 91 % verfeinert, allerdings besaß **J66** mit dieser Besetzung im Bereich des Fünfrings rote Differenzelektronendichte. **J66** besitzt einen Halogen-substituierten Benzolring, der im hinteren Bereich der Tasche zu finden ist, ähnlich zu **J45**. Bei **J66** handelt es sich jedoch nicht um ein F-Atom, sondern um ein Cl-Atom. Dieser Bereich des Fragments geht mit dem Protein hydrophobe Wechselwirkungen ein. Der andere Molekülteil von **J66** zeigt in Richtung TyrA104. Dort kommt es zur Ausbildung einer H-Brücke zwischen dem heterocyclischen Stickstoff, welcher als Donor fungiert, und der Hydroxygruppe von TyrA104. Der Abstand dieser H-Brücke beträgt 2.4 Å. Durch die Wechselwirkung von **J66** mit TyrA104 wurde das H_2O-Molekül, welches in vielen Strukturen an der Position des exocyclischen Sauerstoffs lokalisiert ist, verdrängt. Die beiden Sauerstoffe des Fragments gehen keine weiteren H-Brücken mit dem Protein bzw. umliegenden H_2O-Molekülen ein. Es konnten auch hier zwei Konformationen für die Schleife mit den Aminosäuren GlyA100, LysA101 und AsnA102 eingebaut werden. Die geschlossene Konformation ist mit einer Besetzung von 56 % verfeinert worden. Genau wie in den zwei zuvor beschriebenen Strukturen verblieb auch hier Differenzelektronendichte an Position des C_α-Atoms von LysA101 der geschlossenen Konformation. Doch wie in der Struktur mit **J45** konnte auch hier keine optimale Orientierung für ein DMSO-Molekül gefunden werden, welches daher nicht eingebaut wurde. Der Bindungsmodus von **J66** und die F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte des Fragments sind in **Abbildung 3.9-11** dargestellt.

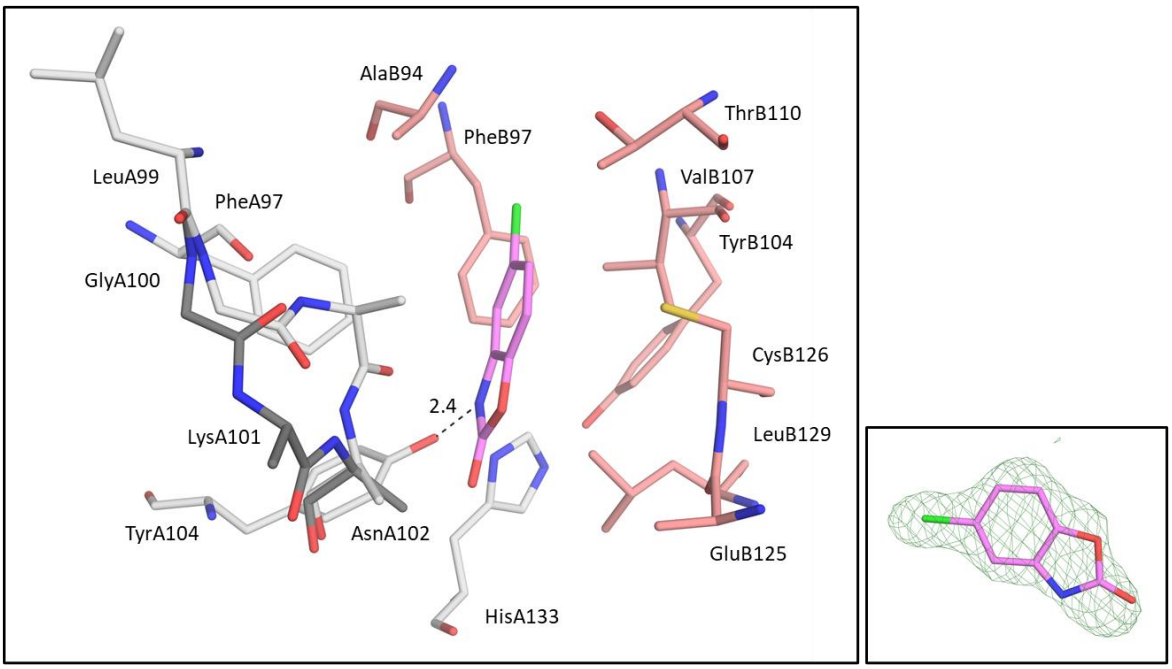


Abbildung 3.9-11: Bindungsmodus und* F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte von J66 (PDB-Code: 7nhw). *Links: Bindungsmodus von* ***J66****. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa. C-Atome der geschlossenen Konformation sind in Hellgrau dargestellt, C-Atome der offenen Konformation in Dunkelgrau.* ***J66*** *ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt. Die C-Atome von* ***J66*** *sind pink. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb und Cl-Atome grün. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt, ihre Abstände sind in Å angegeben. Rechts: Darstellung der* F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte des Fragment*-Hits *bei 3.0 σ als grünes Netz.*

3.9.7. Bindungsmodus von J6

Auch **J6** gehört zu den Fragmenten, die in *Interface*-Tasche 1 gebunden haben. **J6** besaß nach vollständiger Verfeinerung eine Besetzung von 93 %. Das Fragment liegt mit seinem 1,3-Benzodioxol-Ring im hydrophoben Bereich der Tasche und geht dort hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Protein ein (siehe **Abbildung 3.9-12**). Ein Sauerstoff des 1,3-Benzodioxol-Rings befindet sich in H-Brückenabstand zu ThrB110 (2.9 Å), allerdings wird das H-Atom dieser Hydroxygruppe mit dem Rückgrat-Sauerstoff von ProB106 interagieren, da es sich bei einem Ether-Sauerstoff um einen schwächeren H-Brückenakzeptor handelt. In der Nähe des Fragment-Stickstoffs befindet sich ein sehr gut definiertes H_2O-Molekül. Mit 3.3 Å ist der Abstand zu diesem H_2O-Molekül sehr groß. Es handelt sich daher nur um eine schwache H-Brücke. Der Abstand dieses H_2O-Moleküls zum Schwefelatom von CysB126 beträgt mehr als 3.5 Å. **J6** geht keine einzige H-Brücke mit dem Protein ein. Der im Taschenеingang befindliche fünfgliedrige Kohlenstoffring sorgt für eine Fehlordnung der Seitenkette von GluB125. Auch hier konnten wiederum zwei Konformationen für die Aminosäuren LeuA99-AsnA102 eingebaut werden, die geschlossene Konformation mit einer Besetzung von 52 %. Ebenso war wiederum Differenzelektronendichte vorhanden, die auf ein DMSO-Molekül hindeutete, diese

war allerdings nicht ausreichend gut definiert, um das Molekül im Strukturmodell zu berücksichtigen. An Position des C_α-Atoms von LysA101 in geschlossener Konformation konnte ein anomales Signal gemessen werden. Eine Besonderheit, die in dieser Struktur beobachtet werden kann, ist das parallele Vorliegen von zwei Konformationen für HisA133 und dadurch bedingt für LeuB129. Es ist allerdings auch hier nicht klar, warum es zur Konformationsänderung von HisA133 kommt, da TyrA104 auch hier weiterhin als H-Brücken-Donor zur Verfügung steht.

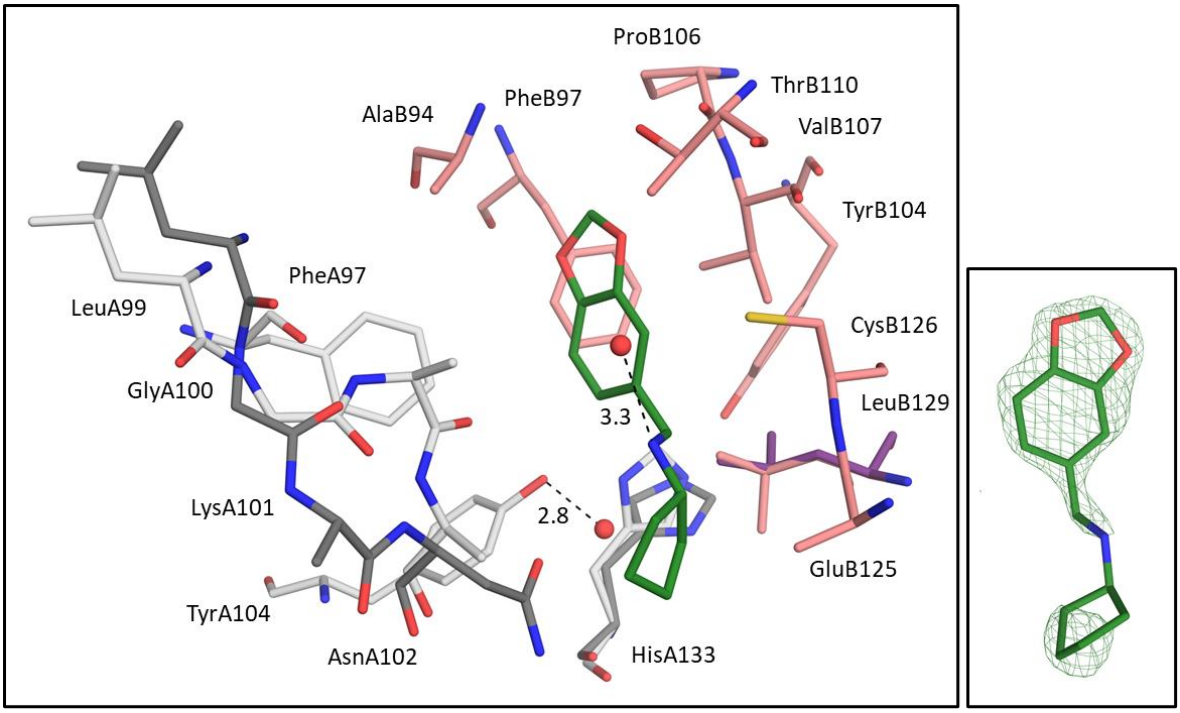


Abbildung 3.9-12: Bindungsmodus und F_o-F_c-Omit-Elektronendichte von J6 (PDB-Code: 7o6s). *Links: Bindungsmodus von **J6**. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa. C-Atome der geschlossenen Konformation sind in Hellgrau dargestellt, C-Atome der offenen Konformation in Dunkelgrau. Auch die zweite Konformation von HisA133 ist in Dunkelgrau gezeigt, die zweite Konformation von LeuB129 in Lila. **J6** ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt. C-Atome von **J6** sind dunkelgrün. N-Atome sind blau, O-Atome rot und S-Atome gelb. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt, ihre Abstände sind in Å angegeben. Rechts: Darstellung der F_o-F_c-Omit-Elektronendichte des Fragments bei 3.0 σ als grünes Netz.*

3.9.8. Bindungsmodus von J52

Das letzte Fragment, welches in *Interface*-Tasche 1 aufgefunden werden kann, ist **J52**. **J52** ist dort so platziert, dass sein 4-Methylcyclohexan-Ring im hydrophoben Bereich der Tasche liegt und dort hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Protein eingeht (siehe **Abbildung 3.9-13**). Über den Carbonyl-Sauerstoff geht **J52** eine direkte H-Brücke mit TyrA104 ein. Hier fungiert TyrA104 das erste Mal als H-Brücken-Donor. **J52** ist somit das zweite Fragment, welches eine direkte H-Brücke zu TyrA104 ausbildet. Über den Amid-Stickstoff geht **J52** eine H-Brücke mit einem H_2O-Molekül der ersten Hydrathülle ein. Die Besetzung von **J52** wurde auf 71 %

verfeinert. Der Imidazolring von **J52** ragt aus *Interface*-Tasche 1 heraus und bildet über seinen Stickstoff eine H-Brücke mit einem H_2O-Molekül aus. Auch in dieser Struktur konnte die Schleife zwischen α-Helix 5 und 6 der Kette A in zwei Konformationen eingebaut werden. Bei der zweiten Konformation handelt es sich jedoch um eine bislang noch nicht beobachtete Schleifenkonformation. LysA101 behält in etwa die Konformation bei, während AsnA102 nach außen gedreht ist und so Platz macht für **J52**. In Korrelation mit der Besetzung von **J52** wurde die Schleife in offener Konformation zu 71 % und in geschlossener Konformation zu 29 % verfeinert. HisA133 zeigt in der hier vorliegenden Struktur eine zur *Apo*-Struktur identische Konformation, obwohl TyrA104 als H-Brücken-Donor zur Ausbildung einer H-Brücke mit dem Fragment benötigt wird. HisA133 wird also hier bei der Interaktion mit TyrA104 selbst als H-Brücken-Donor fungieren.

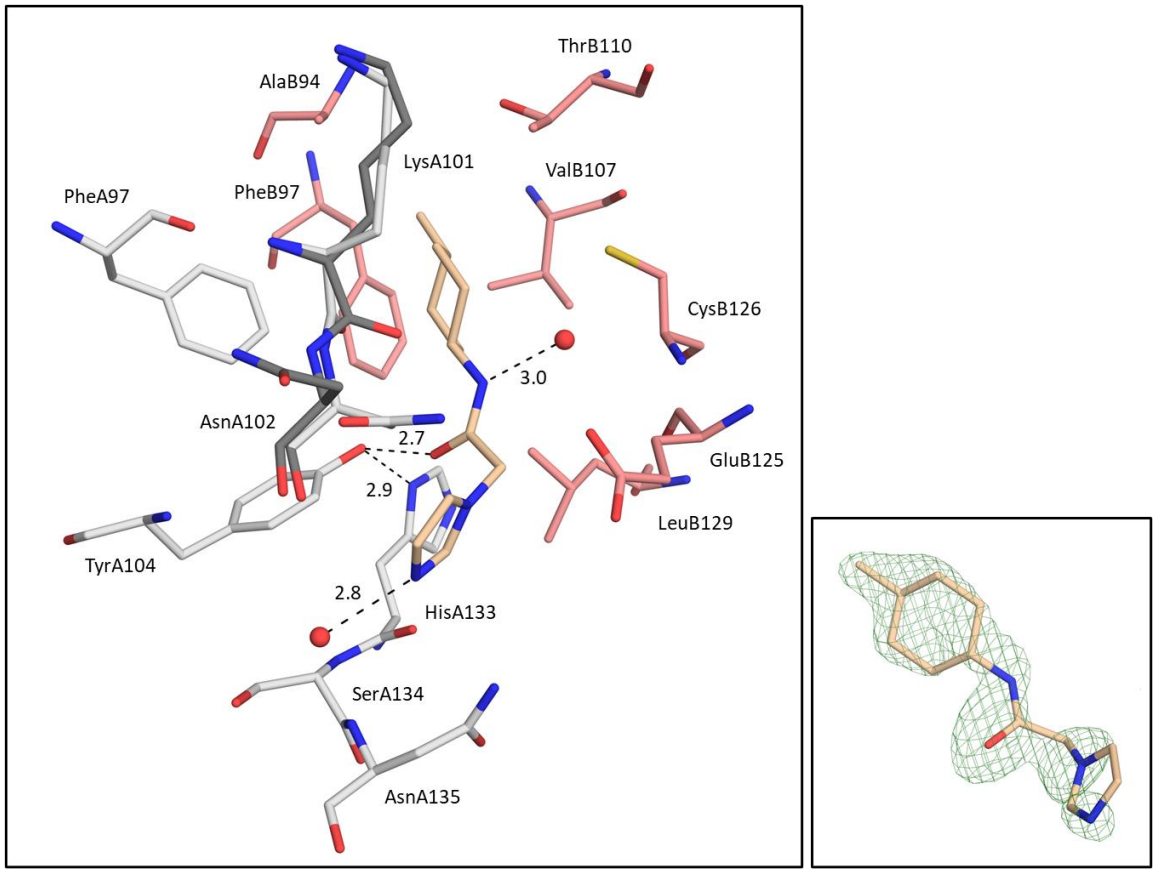


Abbildung 3.9-13: Bindungsmodus und F_o-F_c-Differenzelektronendichte von J52 (PDB-Code: 7pe0). *Links: Bindungsmodus von **J52**. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa. **J52** ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt. Die C-Atome von **J52** sind beige. N-Atome sind blau, O-Atome rot und S-Atome gelb. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt, ihre Abstände sind in Å angegeben. Rechts: Darstellung der F_o-F_c-Differenzelektronendichte des Fragments bei 2.5 σ als grünes Netz.*

3.9.9. Bindungsmodus von J36

Im Gegensatz zu den bislang beschriebenen Fragment-*Hits* konnte **J36** nicht in *Interface*-Tasche 1 eingebaut werden, obwohl dort Differenzelektronendichte beobachtet werden kann. Es fällt zudem auf, dass die Aminosäuren der flexiblen Schleife nicht in der geschlossenen Konformation vorliegen. In **Abbildung 3.9-14** oben wurde die in der hier vorliegenden Struktur beobachtete Schleifenkonformation mit der Konformation der *Apo*-Struktur überlagert. Es wird deutlich, dass diese nicht übereinstimmen. In der hier vorliegenden Struktur kann das erste Mal nur die offene Konformation in der Elektronendichte beobachtet werden und das, obwohl **J36** nicht 100 % eindeutig in der Elektronendichte identifiziert werden konnte und dort letztendlich auch nicht eingebaut wurde. In **Abbildung 3.9-14** unten ist die in der Tasche vorhandene Differenzelektronendichte gezeigt. Zudem ist eine denkbare Position von **J36** dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Nitrogruppe und das Cl-Atom sehr gut in die vorhandene Dichte passen. An Position des Cl-Atoms konnte zudem ein anomales Signal beobachtet werden. Es fehlt allerdings Dichte für einen Teil des Phenylrings. Hinzu kommt, dass zwar Differenzelektronendichte vorhanden ist, die der *N*-Methylmethylamin-Gruppe zugeordnet werden könnte, allerdings ist diese Position identisch mit der Position, an der in anderen Strukturen Dichte für ein DMSO-Molekül beobachtet wurde. Der Stickstoff des Fragments würde in der gezeigten Position eine H-Brücke zum Rückgrat-Sauerstoff von GlyA100 ausbilden (siehe **Abbildung 3.9-14** unten). Außerdem fehlt Dichte zwischen diesem Stickstoff und dem Phenylring. Allerdings lässt sich eine solche konformative Änderung der Schleife nur durch das Binden eines Liganden erklären.

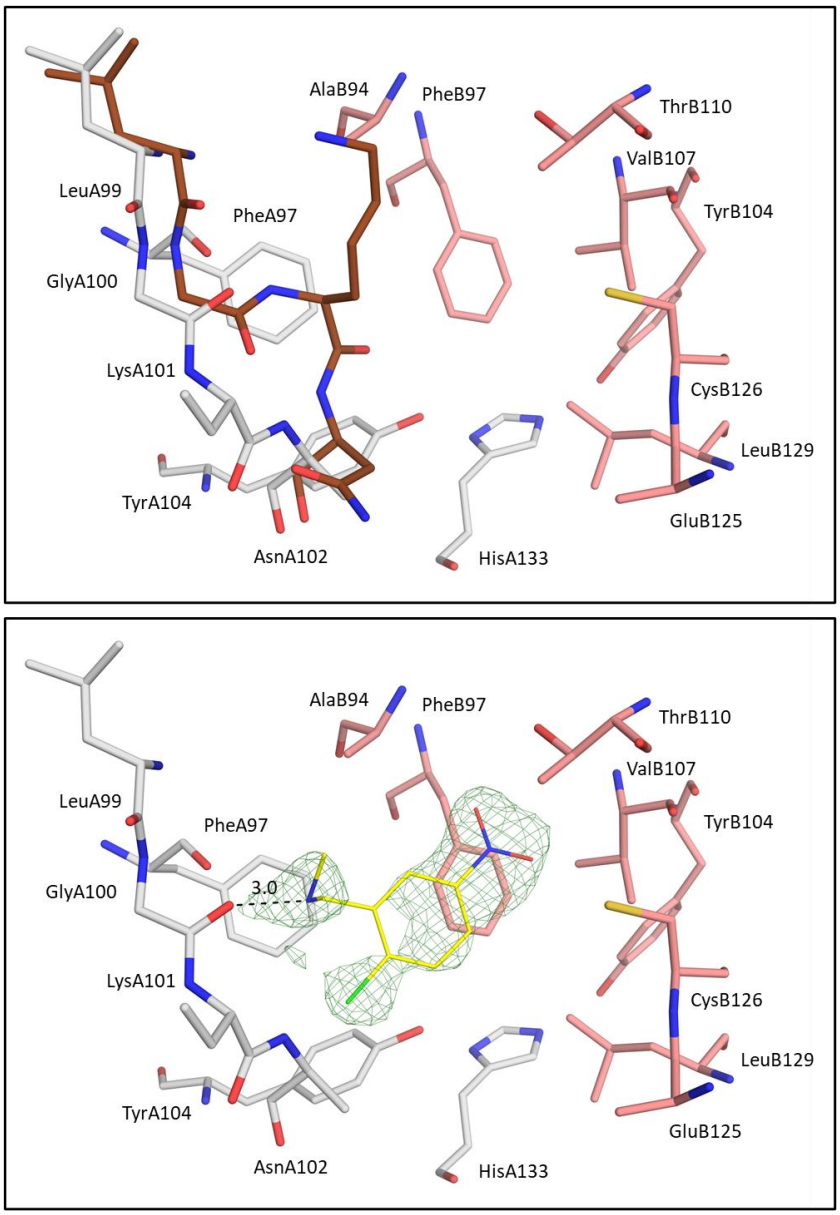


Abbildung 3.9-14: Überlagerung der Schleifenkonformationen und **F_o-F_c-*Differenzelektronendichte in* Interface-*Tasche 1.*** *Oben: Schleifenkonformation der* Apo-*Struktur und Schleifenkonformation der hier beschriebenen Struktur im Vergleich. Unten:* F_o-F_c-*Differenzelektronendichte in* Interface-*Tasche 1 und denkbare Position von* ***J36****. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa. C-Atome der* Apo-*Struktur sind braun.* ***J36*** *ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt. Die C-Atome von* ***J36*** *sind gelb. N-Atome sind blau, O-Atome rot und S-Atome gelb. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt, ihre Abstände sind in Å angegeben. Die* F_o-F_c-*Differenzelektronendichte ist als grünes Netz bei 3.0 σ gezeigt.*

J36 konnte zwar nicht in *Interface*-Tasche 1 eingebaut werden, allerdings konnte an anderer Stelle Differenzelektronendichte beobachtet werden, die eindeutig diesem Fragment zugeordnet werden konnte. Somit war mit **J36** ein weiterer IpgC-Fragment-Komplex erhalten worden. **J36** ist auf einer Symmetrieachse positioniert und wurde mit einer Besetzung von 100 % verfeinert. Diese Position ist insoweit besonders, da sich **J36** zwischen Tyr146 von Kette A und genau dieser Aminosäure einer symmetrieäquivalenten Proteinkette befindet. Diese Interaktion beruht ausschließlich auf π-π-Wechselwirkungen, da die aromatischen Ringe parallel zueinander ausgerichtet sind. In **Abbildung 3.9-15** ist neben dem eingebauten Fragment-*Hit* auch die Lage des Symmetrieäquivalents gezeigt (Molekül besitzt dünneren Stäbchenradius), welches nicht ganz deckungsgleich zum eingebauten Fragment ist. Der Stickstoff und die daran befindliche Methylgruppe konnten nicht eingebaut werden, da die nötige Elektronendichte fehlte.

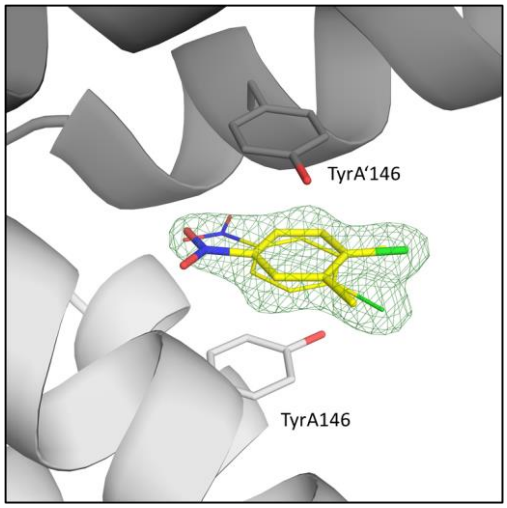


Abbildung 3.9-15: Bindungsmodus und F_o-F_c-Omit-Elektronendichte von J36 (PDB-Code: 7o04). *Das Protein ist als Bändermodell gezeigt. Kette A ist in Grau dargestellt, Kette A des Symmetrieäquivalents in Dunkelgrau. Die Seitenketten von TyrA146 und TyrA'146 sind als Stäbchenmodelle gezeigt.* ***J36*** *ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt, dabei besitzen C-Atome die Farbe Gelb. O-Atome sind rot, N-Atome blau und Cl-Atome grün. Die* F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte des Fragments ist als grünes Netz bei 3.0* σ *dargestellt.*

3.9.10. *Blank*-Struktur zeigt DMSO-Molekül in *Interface*-Tasche 1

Bei manchen Fragmenten, die in *Interface*-Tasche 1 gebunden haben, konnte zusätzliche Elektronendichte beobachtet werden. Dies war der Fall bei den Fragmenten **J1**, **J6**, **J45** und **J66. J1** wurde mit einer Besetzung von 100 % verfeinert, **J6** mit einer Besetzung von 96 %. Bei **J45** und **J66** wurde die Besetzung auf 85 % gesetzt. Die Vermutung lag nahe, dass in *Interface*-Tasche 1 noch ein weiteres Molekül gebunden haben könnte. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden Kristalle in *Soaking*-Lösung transferiert, welche kein Fragment, sondern lediglich 10 % DMSO beinhaltete. Mithilfe dieser Methode konnte ein Datensatz erhalten werden, der im Folgenden als „*Blank*-Datensatz“ bezeichnet wird. Wird die mithilfe dieses Datensatzes ermittelte Struktur betrachtet, so kann in *Interface*-Tasche 1 Differenzelektronendichte beobachtet werden, die auf ein DMSO-Molekül hindeutet, welches zwei verschiedene Orientierungen einnimmt (siehe **Abbildung 3.9-16**).

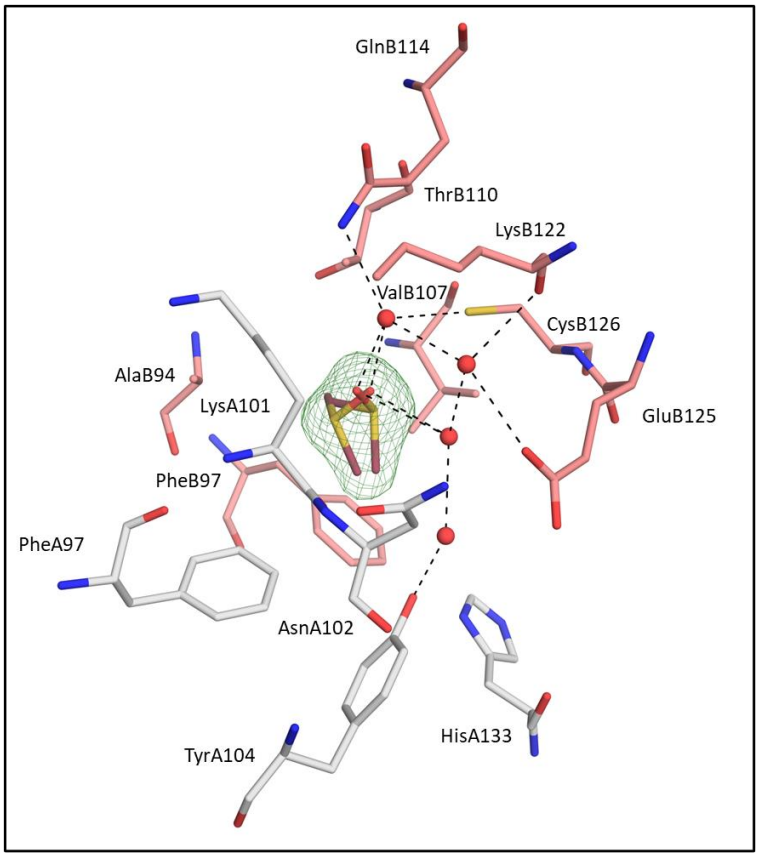


***Abbildung 3.9-16: Bindungsmodus und F_o-F_c-Differenzelektronendichte eines in* Interface-*Tasche 1 gebundenen DMSO-Moleküls (PDB-Code: 7pef)**. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa. Das DMSO-Molekül mit seinen zwei unterschiedlichen Orientierungen ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt, die entsprechenden C-Atome sind violett. N-Atome sind blau, O-Atome rot und S-Atome gelb. Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien gezeigt, ihre Abstände liegen zwischen 2.6 und 3.3 Å. Die F_o-F_c-Differenzelektronendichte des DMSO-Moleküls ist bei 2.5 σ als grünes Netz gezeigt.*

Wird diese Struktur mit den Strukturen überlagert, bei denen sich zusätzliche Elektronendichte an Position des jeweiligen Fragments befindet, so wird deutlich, dass diese zusätzliche Elektronendichte höchstwahrscheinlich von einem DMSO-Molekül herrührt (siehe **Abbildung 3.9-17**). Die Vermutung liegt nahe, dass diese zusätzliche, von einem DMSO-Molekül stammende Elektronendichte dazu geführt hat, dass die Besetzung der Fragmente tendenziell zu hoch verfeinert wurde. Bei den Fragmenten **J45** und **J66** war dies an der aufkommenden roten Differenzelektronendichte an Position des Halogenatoms zu erkennen. Daher wurde dort die Besetzung auf 85 % herabgesetzt. **J1** und **J6** sind (nahezu) vollständig besetzt. Die Tatsache, dass dennoch zusätzliche Elektronendichte vorhanden ist, hängt womöglich damit zusammen, dass der Schwefel des DMSO-Moleküls durch eine deutlich höhere Elektronenzahl auch mit einer sehr niedrigen Besetzung noch ausreichend Elektronendichte erzeugt. Ein anomales Signal konnte für dieses potentielle DMSO-Molekül allerdings nicht beobachtet werden.

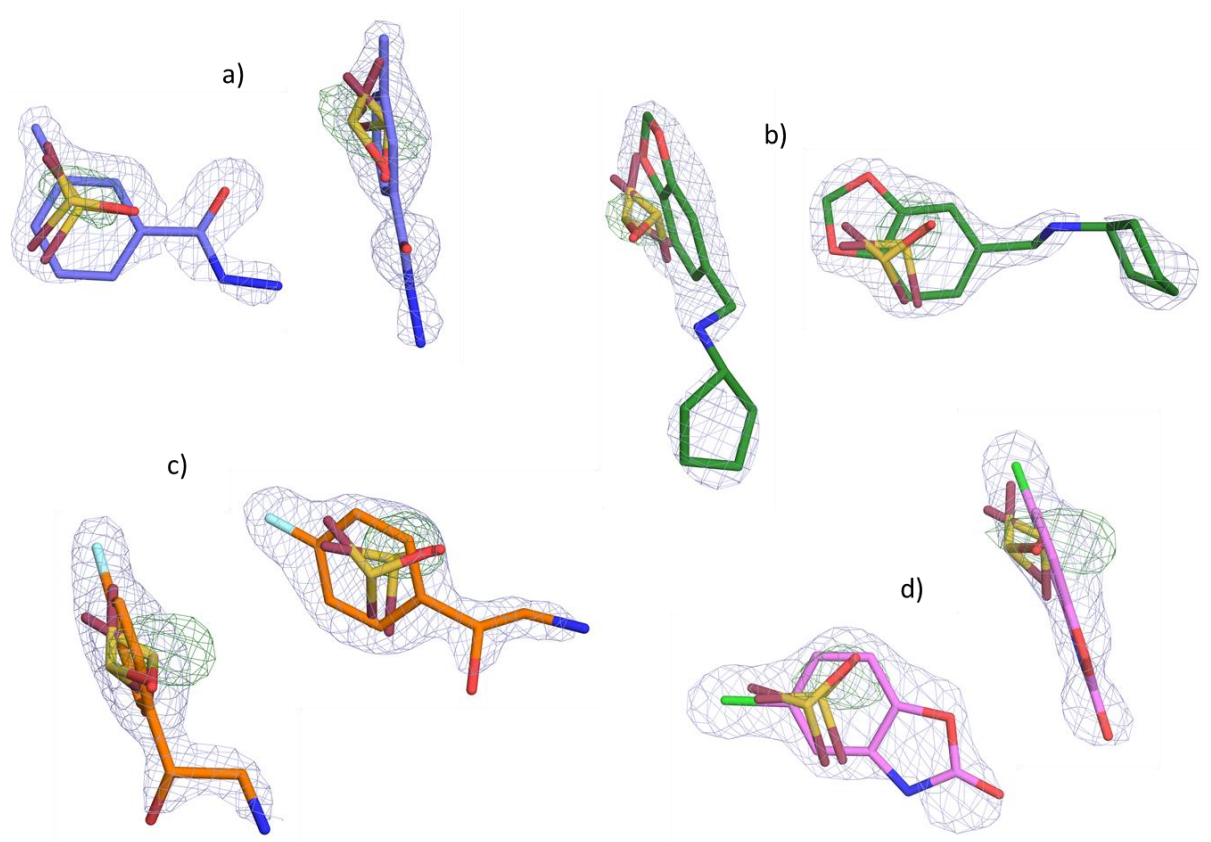


Abbildung 3.9-17: Zusätzliche Differenzelektronendichte einiger Fragment*-Hits *und Überlagerung mit dem in der* Blank-*Struktur vorhandenen DMSO-Molekül. *a)* ***J1*** *(C-Atome: lila), b)* ***J6*** *(C-Atome: grün), c)* ***J45*** *(C-Atome: orange), d)* ***J66*** *(C-Atome: pink). Die Fragmente und das DMSO-Molekül mit seinen zwei unterschiedlichen Orientierungen sind als Stäbchenmodelle aus je zwei verschiedenen Blickwinkeln dargestellt. Die C-Atome des DMSO-Moleküls sind violett. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb, Cl-Atome grün und F-Atome hellblau. Die* $2F_o$-F_c*-Elektronendichte und die* F_o-F_c*-Differenzelektronendichte des Fragments nach vollendeter Verfeinerung sind als hellblaues bzw. grünes Netz bei 1.0 bzw. 3.0 σ gezeigt.*

3.9.11. *Interface*-Tasche 2

Im Dimer-*Interface* von IpgC existiert eine weitere Tasche, in der ebenfalls ein Fragment-*Hit* gefunden wurde. Diese zweite Tasche wird im Folgenden als „*Interface*-Tasche 2“ bezeichnet. Sie wird durch die Rückseite der *α*-Helices 5-7 von Kette A und dem C-Terminus von *α*-Helix B5 bzw. der Schleife zwischen *α*-Helix 5 und 6 der Kette B ausgebildet. Auch diese Tasche setzt sich im hinteren Bereich aus unpolaren Aminosäuren zusammen. Wenn es sich hierbei nicht um ein asymmetrisches Dimer handeln würde, wäre diese Tasche vollkommen identisch zu *Interface*-Tasche 1. Dies ist jedoch aufgrund der Asymmetrie des Dimers nicht der Fall. Dennoch sind viele Aminosäuren, abgesehen von der zugehörigen Kette, identisch. **Abbildung 3.9-18** zeigt die Position von *Interface*-Tasche 2 im Dimer.

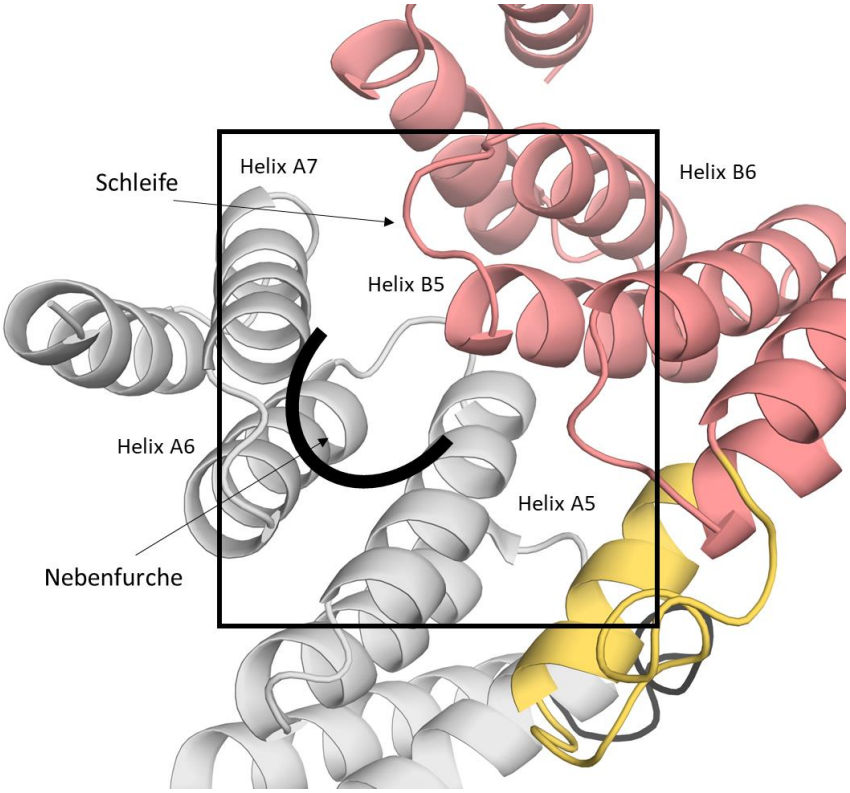


Abbildung 3.9-18: **Interface-*Tasche 2.*** Interface-*Tasche 2 befindet sich im* Interface *des Dimers und wird gebildet durch die Rückseite der* α*-Helices 5-7 von Kette A und der Schleife zwischen* α*-Helix 5 und 6 der Kette B. Das Protein ist als Bändermodell dargestellt. Kette A ist in Schwarz (Aminosäuren 24-32) bzw. in Grau (Aminosäuren 33-151) gezeigt, Kette B in Gold (Aminosäuren 9-32) bzw. in Rosa (Aminosäuren 33-151). Diese Abbildung wurde mithilfe der* Apo-*Struktur (PDB-Code: 6scb) erzeugt.*

3.9.12. Bindungsmodus von J11

J11 konnte als einziges Fragment in *Interface*-Tasche 2 gefunden werden. Die Besetzung dieses Fragments betrug nach vollendeter Verfeinerung 80 %. Mit seinem 3,4-Difluorphenyl-Ring bindet es im hinteren Bereich der Tasche und geht dort mit den vorhandenen unpolaren Aminosäuren hydrophobe Wechselwirkungen ein. Ein F-Atom liegt in H-Brückennähe zur Hydroxygruppe von ThrA110, jedoch dürfte dieses H-Atom vielmehr mit dem Rückgrat-Carbonyl-Sauerstoff von ProA106 eine H-Brücke eingehen und daher nicht zur Verfügung stehen. **J11** geht jedoch an anderen Stellen H-Brücken mit dem Protein ein. Eine H-Brücke besteht zwischen dem protonierten Stickstoff des heterocyclischen Sechsrings und der Carboxygruppe von AspA98. Eine weitere H-Brücke wird zwischen dem Stickstoff des heterocyclischen Fünfrings und einem H_2O-Molekül ausgebildet. Zudem besteht eine H-Brücke zwischen einem weiteren Stickstoff von **J11** und einem H_2O-Molekül, welches wiederum mit dem Carbamoyl-Stickstoff von GlnA114 interagiert. Durch die Wechselwirkung von **J11** mit dem Protein kommt es zwar nicht zu einer Konformationsänderung einer ganzen Proteinschleife, allerdings zur Fehlordnung der Seitenkette von LysB101. In der *Apo*-Struktur ist die Seitenkette von LysB101 an der Stelle zu finden, an welcher in der vorliegenden Struktur der 3,4-Difluorphenyl-Ring positioniert ist. In **Abbildung 3.9-19** sind der Bindungsmodus und die F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **J11** gezeigt.

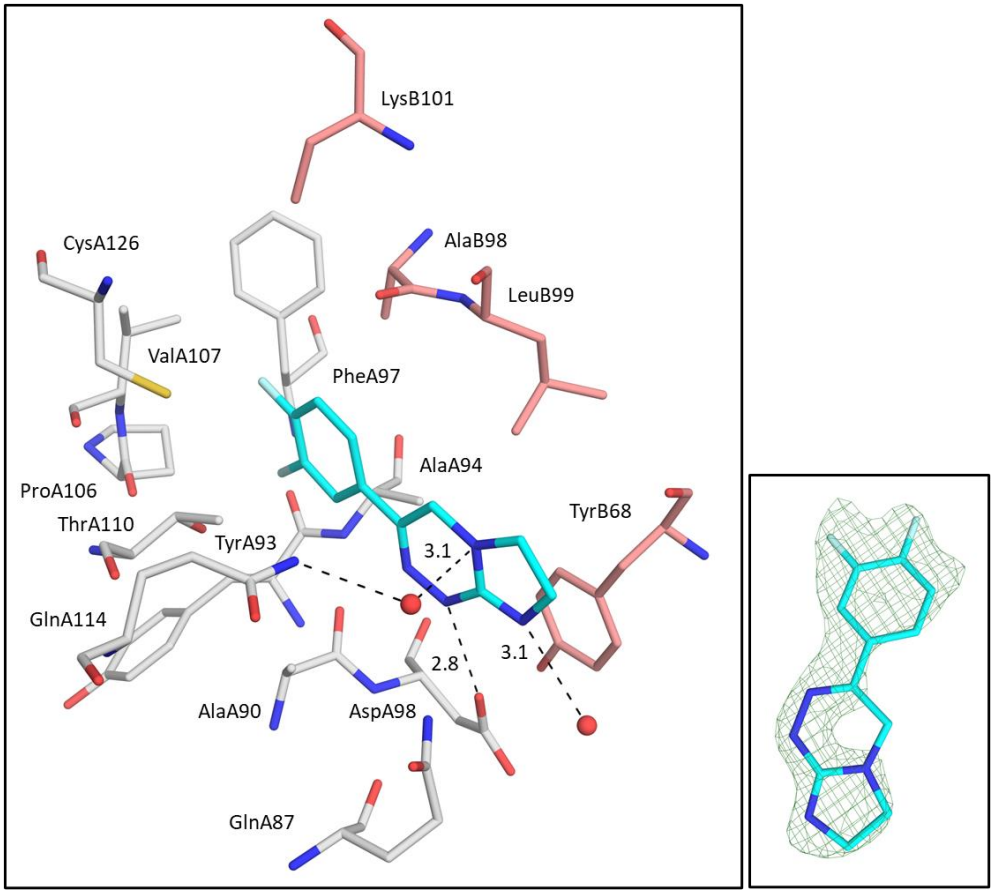


Abbildung 3.9-19: Bindungsmodus und F_o-F_c-Omit-Elektronendichte von J11 (PDB-Code: 7b1u). *Links: Bindungsmodus von **J11**. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle gezeigt. Dabei sind C-Atome von Kette A in Grau und C-Atome von Kette B in Rosa dargestellt. **J11** ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt. C-Atome von **J11** sind cyan. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb und F-Atome hellblau. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien angedeutet, ihre Abstände sind in Å angegeben. H_2O-Moleküle sind als rote Kugeln abgebildet. Rechts: Darstellung der F_o-F_c-Omit-Elektronendichte des Fragments bei 3.0 σ als grünes Netz.*

3.9.13. Bindungsmodus von J33

Fragment **J33** hat weder in *Interface*-Tasche 1 noch in *Interface*-Tasche 2 gebunden. Dieses Fragment konnte u.a. mit einer Besetzung von 100 % auf einer Symmetrieachse eingebaut werden, wie es bei **J36** ebenfalls beobachtet wurde. Dort ist es – genau wie **J36** – zwischen TyrA146 und TyrA‘146 eines Symmetrieäquivalents positioniert und ausschließlich durch π-π-Wechselwirkungen gebunden (siehe **Abbildung 3.9-20**). Nicht eingebaut werden konnten aufgrund fehlender Elektronendichte die beiden Stickstoffe der Amidingruppe. In **Abbildung 3.9-20** ist auch die Lage des Symmetrieäquivalents von **J33** dargestellt. Es ist an einem geringeren Stäbchenradius und der abweichenden Lage der Trifluormethyl-Gruppe zu erkennen.

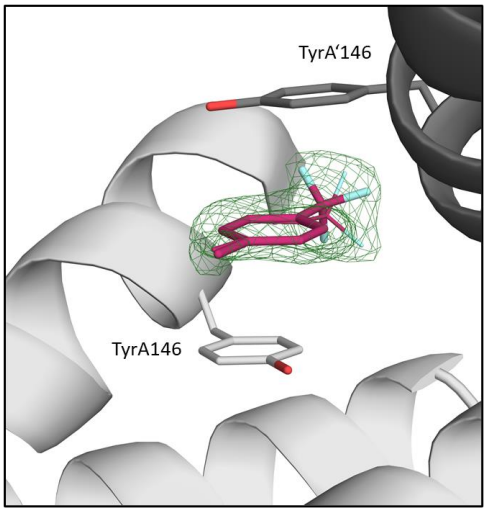


Abbildung 3.9-20: Bindungsmodus und* F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte von J33 (PDB-Code: 7azv). *Das Protein ist als Bändermodell gezeigt. Kette A ist in Grau dargestellt, Kette A des Symmetrieäquivalents in Dunkelgrau. Die Seitenketten von TyrA146 und TyrA‘146 sind als Stäbchenmodelle gezeigt.* ***J33*** *ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt, C-Atome von* ***J33*** *sind rot-violett. O-Atome sind rot und F-Atome hellblau. Die* F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte des Fragments ist als grünes Netz bei 3.0 σ gezeigt.*

Auch das zweite Molekül von **J33** (**J33-2**) ist an einer Stelle gebunden, an der es mit Symmetrieäquivalenten des Proteins in der Kristallpackung in Wechselwirkung tritt. Es befindet sich an einer Position, an der es – wenn auch z.T. indirekt über H_2O-Moleküle – mit vier unterschiedlichen Proteinketten interagiert. Die Besetzung von **J33-2** beträgt 75 %. Über seine Amidingruppe bildet **J33-2** gleich vier H-Brücken aus. Mit dem einen Stickstoff interagiert es mit der Carboxygruppe von Asp38 der Kette B eines Symmetrieäquivalents (AspB‘38) und zugleich mit dem Rückgrat-Sauerstoff von Ser10 der Kette A eines weiteren Symmetrieäquivalents (SerA‘‘10). Mit dem anderen Stickstoff geht es ebenfalls eine H-Brücke mit SerA‘‘10 ein, zusätzlich mit einem H_2O-Molekül, welches wiederum mit AspB‘45, SerB‘41, TyrB‘42 und SerA‘‘12 interagiert. Über seine Trifluormethyl-Gruppe interagiert **J33-2** nur indirekt mit dem Protein. Zwei der drei F-Atome bilden H-Brücken mit H_2O-Molekülen aus, die wiederum mit HisB133, HisA133 und AspB‘37 in Wechselwirkung treten (siehe **Abbildung 3.9-21**).

J33 und **J33-2** spielen für die weitere Entwicklung eines potenten Inhibitors keine Rolle, da ihre Bindungsposition alleine aufgrund der Kristallpackung zustande kommt.

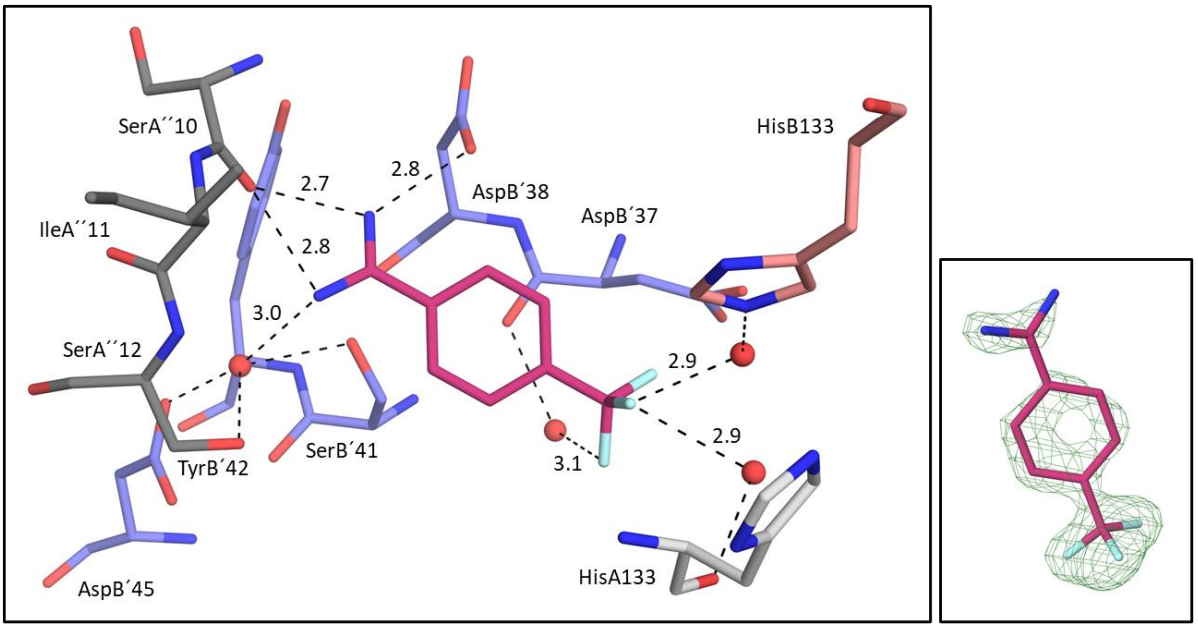


Abbildung 3.9-21: Bindungsmodus und **F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte von J33-2 (PDB-Code: 7azv).*** *Links: Bindungsmodus von **J33-2**. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle gezeigt. Dabei sind C-Atome von Kette A in Grau und C-Atome von Kette B in Rosa dargestellt. C-Atome von Kette A eines Symmetrieäquivalents sind dunkelgrau und die von Kette B eines weiteren Symmetrieäquivalents lila. **J33-2** ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt, die entsprechenden C-Atome sind rot-violett. N-Atome sind blau, O-Atome rot und F-Atome hellblau. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt, ihre Abstände sind in Å angegeben. Wassermoleküle sind als rote Kugeln abgebildet. Rechts: Darstellung der* F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte des Fragments bei 3.0 σ als grünes Netz.*

3.9.14. Protein-Ligand-Interaktionen

Die Interaktionen der einzelnen Fragmente mit dem Protein sollen ein wenig genauer betrachtet und miteinander verglichen werden. **J33** und **J36** werden dabei außen vorgelassen, da die entsprechenden Bindestellen für ein Wirkstoffdesign kaum relevant sein werden. Betrachtet werden die Fragmente, die in *Interface*-Tasche 1 und 2 gebunden haben. Mithilfe von *Contacsym*[126,127] wurden die Interaktionen zwischen Protein und Fragment ermittelt. Dies geschah einmal mit und einmal ohne Berücksichtigung der Wassermoleküle. Im Falle von **J52** wurde zuvor die geschlossene Konformation der Proteinschleife gelöscht, im Falle von **J1**, **J6**, **J45** und **J66** wurde nur die geschlossene Konformation der Schleife beibehalten, da diese theoretisch zeitgleich mit dem Fragment vorliegen kann. Die ausgegebenen H-Brücken wurden noch einmal visuell inspiziert und ihre Anzahl gegebenenfalls korrigiert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 3.9-2** gezeigt.

Beim Betrachten der Ergebnisse fällt auf, dass ohne die Berücksichtigung von H_2O-Molekülen im Schnitt eine direkte H-Brücke zwischen Fragment und Protein ausgebildet wird. Bei Beteiligung der H_2O-Moleküle sind es dagegen im Schnitt ein bis drei H-Brücken. Werden die VdW-Wechselwirkungen betrachtet, so können zwischen den Fragmenten deutliche Unterschiede festgestellt werden. Die Anzahl an VdW-Wechselwirkungen hängt natürlich in erster Linie von der Größe des Fragments ab. Daher ist in **Tabelle 3.9-2** zusätzlich die Anzahl an VdW-Wechselwirkungen pro Fragment-Atom angegeben. Pro Atom werden 2-3 VdW-Wechselwirkungen ausgebildet. Am meisten VdW-Wechselwirkungen geht **J66** mit 3.3 VdW-Wechselwirkungen pro Atom ein. **J52** und **J45** gehen mit 1.9 bzw. 2.1 VdW-Wechselwirkungen pro Atom (in Abwesenheit von H_2O-Molekülen) am wenigsten Interaktionen dieser Art ein.

Tabelle 3.9-2: Übersicht über die Wechselwirkungen zwischen Protein und Fragmenten.

Fragment	Anzahl an Interaktionen					
	VdW-Wechselwirkungen				H-Brücken	
	ohne H_2O		mit H_2O		ohne H_2O	mit H_2O
	pro Molekül	pro Atom	pro Molekül	pro Atom	pro Molekül	
J1	31	2.8	33	3.0	1	1
J2	30	3.0	33	3.3	1	3
J6	49	3.1	53	3.3	0	1
J11	49	2.9	56	3.3	1	3
J20	40	3.1	44	3.4	2	4
J45	23	2.1	31	2.8	1	3
J52	31	1.9	39	2.4	1	3
J66	36	3.3	36	3.3	1	1

3.9.15. Diskussion

Eingeschränkte Zugänglichkeit der Proteinoberfläche für Fragmente

Wie aus den zuvor beschriebenen Bindungsmodi der Fragment-*Hits* hervorgeht, binden die meisten Fragmente in *Interface*-Tasche 1 (**J1**, **J2**, **J6**, **J20**, **J45**, **J52**, **J66**). Ein weiteres Fragment kann in *Interface*-Tasche 2 beobachtet werden (**J11**). Daneben existieren noch zwei weitere Bindestellen, die jedoch allein aufgrund der Kristallpackung zustande kommen (**J33** und **J36** auf der Symmetrieachse zwischen TyrA146 und TyrA‘146, **J33-2** im Kontakt mit gleich mehreren Symmetrieäquivalenten). **J2** kann zusätzlich an einer Position auf der Oberfläche des Proteins identifiziert werden.

Woran könnte es liegen, dass keine weiteren Bindestellen beobachtet werden konnten?

Zum einen muss bedacht werden, dass es sich bei dem hier untersuchten *Target* um ein Chaperon handelt, welches im Gegensatz zu einem Enzym kein aktives Zentrum besitzt. Letzteres ist als Ziel für eine Wirkstoffentwicklung prädestiniert. IpgC tritt mit sehr vielen Proteinen auf unterschiedliche Art und Weise in Wechselwirkung. Daher gilt es hier Protein-Protein-Interaktionen zu stören. Dazu sollte die Proteinoberfläche mithilfe des kristallographischen Fragment-*Screenings* auf potenzielle Bindestellen hin untersucht werden. Abgesehen von den zwei im *Interface* des Dimers vorhandenen Taschen besitzt IpgC keine weiteren tiefen Taschen. Beim Betrachten der Kristallpackung fällt zudem auf, dass die Zugänglichkeit der Proteinoberfläche für Fragmente an vielen Stellen nur eingeschränkt möglich ist. In **Abbildung 3.9-22** ist in Rot die Oberfläche eines Dimers gezeigt und in Blau die Oberfläche aller Symmetrieäquivalente im Umkreis von 4 Å. Es wird deutlich, dass ein hoher Anteil der Oberfläche durch umliegende Symmetrieäquivalente blockiert wird. In **Abbildung 3.9-22** rechts ist das Dimer mit seinen Symmetrieäquivalenten als Bändermodell dargestellt, um die gute Zugänglichkeit von *Interface*-Tasche 1 zu verdeutlichen.

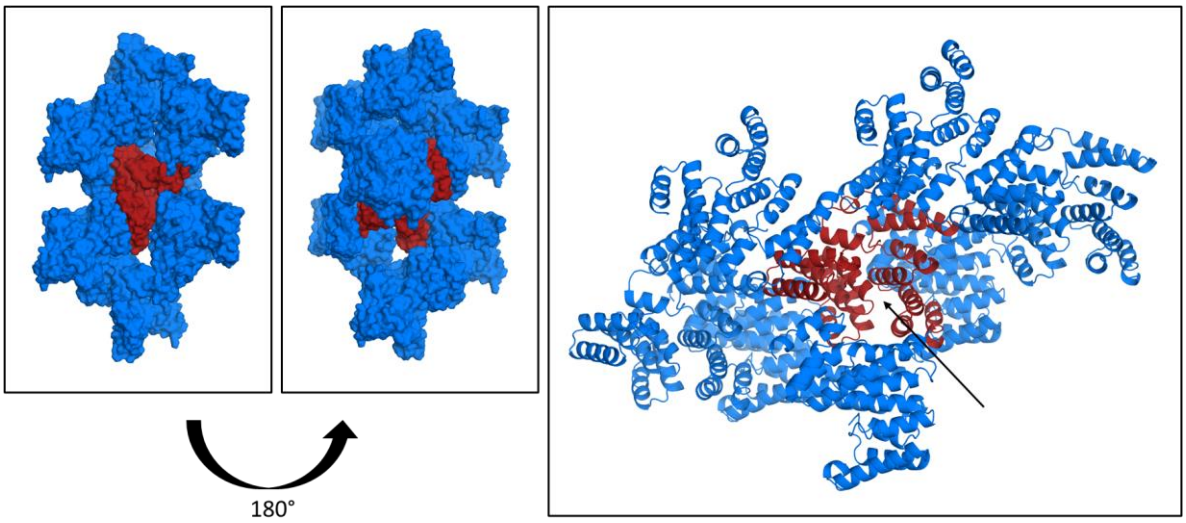


Abbildung 3.9-22: Darstellung der Oberflächenzugänglichkeit im Proteinkristallverbund. *Das Dimer der asymmetrischen Einheit ist in Rot dargestellt, seine Symmetrieäquivalente im Umkreis von 4 Å sind in Blau gezeigt. Links ist die Oberfläche der Proteinketten aus zwei Blickrichtungen dargestellt, rechts sind die Proteinketten als Bändermodelle gezeigt, um die Zugänglichkeit von* Interface-*Tasche 1 (mit einem Pfeil markiert) zu verdeutlichen. Für diese Abbildung wurde die* Apo-*Struktur (PDB-Code: 6scb) verwendet.*

An einem Beispiel soll gezeigt werden, dass manche Bereiche des Proteins durch Kontakt mit angrenzenden Symmetrieäquivalenten nicht anderweitig zugänglich sind. Dafür muss zunächst kurz die Interaktion von IpgC mit dem Protein IpaB erläutert werden.

Bislang ist nur die Bindestelle eines Bindungsepitops von IpaB bekannt, welches zusammen mit IpgC kokristallisiert wurde. Dieses Peptid bindet an der konkaven Seite der von IpgC ausgebildeten Superhelix und tritt dort mit den α-Helices 2-4 der Ketten A bzw. B in Wechselwirkung. Überwiegend handelt es sich um H-Brücken, die über Rückgrat-Carbonyl-Sauerstoffe bzw. Rückgrat-Stickstoffe des Peptids ausgebildet werden. Daneben gibt es jedoch auch z.B. eine Leu-Seitenkette, die in einer kleinen hydrophoben Tasche des Proteins bindet und dort hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Protein eingeht. Diese hydrophobe Tasche entsteht durch eine Konformationsänderung der Seitenkette von Tyr44.

In manchen der in diesem Kapitel beschriebenen Fragment-Komplexstrukturen konnte an eben dieser Stelle von Kette A ein DMSO-Molekül eingebaut werden. **Abbildung 3.9-23 a** zeigt eines der an dieser Position vorhandenen DMSO-Moleküle in einer der ermittelten Protein-Fragment-Strukturen (PDB-Code: 7nrg). Der RMSD-Wert (engl. *root-mean-square deviation*) aller an dieser Position vorhandenen DMSO-Moleküle beträgt 0.51 Å (berechnet mit ProFit[131]). Die Abbildung verdeutlicht jedoch auch die räumliche Nähe eines benachbarten Symmetrieäquivalents. Die Seitenkette von LysB‘138 zeigt unmittelbar in Richtung des DMSO-Moleküls. Dies macht hier eine theoretische Interaktion mit dem Bindungsepitop von IpaB

undenkbar, da das Symmetrieäquivalent die Bindestelle teilweise blockiert. Die Seitenkette von LysB‘138 ist sogar für die Ausbildung einer H-Brücke mit dem Sauerstoff des DMSO-Moleküls verantwortlich. Hier stellt sich die Frage, ob das DMSO-Molekül auch ohne diese Wechselwirkung binden würde. Die Antwort lautet: Ja. In anderen Strukturen konnte an dieser Position ebenfalls ein DMSO-Molekül eingebaut werden, obwohl die Seitenkette von LysB‘138 fehlgeordnet ist. Das liegt wahrscheinlich daran, dass das DMSO-Molekül noch eine weitere H-Brücke mit einem H_2O-Molekül eingeht, welches wiederum mit TyrA40 wechselwirkt. Das DMSO-Molekül ist dabei so positioniert, dass eine Methylgruppe in die hydrophobe Tasche unterhalb der TyrA44-Seitenkette ragt.

Da dieser Proteinbereich interessant wird, sobald es darum geht, die Interaktion mit IpaB zu stören, könnten DMSO-ähnliche Moleküle getestet werden, beispielsweise Moleküle, die anstelle eines Methylrests einen größeren hydrophoben Rest besitzen und so die hydrophobe Tasche deutlich besser ausfüllen. Für solche Interaktionsstudien würde es sich jedoch anbieten, Lys138 zu mutieren, um auszuschließen, dass Moleküle nur aufgrund der Wechselwirkung mit LysB‘138 binden und um den Bereich für weitere Interaktionen zu vergrößern. Hier würde sich die Variante Lys138Ala anbieten, in der die Aminosäure Lys138 durch Alanin ersetzt ist.

Wird die andere Kette des Dimers an äquivalenter Stelle betrachtet, so wird dort eine abweichende Situation vorgefunden. Während in den meisten Fällen TyrA44 in der Lage ist, seine Konformation zu ändern (dies zeigt sich durch die häufig fehlgeordnete Seitenkette), ist TyrB44 meist nicht in der Lage, die Position seiner Seitenkette zu verändern. Dies liegt darin begründet, dass sich unmittelbar oberhalb dieser Seitenkette der N-Terminus von α-Helix 8 eines Symmetrieäquivalents befindet und durch die Lage von GluA‘137 eine Konformationsänderung unmöglich wird (siehe **Abbildung 3.9-23 b**). Hier würde eine Mutation dieser Aminosäure nicht zum Ziel führen, da die gesamte α-Helix des Symmetrieäquivalents sehr nahe am Proteinmolekül der asymmetrischen Einheit liegt. Für Interaktionsstudien würde es allerdings ausreichen, wenn das zu untersuchende Molekül an Kette A binden könnte, d.h. einmal pro IpgC-Dimer.

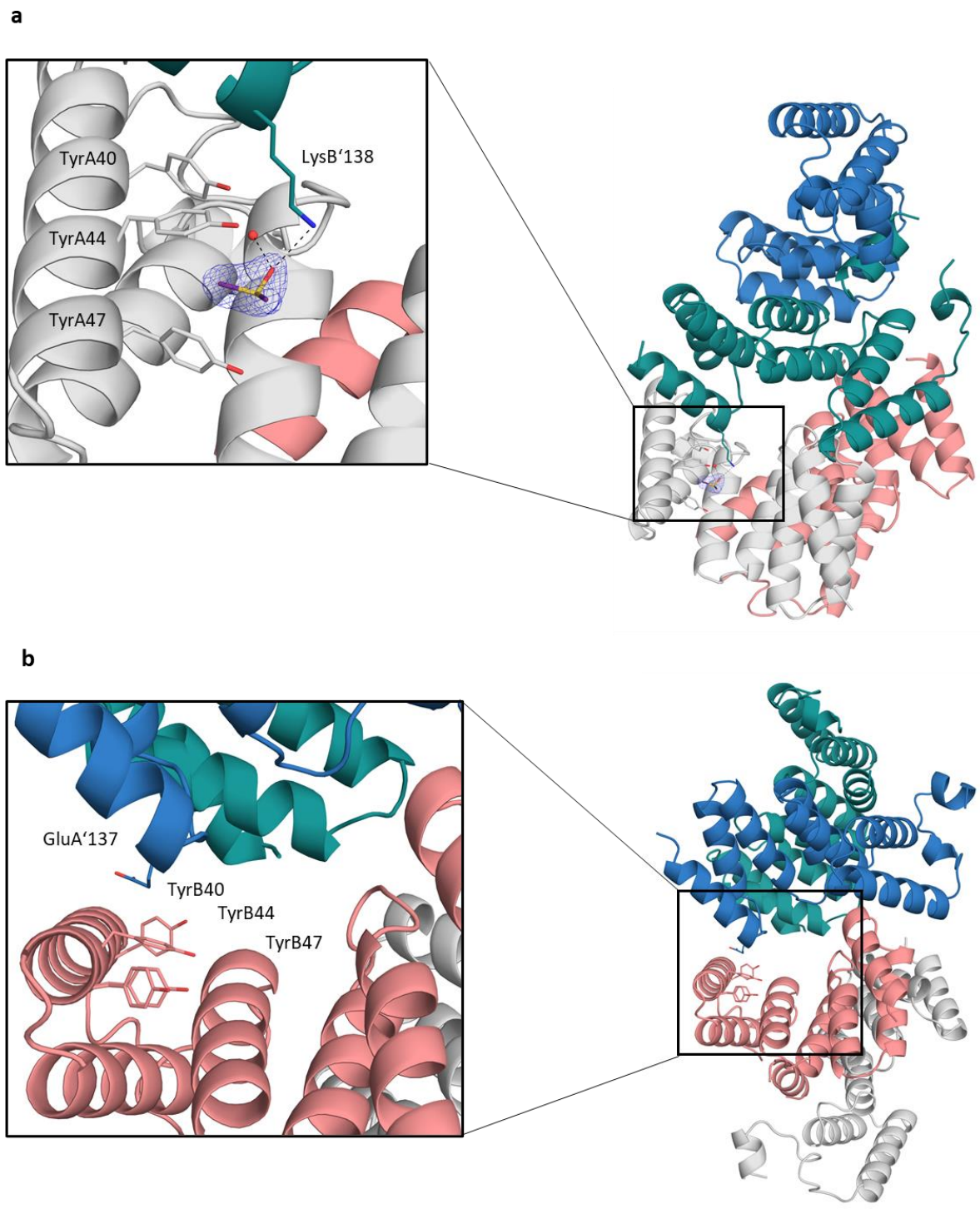


Abbildung 3.9-23: Eingeschränkte Zugänglichkeit der IpaB-Bindestelle durch ein angrenzendes Symmetrieäquivalent (PDB-Code: 7nrg). a*: DMSO-Molekül in der hydrophoben Tasche unterhalb der Seitenkette von TyrA44.* ***b****: GluA‘137 verhindert eine Konformationsänderung von TyrB44. Das Protein ist als Bändermodell dargestellt. Kette A ist in Grau gezeigt, Kette B in Rosa. Kette A des Symmetrieäquivalents ist in Blau dargestellt, Kette B des Symmetrieäquivalents in Dunkelgrün. Einzelne Aminosäuren und das DMSO-Molekül sind zudem als Stäbchenmodelle gezeigt. Dabei sind C-Atome in der entsprechenden Farbe der Kette dargestellt, O-Atome in Rot, N-Atome in Blau, S-Atome in Gelb und die C-Atome des DMSO-Moleküls in Violett. Das H_2O-Molekül ist als rote Kugel dargestellt, H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien angedeutet. Die $2F_o$-F_c-Elektronendichte ist als blaues Netz bei 1.0 σ gezeigt.*

Für Interaktionsstudien an solch ungünstig gelegenen Stellen am Protein – durch Kristallpackung gar nicht oder nur eingeschränkt zugänglich – wäre natürlich eine zweite Kristallisationsbedingung von Vorteil, die zu Kristallen mit einer anderen Packung führt. Jedoch ist die Suche nach einer geeigneten Kristallisationsbedingung häufig ein langer Weg und könnte sich äußerst aufwändig gestalten. Hier stellt sich die Frage, ob nicht die NMR Abhilfe schaffen könnte, mit deren Hilfe Protein-Ligand-Interaktionsstudien in Lösung durchgeführt werden und solche Packungsartefakte keine Rolle spielen. IpgC wäre mit seiner geringen Größe auch bestens geeignet für NMR-Experimente solcher Art. Studien haben bereits gezeigt, dass verschiedene Methoden eher selten die gleichen Fragment-*Hits* hervorbringen.[70] Es wäre interessant zu wissen, welche Fragmente im Falle von IpgC mittels NMR als *Hit* identifiziert werden würden und wie viele *Hits* sich darunter befinden würden, die bereits mittels Röntgenkristallographie identifiziert wurden.

Erzielte *Hit*-Rate

Mithilfe des Fragment-*Screenings* konnte in der vorliegenden Arbeit eine *Hit*-Rate von etwa zehn Prozent (10.4 %) erzielt werden. Um diese Prozentzahl in Relation setzen zu können, soll die hier ermittelte *Hit*-Rate mit den *Hit*-Raten verglichen werden, die zuvor innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe unter Verwendung derselben Fragment-Bibliothek ermittelt wurden. Wie MAGARI in ihrer Dissertation beschreibt, liegt die durchschnittliche *Hit*-Rate für die in der vorliegenden Arbeit verwendete 96er Fragment-Bibliothek bislang bei 8.6 %.[74] Damit liegt die hier erzielte *Hit*-Rate 1.8 % über dem Durchschnitt. Wird die hier ermittelte *Hit*-Rate in die Ermittlung der durchschnittlichen *Hit*-Rate mit einbezogen, so kann diese um etwa 0.5 % auf 9.1 % angehoben werden. Mit IpgC konnte eine höhere *Hit*-Rate erzielt werden als zuvor für Thrombin, CA II, Thermolysin, TGT, Trypsin, FPPS und HSD-14. Nur im Falle der PKA konnte mit 31.3 % eine deutlich höhere *Hit*-Rate erzielt werden.[74] Bei Betrachtung der *Hit*-Raten wird EP als *Target* nicht berücksichtigt, da die Fragment-Bibliothek überwiegend anhand der dort erzielten Fragment-*Hits* entworfen wurde. Üblicherweise liegen die *Hit*-Raten bei kristallographischen Fragment-*Screenings* zwischen 0.5 und 10 %.[68] Insgesamt lässt sich also feststellen, dass die hier erzielte *Hit*-Rate von 10.4 % sehr hoch ist und damit genügend Ergebnisse für eine weitere Wirkstoffentwicklung vorliegen sollten.

Ermittelte Fragment-*Hits* im Komplex mit anderen Proteinen

Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Fragment-*Hit* **J2** konnte bereits bei PKA, Thrombin, Trypsin und EP als Fragment-*Hit* identifiziert werden und gehört damit zu den Fragmenten, die bislang am häufigsten gebunden haben. Wird der in dieser Arbeit ermittelte Bindungsmodus mit den Bindungsmodi verglichen, die in den anderen *Targets* beobachtet werden können, so kann festgestellt werden, dass **J2** in *Interface*-Tasche 1 am wenigsten direkte polare Interaktionen (1) mit dem Protein eingeht (siehe **Tabelle 3.9-3**). Die Tatsache, dass **J2** mit den anderen *Targets* deutlich mehr direkte hydrophile Interaktionen (2-5) eingeht, liegt daran, dass **J2** dort meist im aktiven Zentrum gebunden hat und die aktiven Zentren im Gegensatz zu *Interface*-Tasche 1 deutlich mehr hydrophile Aminosäuren enthalten. Bei IpgC beruht die Interaktion mit **J2** dagegen überwiegend auf hydrophoben Wechselwirkungen. Ähnlich sieht es bei den Fragmenten **J1**, **J6**, **J11**, **J20** und **J45** aus. Auch hier ist die durchschnittliche Anzahl an polaren Interaktionen bei anderen Proteinen größer (vgl. **Tabelle 3.9-2**).

Abgesehen von **J66** lagen bereits alle in dieser Arbeit ermittelten Fragment-*Hits* in mindestens einem weiteren Protein gebunden vor. **J66** wurde hier tatsächlich das erste Mal innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe als *Hit* identifiziert. Es gehört zu den Fragmenten der 96er Fragment-Bibliothek, die keinen EP-*Hit* darstellen, sondern ausgewählt wurden, weil sie bereits in anderen Komplexstrukturen, die in der PDB deponiert sind, beobachtet werden konnten. Daher wurde die PDB nach Komplexstrukturen mit **J66** („Chlorzoxazon“) abgesucht. Es konnten drei Komplexstrukturen gefunden werden. Eine dieser Komplexstrukturen stammt von der zweiten Arbeitsgruppe (AG WEISS), die an der Entwicklung der 96er Fragment-Bibliothek beteiligt war (PDB-Code: 5row[132]). Dort bindet **J66** an Proteinase K (eine Serinprotease), geht dort allerdings nur hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Protein ein. In einer weiteren PDB-Struktur befindet sich Chlorzoxazon im Komplex mit SARS-CoV-2 NSP3 (SARS: *severe acute respiratory syndrome*, CoV: Coronavirus, NSP3: *non-structural protein 3*), dem größten Protein, welches vom Genom des Coronavirus kodiert wird (PDB-Code: 5rvi). Dort geht das Fragment mit dem Protein interessanterweise keine direkten polaren, jedoch fünf wasservermittelte Interaktionen ein (nicht gezeigt). Die dritte Struktur beinhaltet Chlorzoxazon im Komplex mit der Stickstoffmonoxid-Synthase (PDB-Code: 1m8d[133]). Dort geht die Verbindung zwei polare Interaktionen mit dem Protein ein und befindet sich in unmittelbarer Nähe zum gebundenen Kofaktor Häm.

***Tabelle 3.9-3: Vergleich der Anzahl an direkten und indirekten polaren Interaktionen der hier ermittelten Fragment*-Hits *mit den in der eigenen Arbeitsgruppe verwendeten* Targets.** *Die hier aufgelisteten polaren Interaktionen wurden mithilfe von* PyMOL *ermittelt. Der maximale Abstand für polare Interaktionen betrug dabei 3.5 Å.*

Fragment	*Target*	Polare Interaktionen direkte + indirekte	PDB-Code
J1	CA II	3 + 1	6rm1
	EP	5 + 0	4y36
	IpgC	1 + 0	7nl8
J2	PKA	3 + 0	5n36
	Thrombin	2 + 2	nicht deponiert
	Trypsin	3 + 2	nicht deponiert
	EP	5 + 0	4y3e
	IpgC	1 + 2	7ayw
J6	HSD-14	2 + 0	6gtu
	PKA	1 + 2	5n37
	EP	1 + 2	4y3d
	IpgC	0 + 1	7o6s
J11	CA II	kovalent verknüpft	6s9z
	EP	2 + 2	4y53
	IpgC	1 + 1	7b1u
J20	PKA	3 + 1	5n7p
	EP	5 + 0	4y4t
	IpgC	2 + 2	7axy
J33	PKA	1 + 0	5n3d
	EP	5 + 1	4yct
	IpgC	-	7azv
J36	EP	4 + 1	4yd5
	IpgC	-	7o04
J45	PKA	3 + 1	5n1k
	EP	5 + 1	4y5k
	IpgC	1 + 2	*7nrg*
J52	EP	2 + 2	4y5p
	IpgC	2 + 2	7pe0
J66	IpgC	2 + 0	7nhw

Insgesamt macht **Tabelle 3.9-3** deutlich, dass die Fragment-*Hits* abgesehen von **J52** und **J66** im Vergleich weniger polare Interaktionen mit IpgC eingehen als mit anderen Proteinen. Wie für **J2** bereits angedeutet, liegt das wahrscheinlich an der Tatsache, dass die Bindetaschen der anderen Proteine deutlich hydrophiler sind. **J6** geht mit allen Proteinen recht wenige polare Interaktionen ein. Dies liegt aber auch an der chemischen Struktur des Fragments, da es insgesamt selbst sehr hydrophob ist und abgesehen von Kohlenstoffen nur zwei Ether-Sauerstoffe und einen sekundären Amin-Stickstoff zur Ausbildung von hydrophilen Interaktionen besitzt.

Sind die Bindestellen im *Interface* für ein Wirkstoffdesign von Bedeutung?

Es ist bekannt, dass IpgC in Lösung als Dimer vorliegt.[37,113,134,135] Weiterhin ist bekannt, dass IpgC zumindest mit manchen Proteinen als Monomer interagiert.[40] Daher könnte zunächst vermutet werden, dass eine Bindestelle im *Interface* des Protein-Dimers nicht unbedingt hilfreich ist, wenn es darum geht, die Interaktion von IpgC mit einem seiner Interaktionspartner zu inhibieren. IpgC interagiert jedoch mit so vielen unterschiedlichen Proteinen, dass höchstwahrscheinlich ein Großteil der Proteinoberfläche an der Interaktion mit Proteinen beteiligt sein wird. Es ist zudem denkbar, dass IpgC mit manchen Proteinen als Dimer interagiert. Dies wird beispielsweise für die Interaktion des IpgC-orthologen Proteins SicA mit dem MxiE-orthologen Protein InvF vermutet.[136] Es wäre also sowohl eine Stabilisierung des Dimers durch Liganden denkbar, um die im *Interface* vorhandene Proteinoberfläche für Interaktionen mit anderen Proteinen zu blockieren, als auch eine Destabilisierung, um mögliche Interaktionen ausgehend vom Dimer mit anderen Proteinen zu inhibieren. Zudem könnte auch eine Destabilisierung des Dimers dazu führen, dass die Funktion von IpgC im Pathogen eingeschränkt ist. Es ist beispielsweise bekannt, dass die am N-Terminus um 21 Aminosäuren verkürzte IpgC-Variante hochmolekulare Aggregate bildet, wahrscheinlich, weil eine Dimerisierung in diesem Fall nicht mehr möglich ist.[37]

Momentan werden die im *Interface* befindlichen Bindetaschen als vielversprechende Basis zur Entwicklung affiner Wirkstoffkandidaten angesehen. Spätestens, wenn mithilfe von *in silico-Docking* eine Vergrößerung der Liganden erzielt und eine Erhöhung der Affinität erreicht worden ist, sollte in zellbasierten Assays geprüft werden, ob durch IpgC-Liganden, die im *Interface* binden, die Sekretion von *Shigella*-Effektoren beeinträchtigt werden kann.

3.10. Fragment-*Screening* mithilfe eines *Thermal-Shift-Assays*

3.10.1. Ergebnisse

Mithilfe des *Thermal-Shift-Assays* sollten die durch das kristallographische Fragment-*Screening* identifizierten *Hits* bestätigt werden, da TSA gelegentlich ebenfalls als *Screening*-Methode zur *Hit*-Identifizierung herangezogen wird.[55] Hierbei wurden die gleichen 96 Fragmente verwendet, die auch beim kristallographischen Fragment-*Screening* zur Anwendung kamen. Auch die in der Kristallographie verwendete Proteinvariante IpgC-9,-4S wurde hier eingesetzt. Zu Beginn wurde der Schmelzpunkt von IpgC-9,-4S ohne die Zugabe eines Fragments bestimmt. Der ermittelte Schmelzpunkt liegt bei 50.7 ± 0.2 °C (siehe **Abbildung 3.10-1**). Die dreifache Standardabweichung beträgt demnach 0.6 °C. Alle Fragmente, die den Schmelzpunkt des Proteins um mehr als die dreifache Standardabweichung änderten, wurden als stabilisierend bzw. destabilisierend eingeordnet. Interessanterweise war unter den 96 Fragmenten kein einziges Fragment, welches einen stabilisierenden Effekt auf das Protein ausübte. Es konnten lediglich 26 Fragmente identifiziert werden, die einen destabilisierenden Effekt zeigten, da sie den Schmelzpunkt um mehr als 0.6 °C absenkten. Darunter befanden sich neun Fragmente, die eine Veränderung kleiner als 1 °C bewirkten, acht Fragmente senkten den Schmelzpunkt um mehr als 2 °C, drei Fragmente um mehr als 3 °C (siehe **Abbildung 3.10-2**).

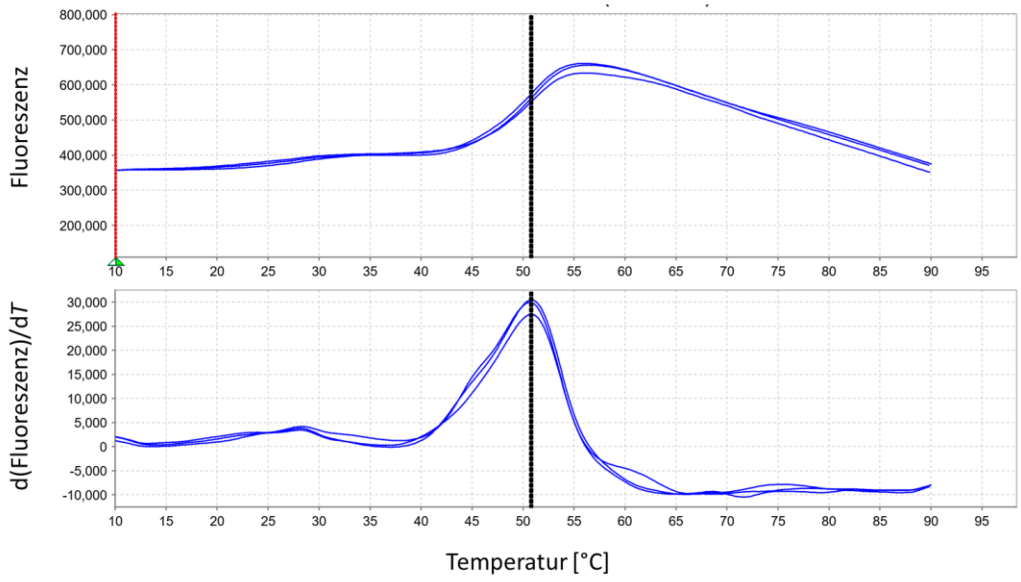


***Abbildung 3.10-1*: Schmelzkurve von IpgC-9,-4S.** *Oben ist die Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen mit dem Schmelzpunkt des Proteins als Wendepunkt der Kurve. Die Messung wurde bei 10 °C begonnen und in 0.05 °C/s auf 90 °C erhöht. Unten ist die erste Ableitung der Schmelzkurve mit dem Schmelzpunkt des Proteins als Maximum der Kurve dargestellt. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Der so ermittelte Schmelzpunkt des Proteins liegt bei 50.7 ± 0.2 °C.*

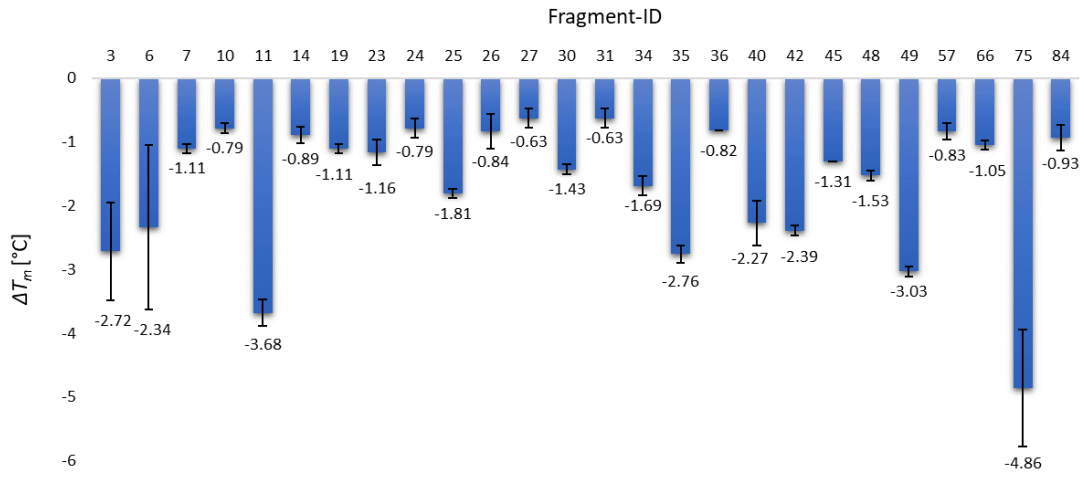


Abbildung 3.10-2: Signifikante Schmelzpunkterniedrigung durch 26 Fragmente. *Auf der Abszisse sind die 26 auf das Protein destabilisierend wirkenden Fragmente aufgetragen (angeordnet nach steigender JENA-ID), auf der Ordinate die ermittelte Abweichung des Schmelzpunktes in °C. IpgC-9,-4S besitzt ohne die Zugabe eines Fragments einen Schmelzpunkt von 50.7 ± 0.2 °C.*

3.10.2. Diskussion

Kristallographische Fragment-*Hits* zeigen z.T. einen destabilisierenden Effekt

Die Fragmente, die im TSA eine Schmelzpunkterniedrigung bewirkten, werden im Folgenden genauer betrachtet. Es fällt auf, dass sich darunter fünf Fragmente befinden, die mittels Röntgenkristallographie als *Hit* identifiziert wurden. Dabei handelt es sich um die Fragmente **J6**, **J11**, **J36**, **J45** und **J66**. Wie erwähnt führten vier dieser Fragmente (**J6**, **J36**, **J45** und **J66**) zu einer Konformationsänderung der Schleife, die Teil von *Interface*-Tasche 1 ist, in der diese Fragmente gebunden haben. Es macht den Anschein, als wirke sich diese Konformationsänderung destabilisierend auf das Protein aus. Das erscheint plausibel, denn durch diese Konformationsänderung fällt eine der vier im *Interface* von Dimer-1 ausgebildeten H-Brücken weg. Es handelt sich dabei um die H-Brücke (gleichzeitig auch Salzbrücke) zwischen LysA101 und AspB91.

An dieser Stelle müssen der Vollständigkeit halber die zwei Fragmente genannt werden, die ebenfalls eine Konformationsänderung der Schleife bewirkten, jedoch keinen destabilisierenden Effekt im TSA-Experiment zeigten. Die Fragmente **J1** und **J52** führten ebenfalls zu einer von der *Apo*-Struktur abweichenden *Loop*-Konformation. Allerdings ist im Falle von **J52** immer noch die Ausbildung der H-Brücke zwischen LysA101 und AspB91 möglich, da hier nur AsnA102 eine veränderte Konformation aufweist, LysA101 jedoch in der ursprünglichen Konformation vorliegt. Bleibt noch zu klären, warum **J1** im TSA-Experiment keinen destabilisierenden Effekt bewirkt. Wird die Stelle, an der sich in der *Apo*-Struktur die ε-Aminogruppe

von LysA101 befindet, noch einmal genauer betrachtet, so kann an dieser Position Differenzelektronendichte beobachtet werden, die der Seitenkette von LysA101 zugeordnet werden kann (siehe **Abbildung 3.10-3**). Aufgrund der Tatsache, dass jedoch keine Differenzelektronendichte für das C_γ-Atom vorhanden war, wurde diese Seitenkette nicht eingebaut. In den anderen Strukturen ist ebenfalls Differenzelektronendichte an dieser Position zu erkennen, allerdings ist dort die Elektronendichte kugelförmig und deutet daher eher auf ein H_2O-Molekül hin. Im Falle von **J1** wird es somit zumindest teilweise zur Ausbildung der im Fokus stehenden H-Brücke kommen. Das könnte der Grund dafür sein, warum **J1** keinen destabilisierenden Effekt im TSA-Experiment zeigte.

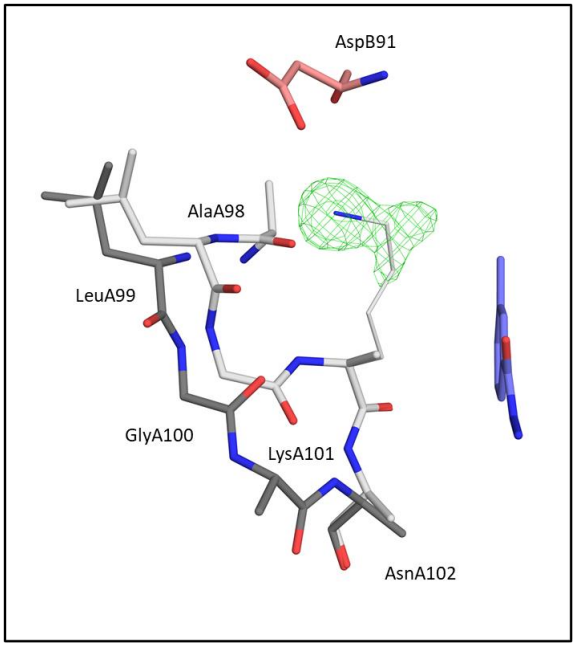


Abbildung 3.10-3: Zusätzliche F_o-F_c-Differenzelektronendichte für die Seitenkette von LysA101 der Konformation B (PDB-Code: 7nl8). *Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome der Kette A sind hellgrau (Konformation B) bzw. dunkelgrau (Konformation A), C-Atome der Kette B rosa.* ***J1*** *ist ebenfalls als Stäbchenmodell dargestellt. C-Atome von* ***J1*** *sind lila. O-Atome sind rot und N-Atome blau. Die mögliche Lage der Seitenkette von LysA101 der Konformation B ist mit einem kleineren Stäbchenradius angedeutet. Die F_o-F_c-Differenzelektronendichte ist als grünes Netz bei 3.0 σ gezeigt.*

J11 war das einzige Fragment, welches in *Interface*-Tasche 2 gebunden hat. Wird die Struktur von **J11** im Hinblick auf eine mögliche Destabilisierung noch einmal genauer betrachtet, so fällt auf, dass zwischen GluA125 und AsnB102 aufgrund einer Fehlordnung von GluA125 keine H-Brücke ausgebildet werden kann (siehe **Abbildung 3.10-4**). Diese Interaktion stellt ebenfalls eine der vier im *Interface* von Dimer-1 ausgebildeten H-Brücken dar. Die Fehlordnung von GluA125 hängt wahrscheinlich mit der Fehlordnung der Seitenkette von LysB101 zusammen, welche aufgrund des gebundenen Fragments seine ursprüngliche Konformation nicht einnehmen kann.

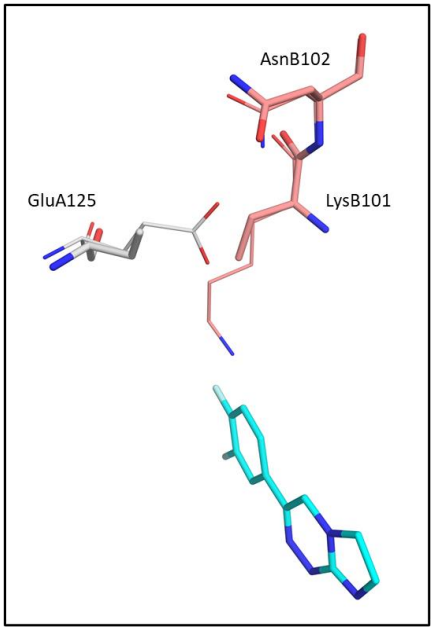


Abbildung 3.10-4: Fehlordnung der Seitenketten von LysB101 und GluA125 (PDB-Code: 7b1u). *Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome der Kette A sind in Grau dargestellt, C-Atome der Kette B in Rosa.* ***J11*** *ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt, die entsprechenden C-Atome sind cyan. O-Atome sind rot, N-Atome blau und F-Atome hellblau. Die Aminosäuren der* Apo*-Struktur sind überlagert dargestellt, diese weisen einen geringeren Stäbchenradius auf. Die Seitenketten von GluA125 und LysB101 sind in der* Apo*-Struktur vollständig eingebaut.*

Weitere Fragmente führten zu einer Destabilisierung des Proteins

Es sollen die Fragmente genauer betrachtet werden, die im TSA-Experiment einen sehr großen destabilisierenden Effekt zeigten, aber nicht als *Hit* beim kristallographischen Fragment-*Screening* identifiziert wurden. Die Fragmente **J35**, **J49** und **J75** bewirkten mit -2.76 °C, -3.03 °C und -4.86 °C die größten Schmelzpunkterniedrigungen (siehe **Abbildung 3.10-2**). Die Strukturformeln dieser Fragmente sind in **Abbildung 3.10-5** gezeigt.

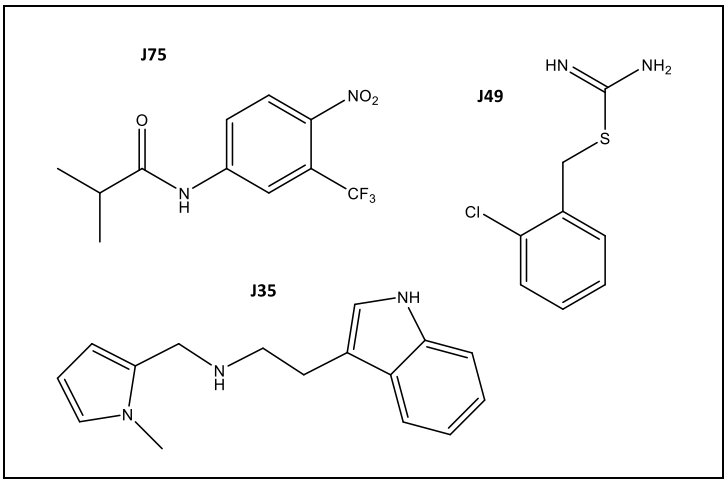


Abbildung 3.10-5: Strukturformeln der Fragmente J35, J49 und J75. *Diese Fragmente verursachten die deutlichste Schmelzpunktabsenkung in TSA-Experimenten.*

Wie könnte der starke Einfluss dieser Fragmente auf die Stabilität des Proteins begründet werden? Eine Hypothese, die aufgestellt werden kann, ist, dass diese Fragmente womöglich ebenfalls in *Interface*-Tasche 1 binden, dabei aber die Schleife derart nach außen drücken, dass das Dimer stärker destabilisiert wird, als es bei manchen kristallographischen Fragment-*Hits* bereits der Fall ist. Es könnte sein, dass **J35** mit seinem Indol-Ring im hydrophoben Bereich von *Interface*-Tasche 1 bindet, **J49** könnte seinen 2-Chlorphenyl-Ring dort positioniert haben und **J75** seinen 4-Nitro-3-(trifluormethyl)phenyl-Ring. **J75** verursacht mit -4.86 °C die mit Abstand größte Schmelzpunkterniedrigung. Gerade hier könnte es sein, dass die Schleife am weitesten nach außen gedrückt wird, weil die voluminöse Trifluormethyl-Gruppe sehr viel Platz benötigt. Es ist bereits bekannt, dass in *Interface*-Tasche 1 bevorzugt Halogen-substituierte Ringsysteme binden. Dies könnte auf **J49** ebenfalls zutreffen. Auch die Bindung einer Nitrogruppe innerhalb von *Interface*-Tasche 1 ist durchaus denkbar, wie für **J36** bereits in **Kapitel 3.9.9** diskutiert wurde. Der Indol-Ring von **J35** erinnert an **J2**, welches mit seinem Isoindol-Ring ebenfalls in *Interface*-Tasche 1 gefunden werden konnte.

Dass diese drei Fragmente nicht in der Elektronendichte der jeweiligen Struktur zu erkennen sind, könnte daran liegen, dass beim *Soaking* nur geringe Molekülveränderungen zugelassen werden. Hier wäre interessant zu wissen, ob mittels Kokristallisation eine Komplexstruktur erhalten werden könnte. Es konnte bereits in Studien beobachtet werden, dass der durch *Soaking* erhaltene Bindungsmodus eines Liganden nicht immer mit dem Bindungsmodus übereinstimmt, der mittels Kokristallisation erhalten wird.[137] Denn gerade bei größeren Liganden und flexiblen Proteinen werden häufig durch *Soaking* andere Ergebnisse erhalten.

Aber vielleicht würde das Protein auch durch die Bindung eines solchen Liganden so stark destabilisiert, dass sich erst gar kein Dimer mehr ausbilden kann und dementsprechend wahrscheinlich auch keine Kristalle mehr entstehen. Vielleicht war auch die *Soaking*-Zeit von einer Stunde für den Erhalt einer Komplexstruktur zu gering. Bei kleinen, Fragment-ähnlichen Verbindungen ist zwar die Konzentration entscheidender als die *Soaking*-Zeit, allerdings könnte es auch sein, dass die Löslichkeit der Fragmente zu gering war und somit auch die Konzentration nicht ausreichte.

Fragment-*Screening*: Kristallographie versus TSA

Die in dieser Arbeit durchgeführten TSA-Experimente sollten zur Bestätigung der kristallographisch ermittelten Fragment-*Hits* dienen. Vor Durchführung der TSA-Experimente wurde angenommen, dass die mittels kristallographischen Fragment-*Screenings* ermittelten Binder im TSA-Experiment eine Erhöhung des Protein-Schmelzpunktes bewirken, da ein Ligand in der Regel einen stabilisierenden Einfluss auf ein Protein ausübt. In dieser Arbeit konnte allerdings ausschließlich ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden. Viele Fragmente, die mittels Proteinkristallographie als Binder ermittelt wurden, zeigten im *Assay* einen destabilisierenden Effekt. Dies könnte daran liegen, dass in allen fünf Fällen durch die Bindung des Fragments Interaktionen im *Interface* des Dimers aufgebrochen werden. Diese Fragmente üben somit auf das Dimer einen destabilisierenden Effekt aus und bewirken letztlich eine Erniedrigung der Schmelztemperatur.

Es stellt sich die Frage, ob die Fragmente, bei denen eine Erniedrigung des Schmelzpunktes beobachtet werden konnte, ebenfalls als *Hit* bezeichnet werden sollten. Ein *Thermal-Shift-Assay* wird nicht selten als *Pre-Screening*-Methode vor dem eigentlichen Fragment-*Screening* eingesetzt. In der Literatur werden zumeist nur die Liganden als *Hit* bezeichnet, die eine Stabilisierung des Proteins und somit eine Schmelzpunkterhöhung bewirken.[138] Mit den Kenntnissen aus dem in dieser Arbeit vorgenommenen kristallographischen Fragment-*Screening* sollte eine Definitionsänderung des Begriffs „*Hit*“ im Zusammenhang mit TSA in Betracht gezogen werden, da sich anscheinend auch Fragmente, die einen negativen *Shift* der Schmelztemperatur bewirken, als Binder herausstellen können. Angenommen, die mittels TSA identifizierten 26 Fragmente wären als *Hit* angesehen worden, so wäre mittels TSA eine *Hit*-Rate von 27 % (26 aus 96) erzielt worden. Fünf von diesen 26 Fragment-*Hits* wurden ebenfalls mithilfe des kristallographischen Fragment-*Screenings* identifiziert. Wäre TSA also in

dieser Arbeit als *Pre-Screening*-Methode eingesetzt worden, so wären 26 Fragmente für das anschließende kristallographische Fragment-*Screening* ausgewählt worden. Davon wären dann fünf Fragmente als *Hit* identifiziert worden. Das entspräche einer *Hit*-Rate von 19 % (5 aus 26, siehe **Abbildung 3.10-6**). Somit hätte ein *Pre-Screening* mittels TSA eine Reduktion der Fragment-Kandidaten für das kristallographische *Screening* erwirkt und die *Hit*-Rate nahezu verdoppelt (von etwa 10 % auf 19 %), alles unter der Voraussetzung, dass die auf das Protein destabilisierend wirkenden Fragmente als *Hits* angesehen worden wären.

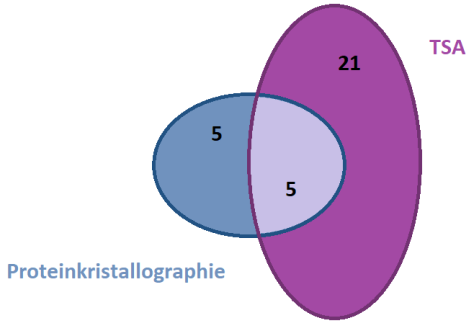


Abbildung 3.10-6: Überlappende* Hit-*Raten aus Proteinkristallographie und TSA. *Die* Hit-*Rate des kristallographischen Fragment*-Screenings *ist blau dargestellt, die* Hit-*Rate des* Thermal-Shift-Assays *violett. Die überlappende* Hit-*Rate ist in Lila gezeigt.*

Ein kristallographisches Fragment-*Screening* mit 96 unterschiedlichen Fragmenten konnte im Falle von IpgC (erschwerte Kristallisation und Datenauswertung) vom Aufwand her gerade noch realisiert werden. Hätte die Fragment-Bibliothek jedoch mehrere hundert bis tausend Verbindungen umfasst, so wäre eine Durchführung ohne vorheriges *Pre-Screening* nicht möglich gewesen.

Insgesamt ist die Durchführung eines Fragment-*Screenings* mittels TSA viel weniger zeitintensiv als die Durchführung eines kristallographischen Fragment-*Screenings*. Das TSA-Experiment nahm insgesamt etwa 4-5 Tage in Anspruch, da zunächst auch die *Assay*-Methode für IpgC etabliert werden musste. Ansonsten hätte es wahrscheinlich nur 1-2 Tage benötigt. Das kristallographische Fragment-*Screening* dagegen nahm einige Monate in Anspruch. Einmal liegt das daran, dass insgesamt sehr viel Protein benötigt wurde, um IpgC-Kristalle in ausreichenden Mengen zu erhalten. Dazu musste zunächst die Proteinreinigung erfolgen. Hinzu kommt, dass die Kristallisationsbedingung sehr empfindlich in Bezug auf äußere Parameter (wie z.B. Temperatur) reagierte und somit sehr viele Kristallisationsplatten angesetzt werden mussten, um ausreichend Kristalle zu erhalten. Zudem mussten sehr viele Fragmente ein zweites bzw. drittes Mal *gesoakt* werden, da die Kristalle nach dem *Soaking* häufig nicht mehr

genügend Streuvermögen besaßen. Zuletzt nahm auch die Verfeinerung der Datensätze enorm viel Zeit in Anspruch, zumal manche Kristalle verzwillingt waren und daher ein anderes Programm zur Verfeinerung verwendet werden musste. Die Auswertung der TSA-Ergebnisse erfolgte dagegen sehr schnell. Allerdings ist natürlich der Informationsgehalt eines TSA-Experiments auch deutlich geringer. Die Kristallographie liefert dagegen validierte Treffer zusammen mit einem Bindungsmodus.

Geben die TSA-Ergebnisse Auskunft über das in Lösung vorhandene Dimer?

Die hier beschriebenen TSA-Ergebnisse lassen die Vermutung aufkommen, es könne sich bei Dimer-1 um das Dimer handeln, welches auch in Lösung vorliegt. Denn wie sonst könnten die Fragmente, welche im *Interface* von Dimer-1 gebunden haben, eine Erniedrigung des Schmelzpunktes bewirken?

Dass IpgC in Lösung als Dimer vorliegt, wurde bislang sowohl durch *multiangle laser light scattering* (MALLS)[37] als auch durch Gelfiltration[113] und *Crosslinking*-Experimente[134] ermittelt. Doch um welche Art von Dimer handelt es sich? LUNELLI *et al.*[37] stellten sich ebenfalls diese Frage, als sie eine Kristallstruktur bestimmt hatten, in der ein anderes Dimer erhalten wurde, als zuvor von BARTA *et al.*[113] ermittelt worden war. Um herauszufinden, welches der beiden Dimere in Lösung tatsächlich vorliegt, mutierten LUNELLI *et al.* zwei Aminosäuren, die sich im *Interface* des von ihnen ermittelten Dimers befanden. Die zwei vorgenommenen Mutationen, Ala94Glu und Val95Gln, sollten eine Spaltung des Dimers bewirken. Mithilfe von MALLS-Experimenten – dabei wird die Proteinlösung mit Laserlicht bestrahlt und aus den Eigenschaften des Streulichts kann das Molekulargewicht des Proteins bestimmt werden – konnten LUNELLI *et al.* zeigen, dass IpgC mit den enthaltenen Mutationen in Lösung nicht mehr als Dimer, sondern als Monomer vorliegt. LUNELLI *et al.* nahmen daher an, dass das in ihrer Kristallstruktur vorhandene Dimer auch in Lösung vorliegt. Sie fanden weiterhin heraus, dass mit dieser doppelt-mutierten Proteinvariante keine Produktion und Sekretion von IpaB mehr erfolgte. Dies sahen sie als Beweis für die Notwendigkeit der Dimerisierung von IpgC. Auch für SycD, einem IpgC-orthologen Protein, konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung für die Sekretion der entsprechenden Substrate essentiell ist.[128]

Wird das in dieser Arbeit ermittelte *back-to-back*-Dimer noch einmal mit dem *head-to-back*-Dimer von LUNELLI *et al.* im Hinblick auf die Lage der Aminosäuren Ala94 und Val95 verglichen, so fällt auf, dass sich diese beiden Aminosäuren auch im *Interface* des *back-to-back*-Dimers

befinden. Das heißt, auch im *back-to-back*-Dimer würde die Einführung oben genannter Mutationen höchstwahrscheinlich zum Aufbrechen der Dimer-Struktur führen. Im *back-to-back*-Dimer sind zudem die Aminosäuren Ala94 und Val95 beider Ketten im *Interface* des Dimers anzutreffen, und zwar direkt gegenüberliegend. Folglich steht noch keineswegs fest, welches Dimer in Lösung vorliegt, denn den Erklärungen von LUNELLI *et al.* zu Folge könnte auch das in dieser Arbeit ermittelte Dimer das „richtige" sein. Darüber hinaus ist es durchaus denkbar, dass sich auch in Lösung unterschiedliche Dimerformen ausbilden können.

Neueste Studien deuten darauf hin, dass in Lösung sehr wahrscheinlich ein symmetrisches Dimer vorliegt, wie es bei BARTA *et al.* beobachtet werden kann. Dies ermittelten FERRARI *et al.* mit *small-angle X-ray scattering* (SAXS).[135] Deutlich wird hierbei, dass letztendlich noch zu viele Fragen offen sind und ein Nachweis, welches Dimer in Lösung tatsächlich existiert, schwer zu erbringen ist.

3.11. Mit *SeeSAR* auf der Suche nach *Follow-up*-Verbindungen

Mithilfe des kristallographischen Fragment-*Screenings* wurden *Hits* identifiziert, die teilweise als Startpunkt zur Entwicklung von *Follow-up*-Verbindungen dienen sollten. Diese *Follow-up*-Verbindungen wurden mithilfe von *SeeSAR*, einer Plattform für struktur- und ligandbasiertes molekulares Design, aus einer Liste kaufbarer Substanzen (MolPort) ausgewählt.

3.11.1. Bewertung der *Docking*-Ergebnisse

Beim *Docking* handelt es sich um computergenerierte Vorhersagen. Die vorhergesagten Wechselwirkungen wurden zusätzlich visuell auf ihre Plausibilität hin überprüft. Zudem wurden durch festgelegte Filter alle Moleküle herausgefiltert, die angespannte Torsionswinkel oder schwerwiegende inter- bzw. intramolekulare Kollisionen aufwiesen. Moleküle wurden zudem nach abgeschätzter Affinität (engl. *estimated affinity*), *Docking-Score* bzw. *Docking-Score per atom* sortiert. Anschließend wurde nach Molekülen gesucht, die in mehreren *Rankings* relativ weit oben erschienen. Es konnte beobachtet werden, dass Moleküle mit hoher abgeschätzter Affinität auch visuell eine gute *Docking*-Pose einnahmen. Die geschätzte Affinität war jedoch auch sehr gut, solange keine Kollisionen zwischen Molekül und Protein auftraten. Ebenso fiel auf, dass größerer Moleküle automatisch eine bessere geschätzte Affinität besaßen. Durch das sogenannte *HYDE Coloring* wurde der Beitrag einzelner Atome zur Bindungsenergie visuell dargestellt. Kollisionen und die Qualität der Torsionswinkel wurden ebenfalls visuell innerhalb des Programms angezeigt (siehe **Abbildung 3.11-1**).

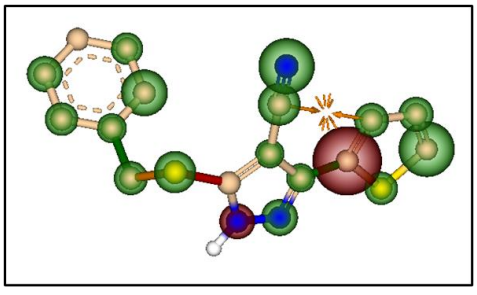


***Abbildung 3.11-1: Darstellung eines* gedockten *Moleküls in* SeeSAR.** *Das Molekül ist als Kugel-Stab-Modell gezeigt. C-Atome sind beige, N-Atome blau, S-Atome gelb und H-Atome weiß. Atome, die einen positiven Beitrag zur geschätzten Bindungsaffinität leisten, sind von grünen Kugeln umgeben. Atome, die einen negativen Beitrag leisten, sind von braunen Kugeln umgeben. Die Größe der Kugel hängt ab von der Größe des positiven bzw. negativen Beitrags zur Bindungsenergie. Dies wird als* HYDE Coloring *bezeichnet. Die Qualität von Torsionswinkeln ist farbig dargestellt. Die jeweilige Bindung ist grün (entspannt), orange (tolerabel) bzw. rot (angespannt) gefärbt* (Torsion Coloring). *Inter- bzw. intramolekulare Kollisionen sind als Pfeildarstellung zwischen den beteiligten Atomen angedeutet. Orange gefärbte Pfeile weisen auf mögliche Kollisionen hin, rot gefärbte Pfeile auf schwere Kollisionen* (Molecular Clashes).

3.11.2. *Docking*-Ergebnisse mit J20 als Startfragment

Ausgehend vom kristallographischen Fragment-*Hit* **J20** wurden anlässlich vielversprechender *Docking*-Resultate sieben *Follow-up*-Verbindungen ausgewählt (siehe **Abbildung 3.11-2**). Die für diese Moleküle erhaltenen *Docking*-Posen werden im Folgenden näher beschrieben.

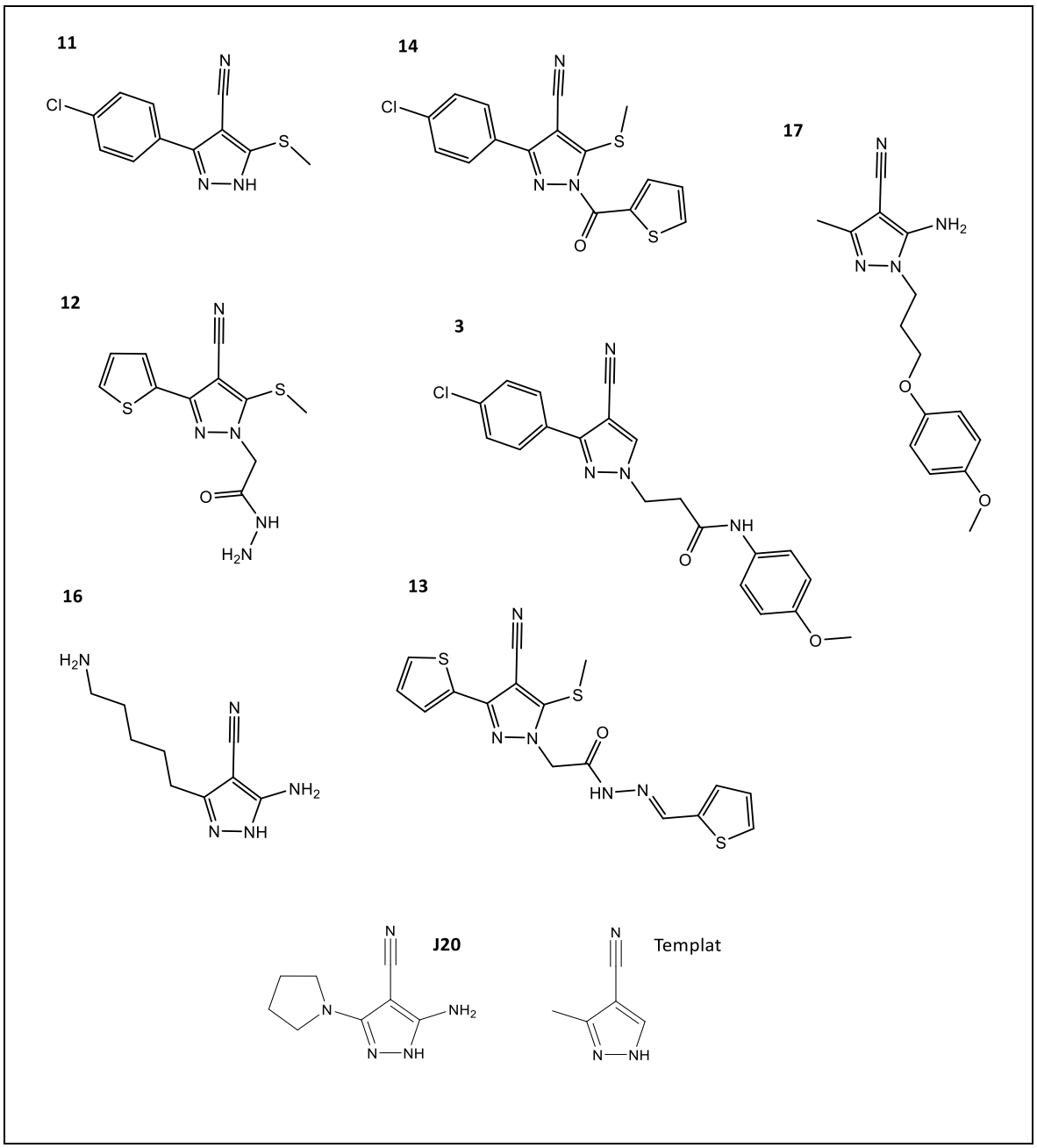


Abbildung 3.11-2: Strukturformeln der ausgewählten* Follow-up-*Verbindungen ausgehend von Fragment*-Hit *J20. *Zum Vergleich sind am unteren Bildrand noch einmal die Strukturformel von **J20** und die Strukturformel des Templats dargestellt.*

Molekül **11**

Das erste Molekül, welches ausgewählt wurde, war Molekül **11**. Es besitzt anstelle des Pyrrolidinrings einen Phenylring mit einem Cl-Atom in *para*-Position. Molekül **11** kann als Kombination von zwei kristallographischen Fragment-*Hits* angesehen werden, da ein weiterer Fragment-*Hit* mit einer *para*-Fluorphenyl-Gruppe (**J45**) an dieser Position identifiziert wurde. Zusätzlich besitzt Molekül **11** eine Methylsulfanyl-Gruppe. In **Abbildung 3.11-3** ist die *Docking*-Pose von Molekül **11** und die Position von **J20** dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Molekül **11** im Vergleich zu **J20** leicht in Richtung Tascheneingang verschoben ist. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass der *para*-Chlorphenyl-Ring im hinteren Bereich der Tasche mehr Platz benötigt als der Pyrrolidinring von **J20**. So kommt es laut Vorhersage zur Ausbildung einer H-Brücke zwischen dem protonierten Stickstoff des Pyrazolrings und der Carboxygruppe von GluB125. Das in **Abbildung 3.11-3** gezeigte H_2O-Molekül wurde als Teil der Bindetasche behandelt.

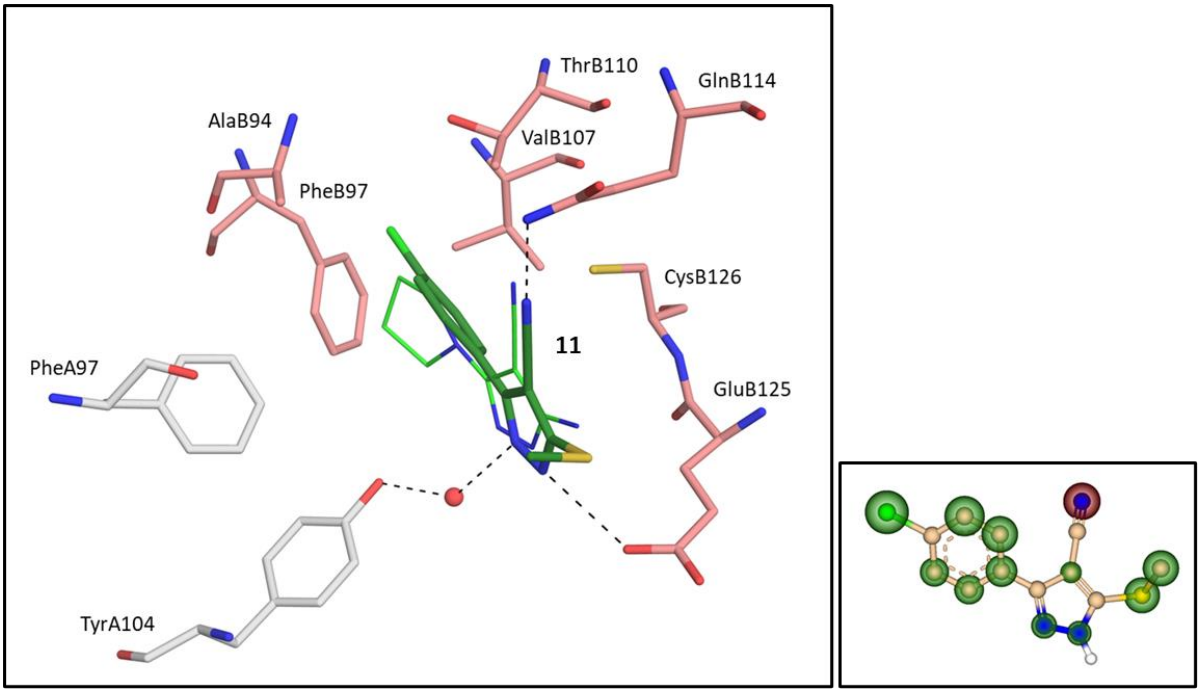


Abbildung 3.11-3:* Docking-*Pose von Molekül 11 und Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie. *Links:* Docking-*Pose. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa.* ***J20*** *(dünnerer Stäbchenradius) und Molekül* ***11*** *sind ebenfalls als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome von* ***J20*** *sind grün, C-Atome von Molekül* ***11*** *dunkelgrün. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb und Cl-Atome grün. H_2O-Moleküle sind als rote Kugeln abgebildet. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt. Rechts: Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie. Atome, die einen positiven Beitrag zur Bindungsenergie leisten, sind von einer grünen Kugel umgeben. Atome, die einen negativen Beitrag zur Bindungsenergie leisten, sind von einer braunen Kugel umgeben.*

Molekül **16**

Das zweite Molekül – Molekül **16** – ist laut Vorhersage so in der Bindetasche positioniert, dass sich sein 5-Aminopentyl-Substituent im hinteren Bereich der Tasche befindet. Es ist die einzige *Follow-up*-Verbindung, die laut Vorhersage in diesem Bereich der Tasche eine H-Brücke mit dem Protein ausbildet (siehe **Abbildung 3.11-4**). Die Aminogruppe von Molekül **16** würde in dieser Position als H-Brücken-Donor und der Sauerstoff der Hydroxygruppe von ThrB110 als H-Brücken-Akzeptor fungieren. An 5‘-Position besitzt Molekül **16** eine Aminogruppe. Auch dieses Molekül ist laut Vorhersage im Vergleich zu **J20** in Richtung Taschenеingang verschoben, wahrscheinlich aufgrund der Länge der 5-Aminopentyl-Gruppe. Auch Molekül **16** wäre so in der Lage, durch den protonierten Stickstoff des Pyrazolrings eine H-Brücke mit der Carboxygruppe von GluB125 auszubilden, vorausgesetzt, die Seitenkette von GluB125 nimmt tatsächlich diese Position ein.

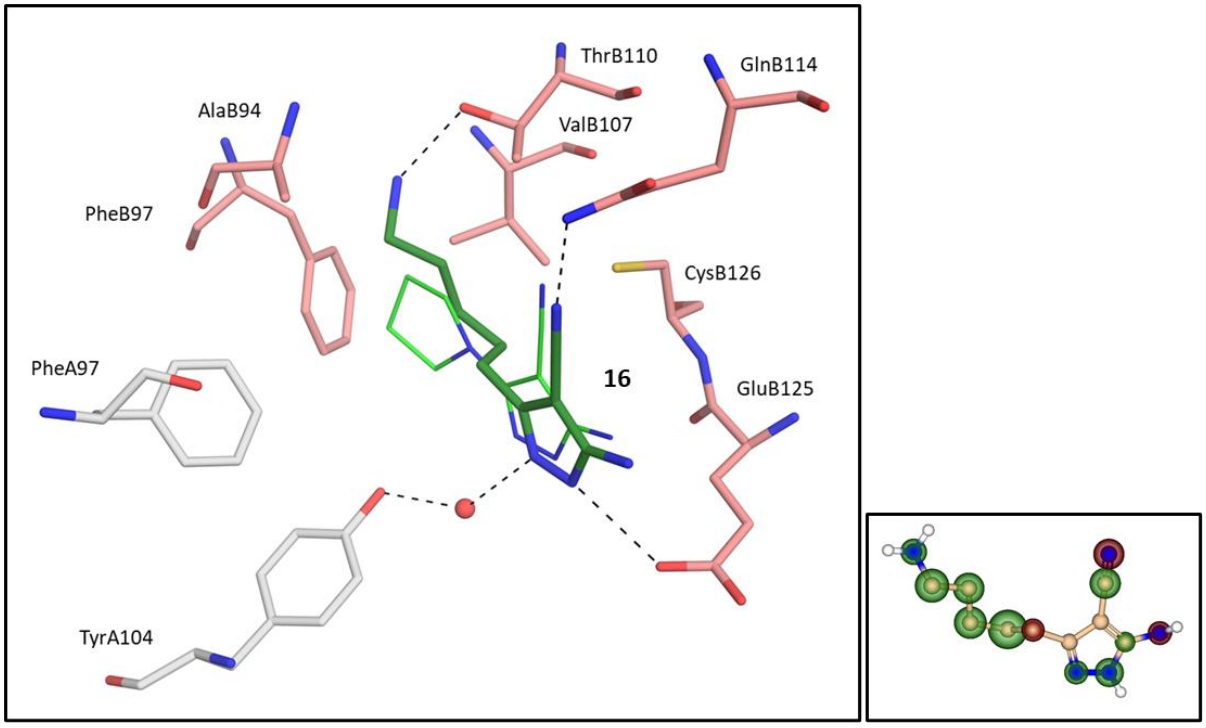


Abbildung 3.11-4: **Docking-*Pose von Molekül 16 und Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie.*** *Links:* Docking-*Pose. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa.* ***J20*** *(dünnerer Stäbchenradius) und Molekül* ***16*** *sind ebenfalls als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome von* ***J20*** *sind grün, C-Atome von Molekül* ***16*** *dunkelgrün. N-Atome sind blau, O-Atome rot und S-Atome gelb. H_2O-Moleküle sind als rote Kugeln abgebildet. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt. Rechts: Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie. Atome, die einen positiven Beitrag zur Bindungsenergie leisten, sind von einer grünen Kugel umgeben. Atome, die einen negativen Beitrag zur Bindungsenergie leisten, sind von einer braunen Kugel umgeben.*

Molekül **3**

Molekül **3** wurde u.a. ausgewählt, weil die von *SeeSAR* geschätzte Affinität im nanomolaren Bereich lag. Zudem hatte es von den in *Session* 2 (siehe **Kapitel 5.8.2**, **Tabelle 5.8-1**) vorhandenen Molekülen den besten *Docking-Score*. Molekül **3** besitzt wie Molekül **11** einen *para*-substituierten Chlorphenyl-Ring. An 5'-Position besitzt es keinen Substituenten. Am Stickstoff des Pyrazolrings befindet sich eine 4-Methoxyphenylpropanamid-Gruppe (siehe **Abbildung 3.11-5**). Molekül **3** ging aus *Session* 2 hervor, in der das H_2O-Molekül zwar enthalten, aber nicht fixiert worden war. Anders hätte das Molekül diese *Docking*-Pose auch nicht einnehmen können. Es besetzt nämlich die Position des Wassermoleküls mit dem Sauerstoff der Amidgruppe. Anstelle des H_2O-Moleküls geht hier der Carbonyl-Sauerstoff eine H-Brücke mit TyrA104 ein. Der Stickstoff der Amidgruppe geht laut Vorhersage eine weitere H-Brücke mit dem Protein ein, und zwar mit dem Rückgrat-Carbonyl-Sauerstoff von HisA133. Diese beiden H-Brücken leisten einen entscheidenden Beitrag zur vorhergesagten Affinität des Moleküls. Der Sauerstoff der Amidbindung trägt laut *SeeSAR* mit -1.4 kJ/mol zur Bindungsenergie bei und der Stickstoff der Amidbindung mit -2.7 kJ/mol. Der sich an die Amidbindung anschließende Methoxyphenylring geht allerdings keine weiteren Interaktionen mit dem Protein ein. Zudem kommt es aufgrund des Methoxyphenylrings zu nicht optimalen, aber noch tolerablen Torsionswinkeln, wie durch *SeeSAR* angezeigt wurde (hier nicht gezeigt).

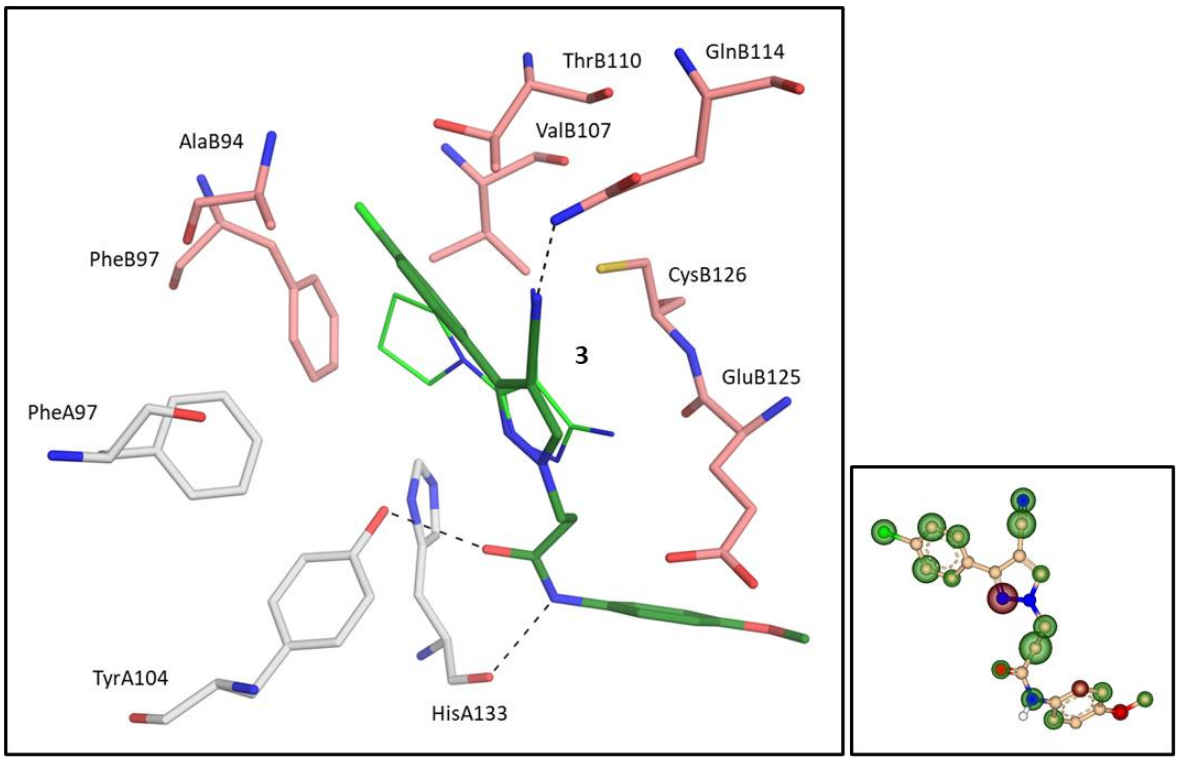


Abbildung 3.11-5: **Docking-*Pose von Molekül 3 und Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie.*** *Links:* Docking-*Pose. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa.* ***J20*** *(dünnerer Stäbchenradius) und Molekül* ***3*** *sind ebenfalls als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome von* ***J20*** *sind grün, C-Atome von Molekül* ***3*** *dunkelgrün. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb und Cl-Atome grün. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt. Rechts: Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie. Atome, die einen positiven Beitrag zur Bindungsenergie leisten, sind von einer grünen Kugel umgeben. Atome, die einen negativen Beitrag zur Bindungsenergie leisten, sind von einer braunen Kugel umgeben.*

Die *Docking*-Posen der Moleküle **12**, **13**, **14** und **17** sind in **Abbildung 3.11-6** dargestellt. Diese vier *Follow-up*-Verbindungen unterscheiden sich in erster Linie in dem Substituenten des Pyrazol-Stickstoffs. In allen vier Vorhersagen geht dieser Substituent H-Brücken mit dem Protein ein, entweder mit AsnA102 oder mit GluB125. Alle vier *Docking*-Posen wurden dadurch erhalten, dass die Seitenkette von GluB125 nach außen gedreht wurde. Zu Molekül **12** ist zu sagen, dass in einer anderen *Session* eine *Docking*-Pose dieses Moleküls gefunden wurde, bei der die Carbonsäurehydrazid-Gruppe auf der gegenüberliegenden Seite positioniert ist und dort mit AsnA102 und dem in **Abbildung 3.11-6** gezeigten H_2O-Molekül eine H-Brücke ausbildet (nicht gezeigt). Molekül **17** wurde ausgewählt, da es laut Vorhersage die erwünschte H-Brücke mit HisB133 bildet. Dafür wurde in Kauf genommen, dass in dieser *Docking*-Pose mehrere Torsionswinkel Werte annehmen, die auf eine interne Spannung schließen lassen, und dieses Molekül keinen Substituenten im hydrophoben Bereich der Tasche aufweist. Zudem ist die zwischen Ether-Sauerstoff und Carboxygruppe von GluB125 vorhergesagte H-Brücke nur möglich, wenn die Carboxygruppe ungeladen vorliegt. In der entsprechenden

Docking-Pose war dies der Fall. Die Darstellungen der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie der in **Abbildung 3.11-6** dargestellten *Follow-up*-Verbindungen sind im Anhang angeführt (siehe **Abbildung 6.4-1**).

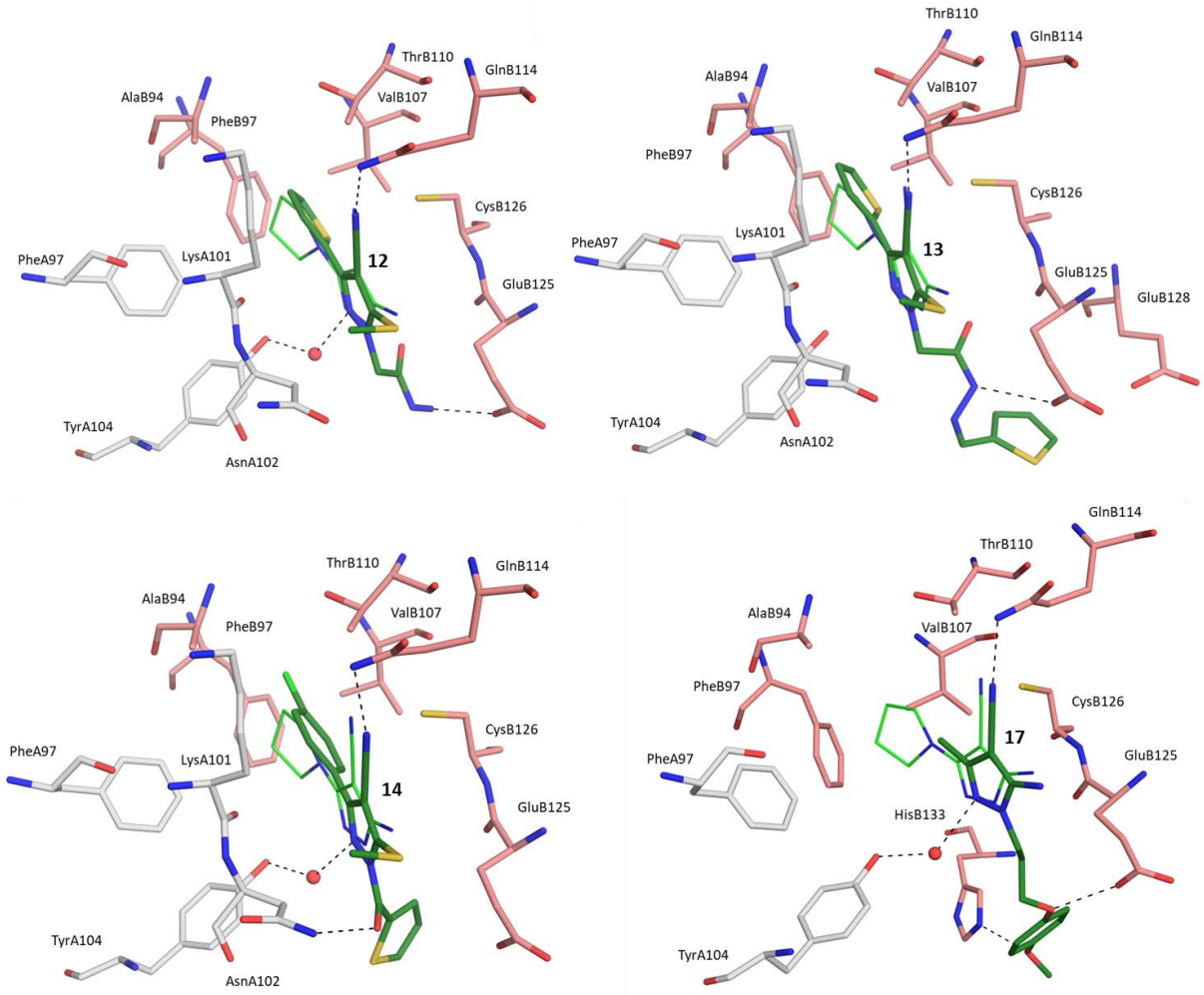


Abbildung 3.11-6: **Docking-*Posen der Moleküle 12, 13, 14 und 17.*** *Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa.* ***J20*** *(dünnerer Stäbchenradius) und die Moleküle* ***12****,* ***13****,* ***14*** *und* ***17*** *sind ebenfalls als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome von* ***J20*** *sind grün, C-Atome der Moleküle* ***12****,* ***13****,* ***14*** *und* ***17*** *dunkelgrün. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb und das Cl-Atom von Molekül* ***14*** *grün. H_2O-Moleküle sind als rote Kugeln abgebildet. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt.*

3.11.3. *Docking*-Ergebnisse mit J2 als Startfragment

Ausgehend von Fragment-*Hit* **J2** wurden aufgrund vielversprechender *Docking*-Resultate fünf *Follow-up*-Verbindungen ausgewählt (**siehe Abbildung 3.11-7**). Ohne den im Templat enthaltenen Indol-Stickstoff – dieser war für manche *Sessions* bereits in der MolPort-*Substructure Search* durch ein beliebiges Heteroatom ersetzt worden – ergaben sich keine interessanten *Follow-up*-Verbindungen.

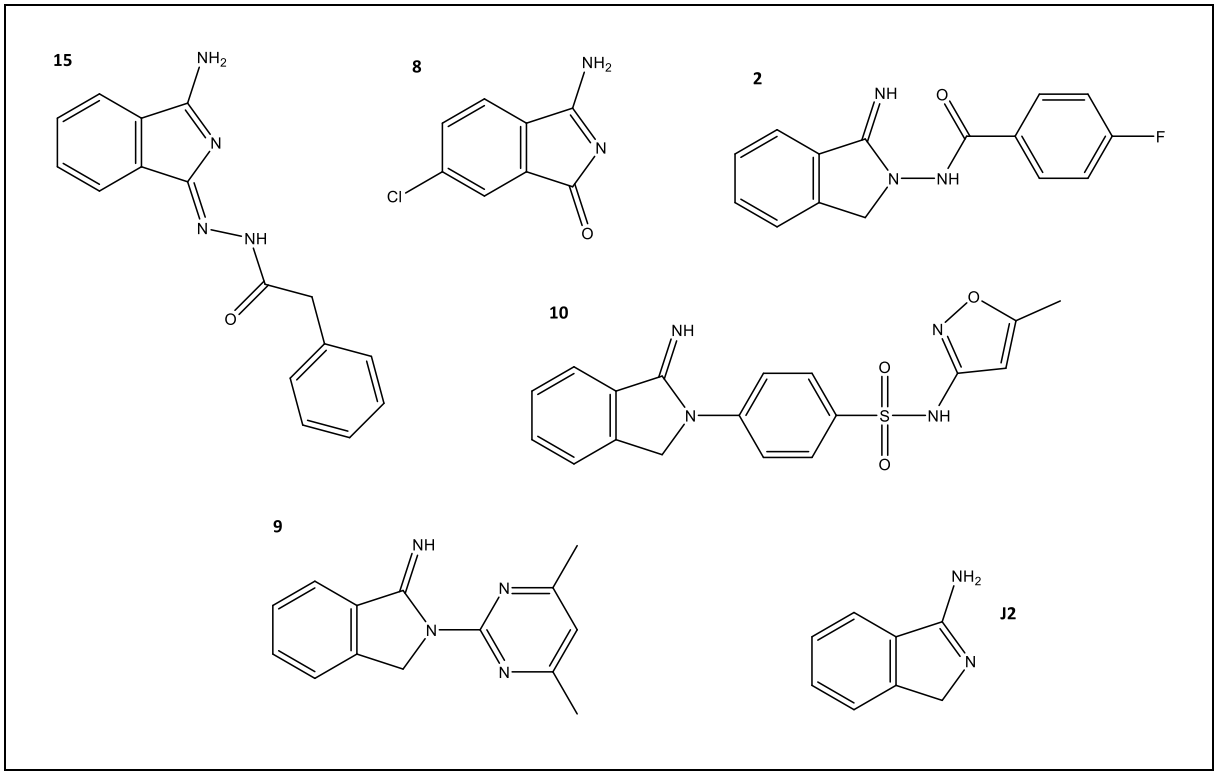


Abbildung 3.11-7: Strukturformeln der ausgewählten* Follow-up-*Verbindungen ausgehend von Fragment*-Hit *J2. *Zum Vergleich ist rechts unten noch einmal die Strukturformel von **J2** gezeigt.*

Molekül **8**

Ein Molekül, welches aus dem *Docking* mit **J2** als Startfragment hervorging, war Molekül **8**. Molekül **8** besitzt im Vergleich zu **J2** zwei zusätzliche Atome. Zum einen befindet sich an 6'-Position ein Cl-Atom, welches laut Vorhersage im hinteren Bereich der Tasche zu finden ist. Darüber hinaus weist Molekül **8** eine zusätzliche Carbonylgruppe auf. Durch diesen Carbonyl-Sauerstoff könnte diese Verbindung eine direkte H-Brücke mit der Hydroxygruppe von TyrA104 ausbilden und hier als H-Brücken-Akzeptor fungieren (siehe **Abbildung 3.11-8**). Auf diese Art würde das H_2O-Molekül, welches in der Kristallstruktur mit **J2** eine indirekte Interaktion mit TyrA104 eingeht, verdrängt. Die Aminogruppe des Moleküls geht laut Vorhersage keine Wechselwirkungen ein. Das liegt wahrscheinlich daran, dass die Seitenkette von GluB125 in der entsprechenden *Session* nach außen gedreht wurde, um den Eingang der Bindetasche freizulegen. Eine Interaktion mit GluB125 wäre jedoch bei einer anderen Seitenkettenkonformation durchaus denkbar. Durch das Cl-Atom ist die Lage des Ringsystems nicht identisch mit der Lage von **J2** (siehe **Abbildung 3.11-8**). Durch die zwei zusätzlichen Atome im Molekül kommt es laut Vorhersage zu einer deutlichen Verschiebung.

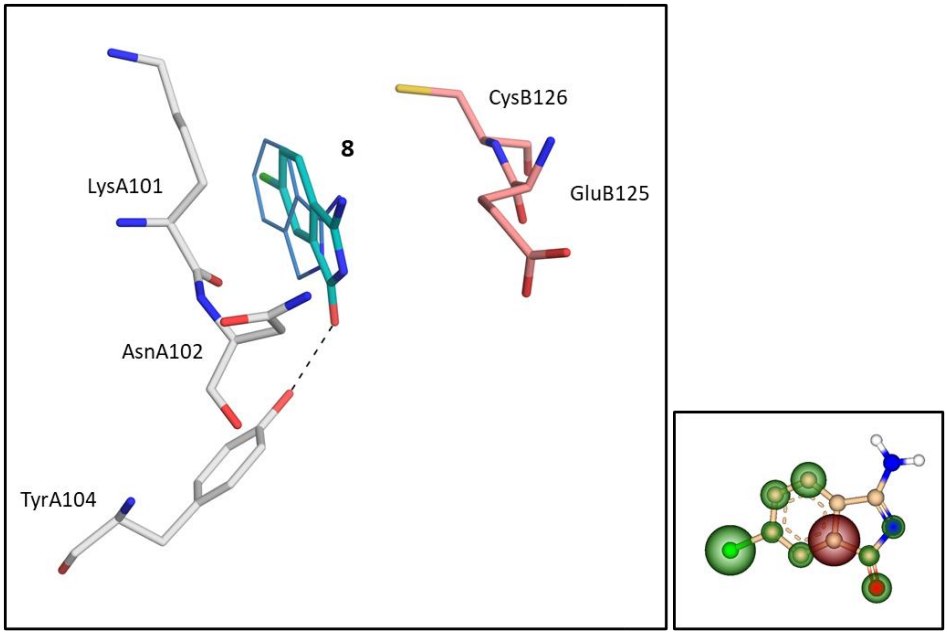


Abbildung 3.11-8:* Docking-*Pose von Molekül 8 und Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie. *Links:* Docking-*Pose. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa.* ***J2*** *(dünnerer Stäbchenradius) und Molekül* ***8*** *sind ebenfalls als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome von* ***J2*** *sind mittelblau, C-Atome von Molekül* ***8*** *mintgrün. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb und Cl-Atome grün. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt. Rechts: Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie. Atome, die einen positiven Beitrag zur Bindungsenergie leisten, sind von einer grünen Kugel umgeben. Atome, die einen negativen Beitrag zur Bindungsenergie leisten, sind von einer braunen Kugel umgeben.*

In **Abbildung 3.11-9** sind die *Docking*-Posen der übrigen, auf **J2** aufbauenden *Follow-up*-Verbindungen gezeigt. Die Moleküle **9** und **15** stammen ebenfalls aus einer *Session*, in der die Seitenkette von GluB125 nach außen gedreht wurde. Die *Follow-up*-Verbindungen **10** und **2** stammen aus einer *Session*, in der die Seitenkette von GluB125 die Konformation aufweist, die in der Kristallstruktur von **J2** beobachtet werden kann. Dadurch bleiben laut Vorhersage dort die von GluB125 ausgehenden H-Brücken erhalten. Molekül **15** ist insofern interessant, weil es laut Vorhersage die Bindetasche nach „oben“ hin verlässt. Zudem besitzt Molekül **15** einen zweiten exocyclischen Stickstoff direkt am Isoindol-Grundgerüst. Es handelt sich dabei um eine Aminogruppe, die in der *Docking*-Pose in Richtung TyrA104 ausgerichtet ist. Zwischen diesem Stickstoff und der Hydroxygruppe von TyrA104 käme es in dieser Position zur Ausbildung einer H-Brücke. Molekül **9** besitzt einen zusätzlichen Pyrimidinring. Sehr wahrscheinlich wäre die Bindung dieser Verbindung entropisch begünstigt, da zwischen Isoindol-Grundgerüst und Pyrimidin-Stickstoff eine intramolekulare H-Brücke ausgebildet werden kann. Molekül **10** ragt laut *Docking*-Pose trotz GluB125 in geschlossener Konformation deutlich aus der Bindetasche heraus und liegt sogar teilweise in einer nahegelegenen Subtasche. Der protonierte Stickstoff der Sulfonamid-Gruppe und der Isoxazol-Stickstoff befinden sich laut Vorhersage in einer idealen Position, um mit dem Rückgrat-Sauerstoff von HisA133 bzw. dem Rückgrat-Stickstoff von AsnA135 eine H-Brücke ausbilden zu können. Molekül **2** könnte über den Carbonyl-Sauerstoff eine direkte H-Brücke mit TyrA104 eingehen. Allerdings weicht die Position des Isoindol-Grundgerüsts laut Vorhersage am stärksten von der Position des Fragment-*Hits* in der Kristallstruktur ab. Die Darstellungen der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie der in **Abbildung 3.11-9** dargestellten *Follow-up*-Verbindungen sind im Anhang angeführt (siehe **Abbildung 6.4-1**).

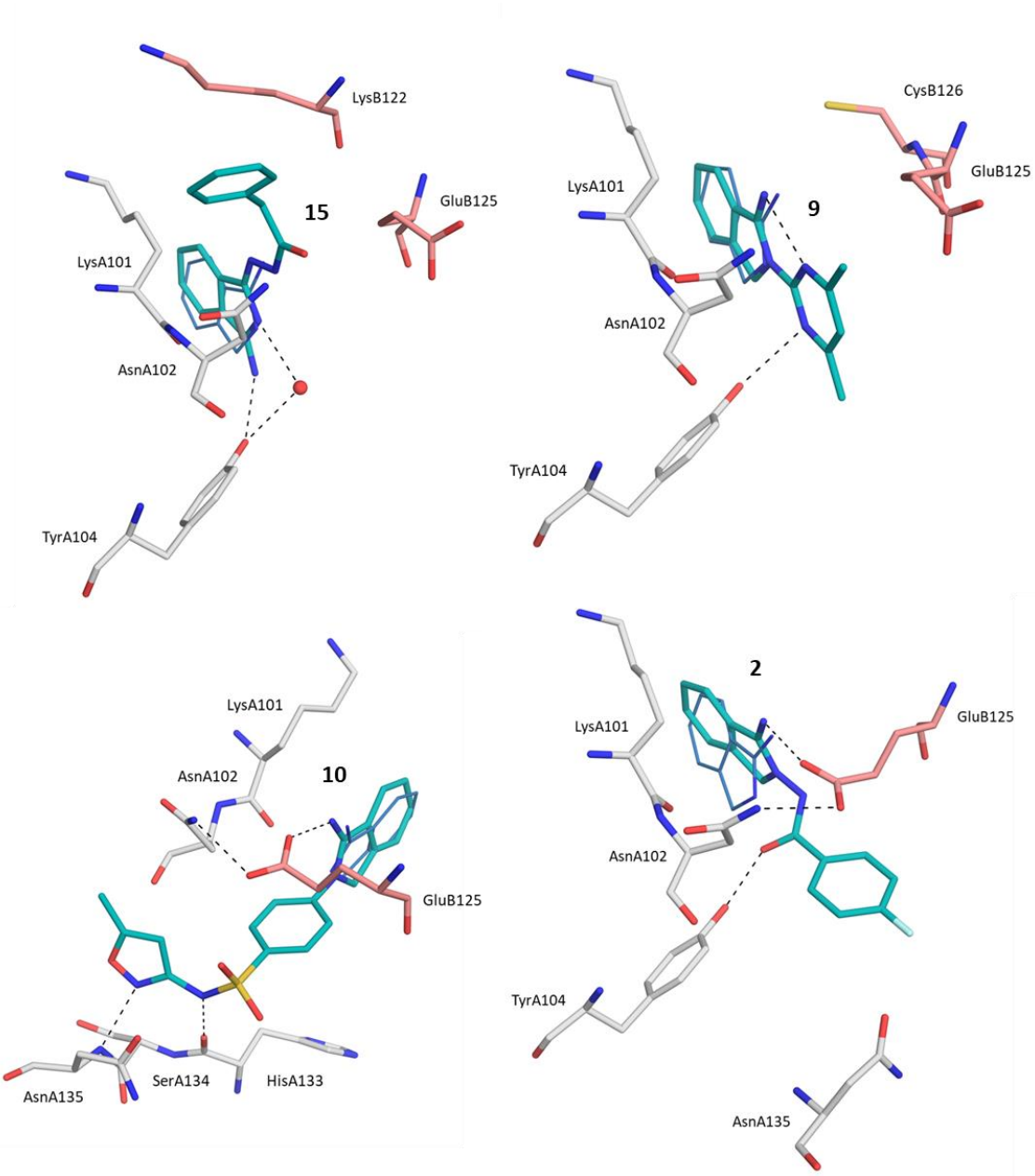


Abbildung 3.11-9: **Docking-*Posen der Moleküle 2, 9, 10 und 15.*** *Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa.* ***J2*** *(dünnerer Stäbchenradius) und die Moleküle* ***2****,* ***9****,* ***10*** *und* ***15*** *sind ebenfalls als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome von* ***J2*** *sind mittelblau, C-Atome der Moleküle* ***2****,* ***9****,* ***10*** *und* ***15*** *mintgrün. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb und F-Atome hellblau. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt.*

Insgesamt waren die Ergebnisse, die mit **J2** als Templat erzielt werden konnten, weniger vielversprechend als die Ergebnisse des *Dockings* ausgehend von **J20**. **J2** geht in der Kristallstruktur zwei H-Brücken ein, die beide in Richtung Tascheneingang ausgebildet werden. Soll das Molekül vergrößert werden, müssen diese H-Brücken weichen. GluB125 verhindert jedoch bereits durch seine geschlossene Konformation das Wachstum des Moleküls in eine Richtung. Wird diese Seitenkette nach außen gedreht, ist die Ausbildung dieser H-Brücke bereits nicht mehr möglich und fällt weg.

3.11.4. *Docking*-Ergebnisse mit J45 als Startfragment

Die Suche nach *Follow-up*-Verbindungen durch das *Docking* mit **J45** als Startfragment führte zu fünf relativ großen Verbindungen (siehe **Abbildung 3.11-10**). Das F-Atom von **J45** wurde dazu bereits während der MolPort-*Substructure Search* durch ein beliebiges Halogen-Atom ersetzt. Daher weisen manche *Follow-up*-Verbindungen an dieser Position ein Cl-Atom auf.

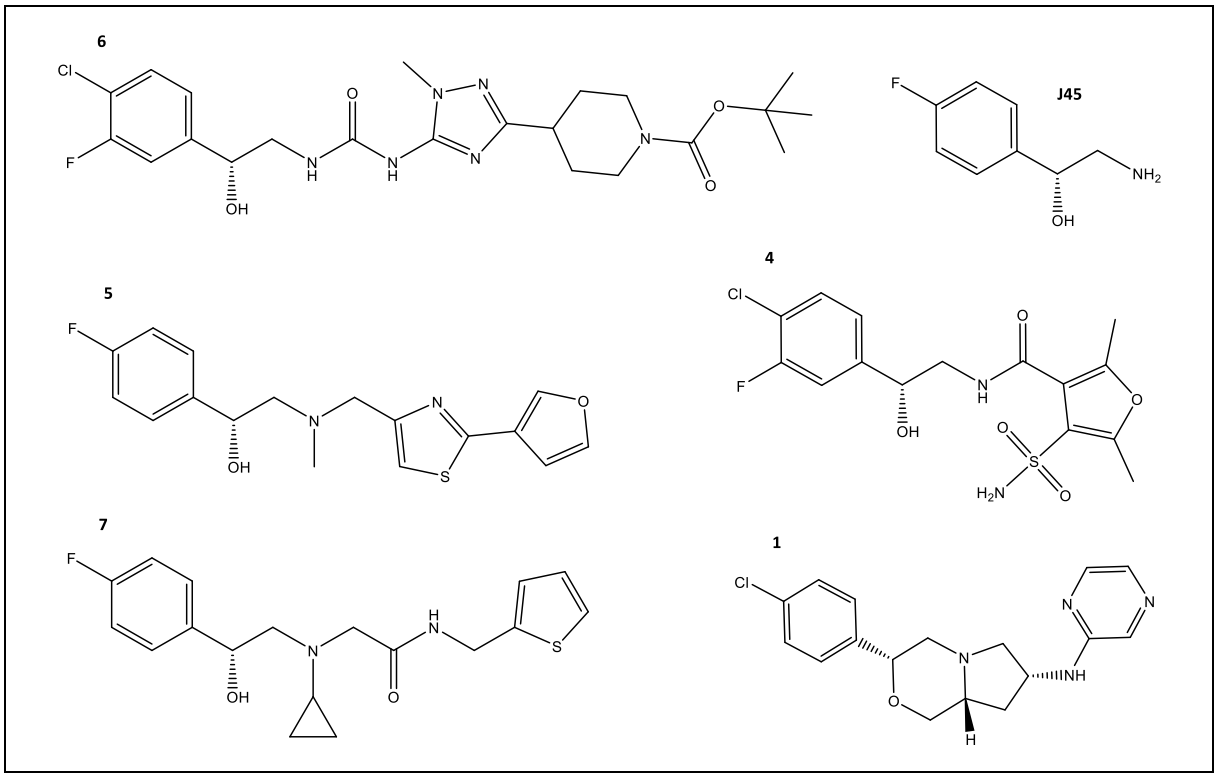


Abbildung 3.11-10: Strukturformeln der ausgewählten* Follow-up-*Verbindungen ausgehend von Fragment*-Hit *J45. *Zum Vergleich ist oben rechts noch einmal die Strukturformel von **J45** gezeigt. **J45** war zeitgleich das Templat.*

Molekül **7**

Molekül **7** ist eine Verbindung, die aus dem Fragment-*Hit* **J45** entstanden ist. Der laut Vorhersage in einer Subtasche positionierte Thiophenring geht keine Wechselwirkungen mit dem Protein ein. Allerdings kann laut *Docking*-Pose eine H-Brücke zwischen dem Amid-Stickstoff und der Carboxygruppe von GluB125 ausgebildet werden (siehe **Abbildung 3.11-11**). Die Seitenkette von GluB125 wurde für die entsprechende *Session* nach außen gedreht. Es könnte zur Ausbildung einer schwachen intramolekularen H-Brücke zwischen dem protonierten tertiären Amid-Stickstoff und dem Carbonyl-Sauerstoff kommen. In **Abbildung 3.11-11** ist neben der *Docking*-Pose von Molekül **7** auch die Position von **J45** gezeigt. Der entsprechende Molekülteil von Verbindung **7** ist im Vergleich dazu nur minimal verschoben. Die bei **J45** von der Hydroxygruppe ausgehenden H-Brücken bleiben laut Vorhersage bei Verbindung **7** bestehen. Ebenfalls in **Abbildung 3.11-11** dargestellt ist der Beitrag einzelner Atome zur Bindungsenergie. Die meisten Atome von Verbindung **7** tragen positiv zur Bindungsenergie bei. Interessanterweise steuern allerdings beide Sauerstoffe nichts zur Bindungsenergie bei.

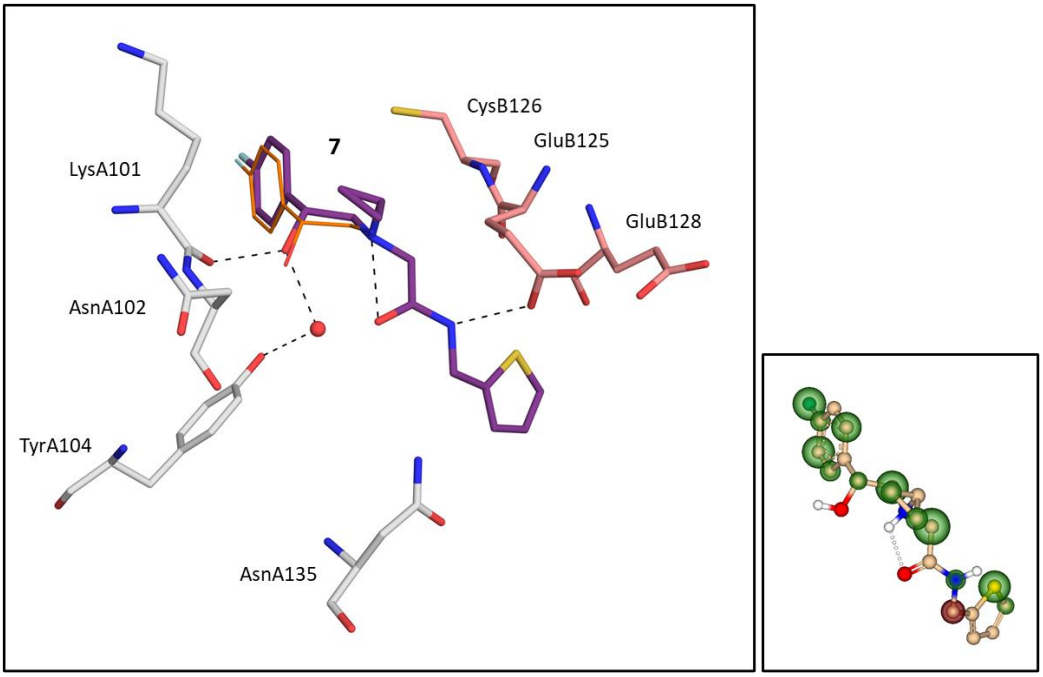


Abbildung 3.11-11: **Docking-*Pose von Molekül 7 und Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie***. *Links:* Docking-*Pose. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa.* ***J45*** *(dünnerer Stäbchenradius) und Molekül* ***7*** *sind ebenfalls als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome von* ***J45*** *sind orange, C-Atome von Molekül* ***7*** *violett. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb und F-Atome hellblau. H_2O-Moleküle sind als rote Kugeln abgebildet. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt. Rechts: Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie. Atome, die einen positiven Beitrag zur Bindungsenergie leisten, sind von einer grünen Kugel umgeben. Atome, die einen negativen Beitrag zur Bindungsenergie leisten, sind von einer braunen Kugel umgeben.*

Die *Docking*-Posen der übrigen, aus **J45** hervorgehenden *Follow-up*-Verbindungen sind in **Abbildung 3.11-12** gezeigt. Die Moleküle **1** und **4** verlassen laut Vorhersage die Bindetasche in Richtung AsnA102 und GluB125. Die Moleküle **5** und **6** dagegen ragen in **Abbildung 3.11-12** nach oben hin aus der hydrophoben Bindetasche heraus. Sowohl Molekül **1** als auch Molekül **4** gehen laut Vorhersage eine direkte H-Brücke mit TyrA104 ein. Das vorhandene, aber nicht fixierte H_2O-Molekül wurde von *FlexX* nicht mit einbezogen. Beide *Follow-up*-Verbindungen gehen weiterhin in der *Docking*-Pose eine H-Brücke mit AsnA135 ein. Molekül **4** ist zudem laut Vorhersage in der Lage, über die vorhandene Sulfonamid-Gruppe eine weitere H-Brücke mit GluB125 auszubilden. Molekül **5** geht in der *Docking*-Pose mit dem zusätzlichen Molekülanteil lediglich hydrophobe Wechselwirkungen ein. Molekül **6** dagegen bildet laut Vorhersage über seine Carboxygruppe gleich zwei weitere H-Brücken mit dem Protein aus. Beteiligt sind die *ε*-Aminogruppe von LysA101 und der Carbamoyl-Stickstoff von GlnB114. Die Moleküle **4** und **6** besitzen im hydrophoben Bereich der Bindetasche zwei Halogen-Substituenten. Insgesamt weichen die in **Abbildung 3.11-12** dargestellten Moleküle deutlich mehr von der Bindungspose von **J45** in der Kristallstruktur ab, als das in **Abbildung 3.11-11** gezeigte Molekül **7**. Die Darstellungen der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie für die in **Abbildung 3.11-12** gezeigten Moleküle befinden sich im Anhang (siehe **Abbildung 6.4-1**).

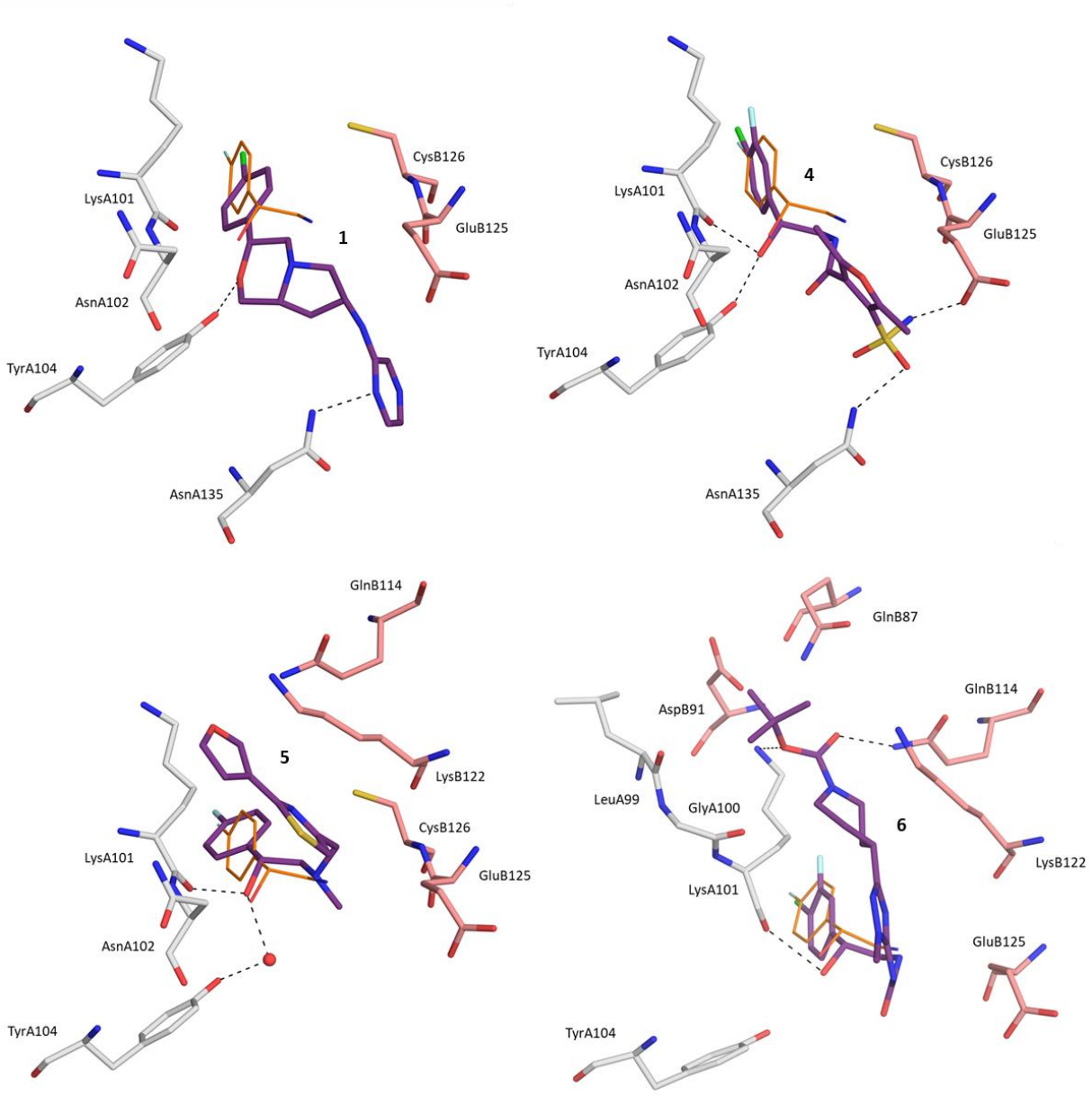


Abbildung 3.11-12: **Docking-*Posen der Moleküle 1, 4, 5 und 6.*** *Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B rosa.* ***J45*** *(geringerer Stäbchenradius) und die Moleküle* ***1, 4, 5*** *und* ***6*** *sind ebenfalls als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome von* ***J45*** *sind orange, C-Atome der Moleküle* ***1, 4, 5*** *und* ***6*** *violett. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb, F-Atome hellblau und Cl-Atome grün. H_2O-Moleküle sind als rote Kugeln abgebildet. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt.*

3.12. Kristallstrukturen der *Follow-up*-Verbindungen

Die mithilfe von *SeeSAR* ausgewählten *Follow-up*-Verbindungen wurden über MolPort bestellt und für *Soaking*-Experimente verwendet. Es kam neben der bewährten *Soaking*-Methode auch eine modifizierte *Soaking*-Methode zum Einsatz. Mithilfe dieser konnten manche Kristalle bis zu 24 h *gesoakt* werden. Die entsprechende Vorgehensweise kann im Material- und Methodenteil nachgelesen werden (siehe **Kapitel 5.7.4**). Um die in der Kristallstruktur identifizierten *Follow-up*-Verbindungen klar von den in **Kapitel 3.11** beschriebenen *gedockten* Molekülen zu unterscheiden, werden die Verbindungen **8**, **9** und **11** in diesem Kapitel als **U08**, **U09** und **U11** bezeichnet, wenn auf die Kristallstruktur Bezug genommen wird.

Insgesamt konnten zwei (eventuell drei) *Hits* identifiziert werden (siehe **Abbildung 3.12-1**). Eine Verbindung – **U11** – ging aus dem *Docking* hervor, für welches **J20** als Startpunkt gewählt worden war. Eine weitere Verbindung – **U09** – stammt aus dem *Docking*, welches mit **J2** als Templat durchgeführt worden war. Eine dritte Verbindung – **U08** – kann eventuell ebenfalls als *Hit* betrachtet werden. Die Differenzelektronendichte war allerdings nicht vollständig, sodass diese Kristallstruktur letztendlich nicht deponiert wurde. **U08** stammt ebenfalls aus dem *Docking* ausgehend von **J2**.

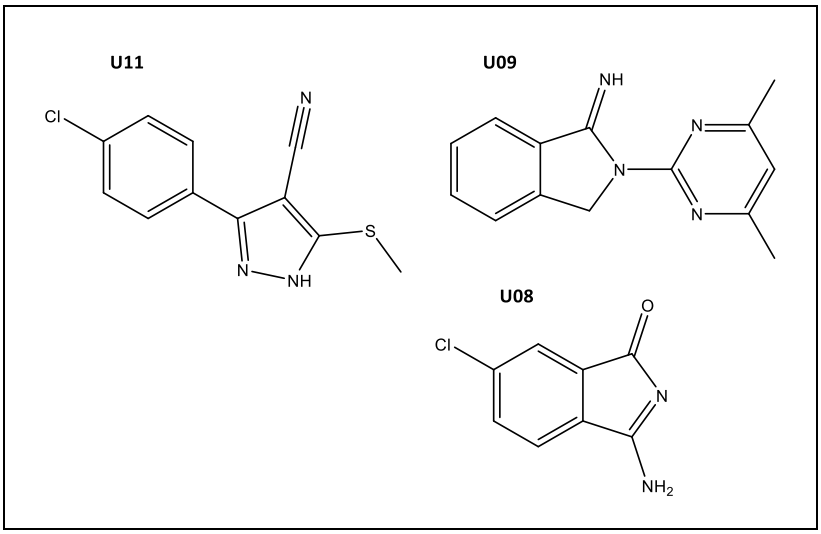


Abbildung 3.12-1: Strukturformeln der* Follow-up-Hits *U08, U09 und U11.

3.12.1. Bindungsmodus von U11

Wird der Bindungsmodus von **U11** (siehe **Abbildung 3.12-2** links) mit dem Bindungsmodus von **J20** verglichen, so fällt auf, dass auch **U11** über den Nitril-Stickstoff eine H-Brücke mit der Carbamoylgruppe von GlnB114 ausbildet. Die Länge dieser H-Brücke (2.9 Å) entspricht in etwa der Länge, die in der Kristallstruktur von **J20** beobachtet wird (3.0 Å). Weiterhin besteht ebenfalls die wasservermittelte Interaktion mit TyrA104, die in gleicher Weise bei **J20** zu beobachten ist. Diese zwei H-Brücken sind mit jeweils 2.7 Å um 0.1 Å länger, als es bei **J20** der Fall ist. Im Gegensatz zu **J20** geht **U11** keine H-Brücke mit LysB122 ein, da anstelle der Aminogruppe eine Methylsulfanyl-Gruppe vorliegt und somit kein H-Brücken-Donor für die Interaktion mit dem Carbonyl-Rückgrat-Sauerstoff von LysB122 zur Verfügung steht. Dafür geht **U11** über den zweiten Stickstoff des Pyrazolrings eine H-Brücke mit der Carboxygruppe von GluB125 ein. Diese Interaktion wurde auch so vorhergesagt. Im Falle von **J20** befindet sich an dieser Stelle ein H_2O-Molekül und die Seitenkette von GluB125 ist fehlgeordnet.

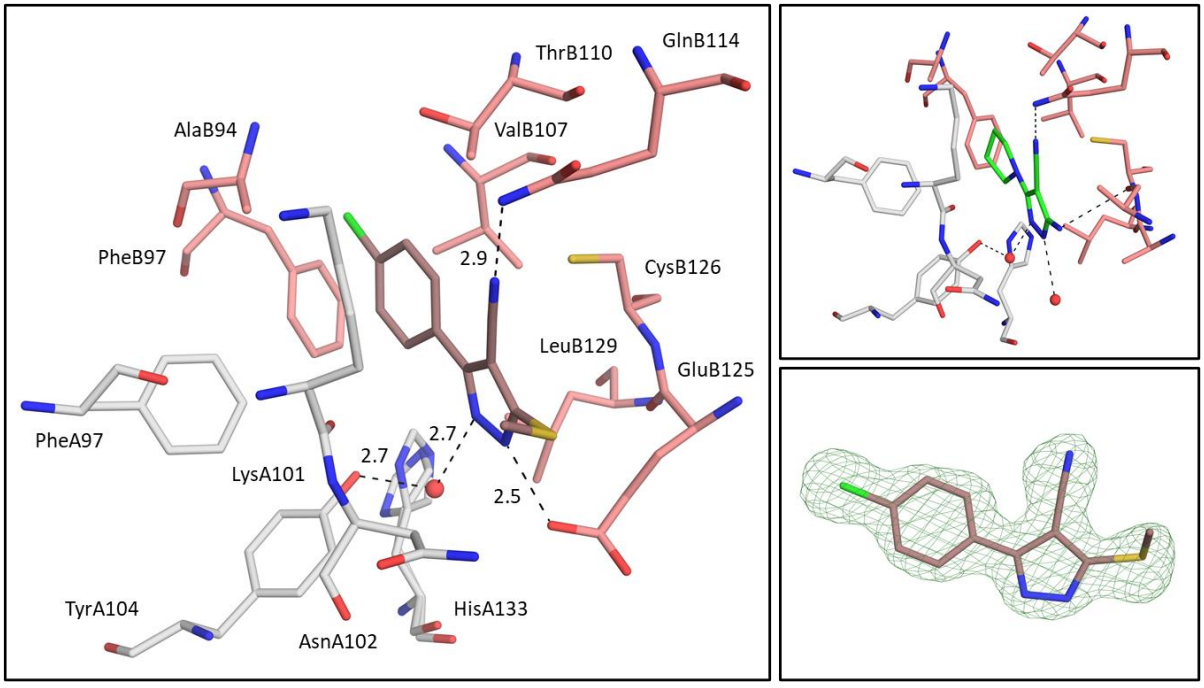


Abbildung 3.12-2: Bindungsmodus und **F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte von U11 (PDB-Code: 7owm).*** *Links: Bindungsmodus von **U11**. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette A sind grau, C-Atome der Aminosäuren von Kette B sind rosa. **U11** ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt. C-Atome von **U11** sind braun. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb und Cl-Atome grün. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt, ihre Abstände sind in Å angegeben. H_2O-Moleküle sind als rote Kugeln gezeigt. Rechts oben: Bindungsmodus von **J20** zum Vergleich (Farbcodierung der Atome identisch, C-Atome von **J20** sind grün). Rechts unten: Darstellung der* F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte von **U11** bei 3.0 σ als grünes Netz.*

Die Besetzung von **U11** wurde auf 81 % verfeinert und an Position des Cl-Atoms wurde ein anomales Signal gemessen. Der Kristall, der zur Bestimmung der hier beschriebenen Kristallstruktur verwendet wurde, war unter Anwendung der modifizierten *Soaking*-Methode für 3-3.5 h in die entsprechende *Soaking*-Lösung transferiert worden. Ein Kristall, der sich 24 h in eben dieser *Soaking*-Lösung befand, ließ sich für eine weitere Datensammlung verwenden. Allerdings war in diesem Fall die Elektronendichte für **U11** schlechter. Der Grund dafür ist wahrscheinlich die geringere Auflösung dieses Datensatzes. Ansonsten deutete sich an, dass wahrscheinlich mithilfe einer längeren *Soaking*-Zeit eine höhere Besetzung des Liganden hätte erzielt werden können.

3.12.2. Überlagerung mit J20, J45 und der entsprechenden *Docking*-Pose

Die Struktur von IpgC im Komplex mit **U11** wurde mit anderen Strukturen überlagert. Da die Aminosäuren von Kette B den hinteren Bereich der Tasche definieren, wurde nur Kette B bei der Strukturüberlagerung in *PyMOL* berücksichtigt. In **Abbildung 3.12-3 a** ist die *Docking*-Pose der Verbindung **11** mit dem in der Kristallstruktur beobachteten Bindungsmodus dieser Verbindung (**U11**) überlagert dargestellt. Zu erkennen ist, dass der Ligand in der Kristallstruktur noch etwas tiefer in der Tasche sitzt, als es durch das *Docking* vorhergesagt wurde. Dies mag daran liegen, dass die in der Kristallstruktur beobachtete Seitenkettenkonformation von GluB125 nicht mit der Konformation übereinstimmt, die für das *Docking* gewählt worden war. Dadurch, dass die Carboxygruppe von GluB125 näher in Richtung Bindetasche verschoben ist, kann der Ligand eine H-Brücke mit dieser ausbilden, obwohl er sich tiefer in der hydrophoben Tasche befindet. Eine weitere Abweichung betrifft die Ausrichtung des *para*-Chlorphenylrings. In der Kristallstruktur beträgt der Winkel zwischen den beiden Ringsystemen des Liganden etwa 10-15° (geschätzt), wohingegen die *Docking*-Pose einen Winkel von ca. 35-40° (geschätzt) aufweist. Die Ausrichtung der Methylsulfanyl-Gruppe wurde durch das *Docking* allerdings korrekt vorhergesagt. In **Abbildung 3.12-3 b** ist die Struktur von **J20** mit der Struktur von **U11** überlagert dargestellt. Zu erkennen ist hier, dass die Lage des Pyrazolrings nahezu exakt übereinstimmt. Die Nitrilgruppe von **U11** ist zur Ausbildung einer H-Brücke mit GlnB114 vom Winkel her noch etwas besser ausgerichtet. In **Abbildung 3.12-3 c** wird die Struktur von **U11** mit der Struktur von **J45** verglichen. **J45** hatte ebenfalls in *Interface*-Tasche 1 gebunden. Durch dieses Fragment war bereits bekannt, dass auch Halogen-substituierte Phenylringe in dieser Tasche binden. Die Position des bei **J45** vorhandenen F-Atoms stimmt mit der Position des bei

U11 vorhandenen Cl-Atoms nahezu überein. Die Ausrichtung des Phenylrings ist jedoch nicht identisch.

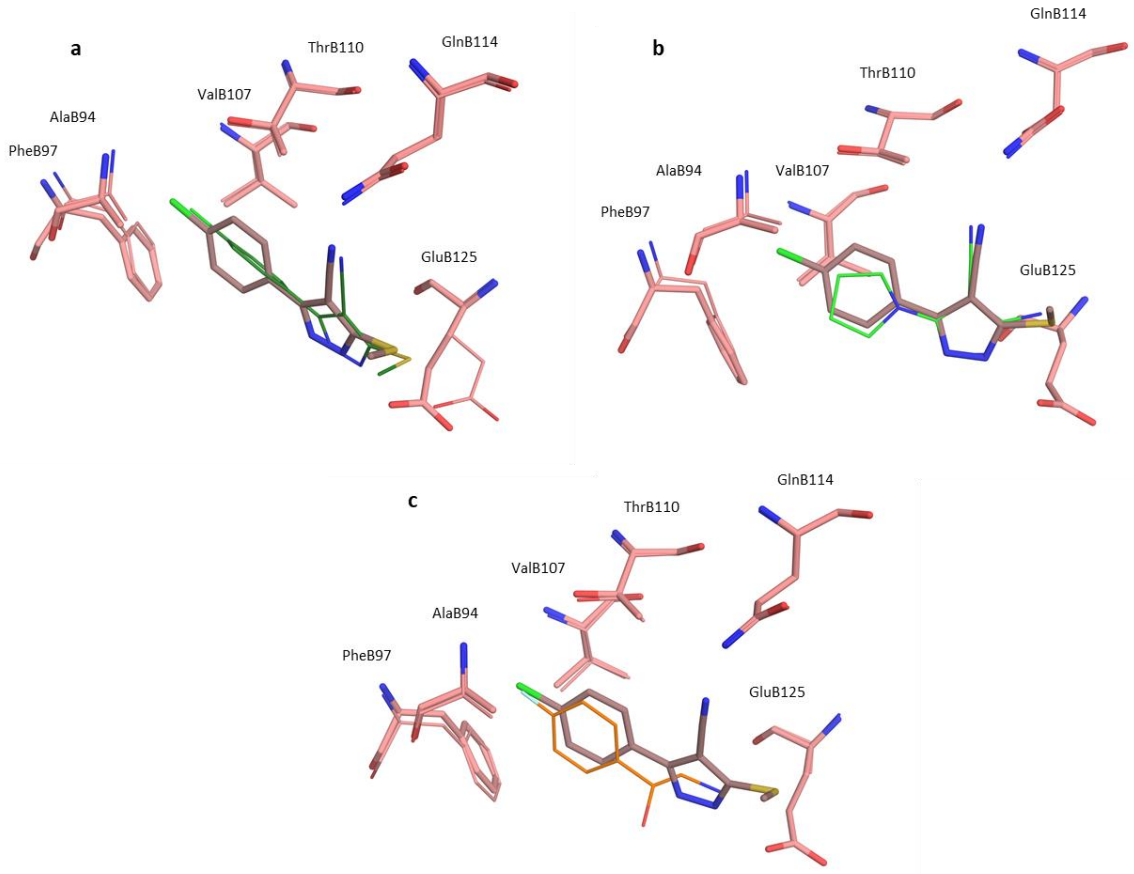


Abbildung 3.12-3: Überlagerung der Struktur von U11 (PDB-Code: 7owm) mit den Strukturen von J20 (PDB-Code: 7axy) und J45 (PDB-Code: 7nrg) und mit der* Docking*-Pose der entsprechenden Verbindung. *Aminosäuren der Kette B sind als Stäbchenmodelle dargestellt. Dabei besitzen die Stäbchen der überlagerten Aminosäuren jeweils einen geringeren Stäbchenradius. C-Atome sind rosa, N-Atome blau und O-Atome rot.* ***U11*** *(C-Atome: braun, Cl-Atom: grün, S-Atom: gelb) ist als Stäbchenmodell gezeigt.* ***a****: Die* Docking*-Pose der Verbindung* ***11*** *(C-Atome: dunkelgrün, Cl-Atom: grün, S-Atom: gelb) ist als Stäbchenmodell überlagert dargestellt.* ***b****:* ***J20*** *(C-Atome: grün) ist als Stäbchenmodell überlagert dargestellt.* ***c****:* ***J45*** *(C-Atome: orange, F-Atom: hellblau) ist als Stäbchenmodell überlagert dargestellt. Bei der Strukturüberlagerung in* PyMOL *wurde nur Kette B berücksichtigt.*

3.12.3. Bindungsmodus von U09

U09 konnte zwar als *Follow-up-Hit* identifiziert werden, allerdings hat diese Verbindung nicht in *Interface*-Tasche 1 gebunden. Dort befindet sich vielmehr ein DMSO-Molekül in zwei unterschiedlichen Orientierungen, wie es auch in der *Blank*-Struktur beobachtet wird (siehe **Kapitel 3.9.10**). **U09** befindet sich stattdessen auf der konkaven Seite der von Kette B ausgebildeten Superhelix. Teilweise ragt **U09** in eine kleine Tasche des Proteins (siehe **Abbildung 3.12-4**). Bei dieser Bindestelle handelt es sich interessanterweise um eine Bindestelle des Interaktionspartners IpaB, wie es bei LUNELLI *et al.* beschrieben steht.[37]

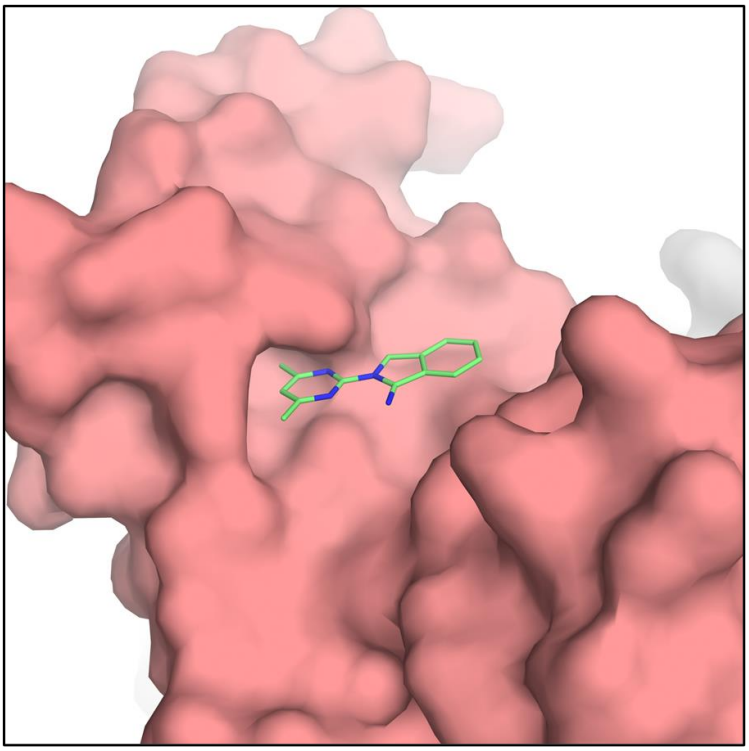


Abbildung 3.12-4: Bindestelle von U09 auf der konkaven Seite der von Kette B ausgebildeten Superhelix (PDB-Code: 7p42). *Die Oberfläche von Kette B ist in Rosa gezeigt.* ***U09*** *ist als Stäbchenmodell dargestellt (C-Atome: grün, N-Atome: blau).*

Der Dimethylpyrimidin-Ring von **U09** liegt in einer kleinen hydrophoben Tasche, die sich unterhalb der Seitenkette von TyrB44 befindet und zu beiden Seiten von TyrB40 und TyrB47 begrenzt wird. Direkte H-Brücken mit dem Protein geht **U09** nicht ein (siehe **Abbildung 3.12-5**). **U09** bildet jedoch über seinen Imin-Stickstoff eine H-Brücke mit einem H_2O-Molekül aus. Dieses H_2O-Molekül interagiert wiederum mit HisB109 und einem weiteren H_2O-Molekül. Die planare Ausrichtung beider Ringsysteme wird durch die Ausbildung einer intramolekularen H-Brücke zwischen dem Imin-Stickstoff und einem Pyrimidin-Stickstoff stabilisiert. Es ist anzunehmen, dass **U09** aufgrund der stark basischen Eigenschaften protoniert vorliegt. In diesem Fall bestünde zwischen Protein und Ligand aufgrund der vielen aromatischen

Seitenketten eine Kation-π-Wechselwirkung. Die in **Abbildung 3.12-5** gezeigte *Omit*-Elektronendichte von **U09** deutet eventuell auf eine zweite Konformation des 3H-Isoindol-1-imin-Rests hin, in der der Imin-Stickstoff mit dem auf der gegenüberliegenden Seite befindlichen Pyrimidin-Stickstoff eine intramolekulare H-Brücke ausbildet. **U09** würde in diesem Fall indirekt über ein H_2O-Molekül mit TyrB40 interagieren. Die Besetzung dieser Konformation wurde jedoch nur auf 13 % verfeinert, weshalb der Ligand so letztlich nicht eingebaut wurde. TyrB44 ist in der Lage, zwei unterschiedliche Konformationen einzunehmen. Auf das Binden des Liganden hin kann jedoch nur die Konformation vorliegen, bei der der *para*-Hydroxyphenyl-Ring bezüglich **Abbildung 3.12-5** nach oben verschoben ist. Selbst dann ist der Abstand zwischen der Seitenkette von TyrB44 und dem Liganden mit 2.8 Å äußerst gering. Das mag daran liegen, dass die Seitenkette aufgrund von Symmetrieäquivalenten im Kristall nicht weiter nach oben ausweichen kann. Die Besetzung für den Liganden und TyrB44 in der nach „oben“ verschobenen Position beträgt 77 %.

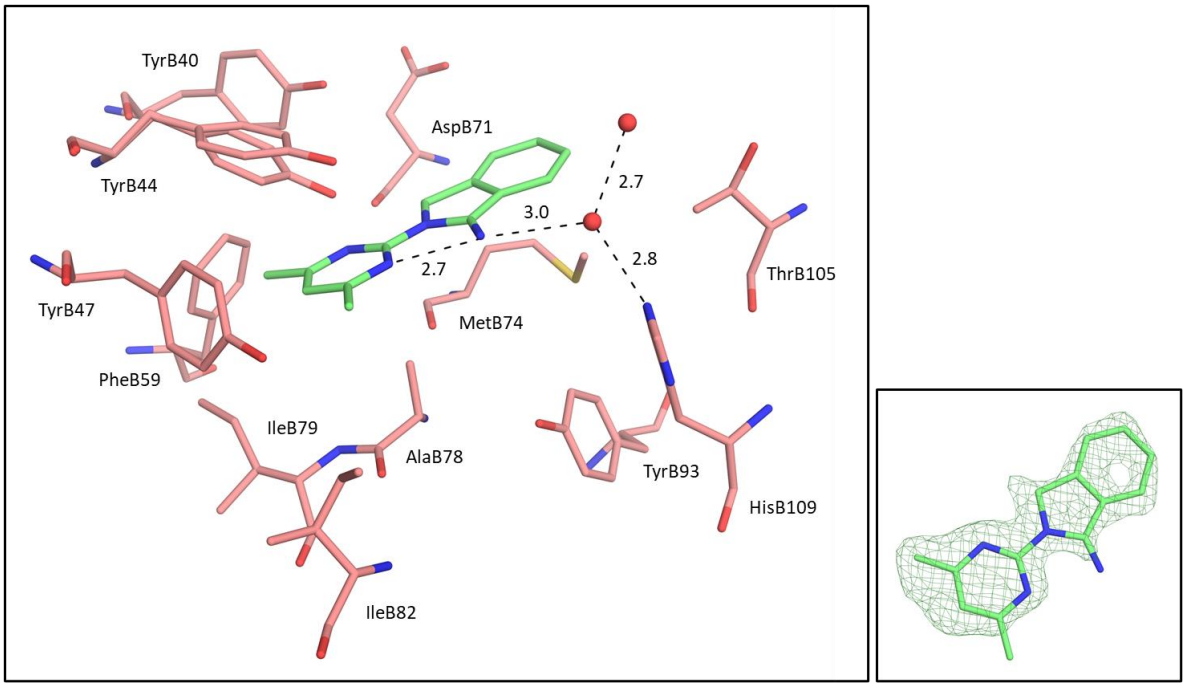


Abbildung 3.12-5: Bindungsmodus und **F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte von U09 (PDB-Code: 7p42).*** *Links: Bindungsmodus von* ***U09****. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. C-Atome der Aminosäuren von Kette B sind rosa.* ***U09*** *(C-Atome: grün) ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt. N-Atome sind blau, O-Atome rot und S-Atome gelb. H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt, ihre Abstände sind in Å angegeben. Wassermoleküle sind als rote Kugeln abgebildet. Rechts: Darstellung der* F_o-F_c-Omit-*Elektronendichte bei 3.0 σ als grünes Netz.*

3.12.4. Überlagerung mit der IpgC-IpaB-Komplexstruktur

U09 bindet an der Stelle, an der auch das IpaB-Bindungsepitop mit IpgC interagiert. Die Struktur von IpgC mit gebundenem **U09** und die Komplexstruktur von IpgC mit dem Bindungsepitop von IpaB sind in **Abbildung 3.12-6** überlagert dargestellt. Aminosäuren, die sich in ihrer Lage signifikant unterscheiden, sind TyrB44, TyrB47 und IleB82. Die Seitenkette von TyrB44 ist in der Kristallstruktur mit IpaB-Peptid deutlich weiter nach „oben" rotiert, was zu einer Vergrößerung der darunter befindlichen hydrophoben Tasche führt, in die ein Leucin-Rest des Peptids hineinragt. TyrB47 ist in der Struktur von **U09** deutlich weiter nach „links" verschoben und macht damit Platz für **U09**. Aufgrund dieser Konformationsänderung nimmt auch IleB82 eine abweichende Konformation ein, da ansonsten der Abstand zwischen Hydroxygruppe von TyrB47 und C_{δ}-Atom von IleB82 zu gering wäre. **U09** benötigt in horizontaler Richtung mehr Platz innerhalb der hydrophoben Tasche, wohingegen das IpaB-Peptid in vertikaler Richtung mehr Raum beansprucht. **U09** lagert sich im Vergleich zum IpaB-Peptid deutlich enger an das Protein an, was daran zu erkennen ist, dass **U09** in einer durch drei Aminosäuren des Peptids (Sequenz: PEL) ausgebildeten Furche lokalisiert ist.

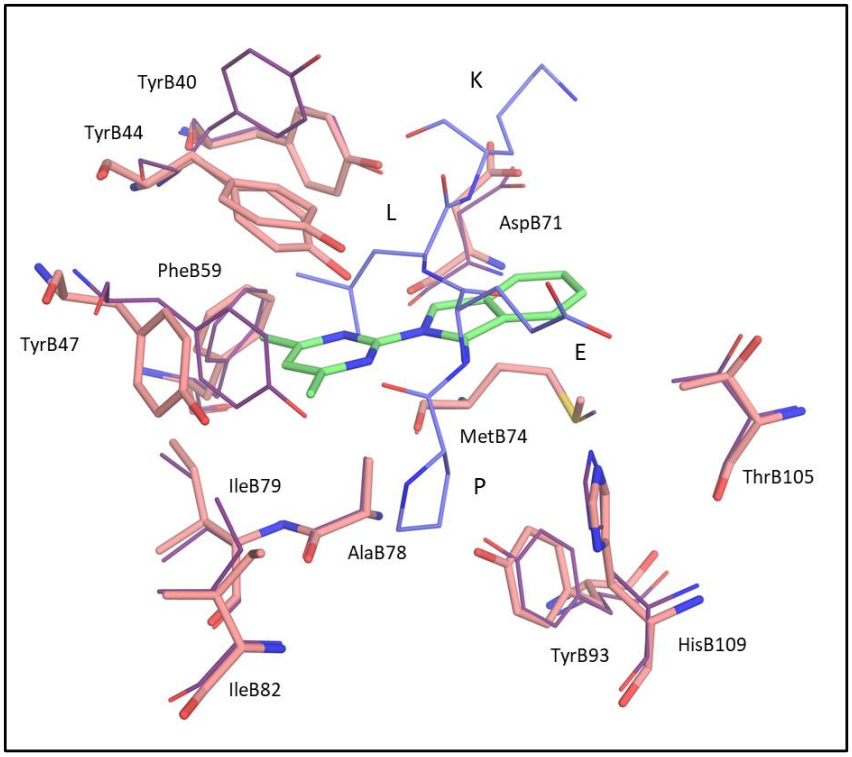


Abbildung 3.12-6: Überlagerung der IpgC-Struktur im Komplex mit U09 (PDB-Code: 7p42) und der Komplexstruktur von IpgC mit dem Bindungsepitop von IpaB (PDB-Code: 3gz1). *Die Aminosäuren (C-Atome der Kette B sind rosa (PDB-Code: 7p42) bzw. violett (PDB-Code: 3gz1[37])) sind als Stäbchenmodelle gezeigt, ebenso* ***U09*** *(C-Atome: grün) und das IpaB-Peptid (C-Atome: lila, Aminosäuren mit Einbuchstabencode benannt). Die Stäbchen der Komplexstruktur von IpgC mit dem Bindungsepitop von IpaB besitzen einen geringeren Stäbchenradius. N-Atome sind blau, O-Atome rot und S-Atome gelb.*

3.12.5. Ist U08 ebenfalls ein *Follow-up-Hit*?

Bei *Follow-up*-Verbindung **U08** könnte es sich ebenfalls um einen *Hit* handeln. Allerdings ist diese Struktur („mlu32“) letztendlich aufgrund einer unzureichenden Differenzelektronendichte nach dem *Autorefine* (siehe **Abbildung 3.12-7 a**) nicht deponiert worden. Im Folgenden soll die Differenzelektronendichte in *Interface*-Tasche 1 näher betrachtet werden.

In **Abbildung 3.12-7 a** ist die entscheidende F_o-F_c-Differenzelektronendichte nach dem *Autorefine* mit nachträglich eingebauter *Follow-up*-Verbindung **U08** dargestellt. Es ist klar zu erkennen, dass zur eindeutigen Identifizierung von **U08** die Elektronendichte für zwei Kohlenstoffe des Isoindol-Grundgerüsts und den exocyclischen Sauerstoff fehlt. In **Abbildung 3.12-7 b** ist die F_o-F_c-Differenzelektronendichte der *Blank*-Struktur vor dem Einbau des dort vorhandenen DMSO-Moleküls und zusätzlicher H_2O-Moleküle gezeigt. Die in der Struktur von „mlu32“ zu beobachtende Elektronendichte ist im Vergleich dazu deutlich umfangreicher.

Zur weiteren Aufklärung wurden zwei H_2O-Moleküle und ein DMSO-Molekül in zwei unterschiedlichen Orientierungen in die Differenzelektronendichte aus **Abbildung 3.12-7 a** eingebaut. Dies entspricht genau der Konstellation, die in der *Blank*-Struktur vorgefunden wird. Die entsprechende Elektronendichte nach erfolgter Verfeinerung ist in **Abbildung 3.12-7 c** dargestellt. Die dort verbleibende F_o-F_c-Differenzelektronendichte kann durch ein eventuell gleichzeitig bindendes **U08**-Molekül erklärt werden. Im hinteren Bereich der Bindetasche (in **Abbildung 3.12-7 c** links) ist zusätzliche Differenzelektronendichte, die durch das Cl-Atom von **U08** erklärt werden könnte. Weiterhin existiert zwischen dem DMSO-Molekül und den H_2O-Molekülen Differenzelektronendichte, die durch zwei Kohlenstoffe des Isoindol-Grundgerüsts entstanden sein könnte.

Darüber hinaus wurde in die Differenzelektronendichte aus **Abbildung 3.12-7 a** die Verbindung **U08** mit einer Besetzung von 100 % eingebaut und verfeinert. Die nach der Verfeinerung bestehende $2F_o$-F_c- und F_o-F_c-Elektronendichte ist in **Abbildung 3.12-7 d** dargestellt. In diesem Fall kann ebenfalls weitere Differenzelektronendichte beobachtet werden. Diese könnte sehr gut durch das gleichzeitige Vorhandensein eines DMSO-Moleküls in zwei unterschiedlichen Orientierungen und durch die Anwesenheit eines H_2O-Moleküls beschrieben werden. An Position des Cl-Atoms ist negative Elektronendichte zu erkennen (als rotes Netz dargestellt). Dies liegt daran, dass die Besetzung von **U08** nicht verfeinert, sondern auf 100 % gesetzt wurde.

Durch ein paralleles Vorliegen eines DMSO-Moleküls sollte die partielle Besetzung von **U08** jedoch deutlich geringer sein. Um dies zu berücksichtigen, wurde die Besetzung von **U08** zusammen mit der des DMSO-Moleküls verfeinert. In **Abbildung 3.12-7 e** und **f** ist die daraus resultierende Elektronendichte aus zwei verschiedenen Blickrichtungen dargestellt. Die Besetzung von **U08** beträgt hier 46 %, die Besetzung der beiden DMSO-Moleküle jeweils 27 %. Zu erkennen ist, dass an Position des Cl-Atoms keine negative Elektronendichte mehr vorhanden ist. An Position des Isoindol-Stickstoffs deutet zusätzliche Differenzelektronendichte auf das dort noch nicht eingebaute, jedoch in der *Blank*-Struktur vorhandene H_2O-Molekül hin. Werden die *B*-Werte von **U08** und die der beiden DMSO-Moleküle (siehe Anhang, **Tabelle 6.5-1**) betrachtet, fällt lediglich der hohe *B*-Wert des Sauerstoffs von **U08** mit 80.3 Å² auf, was mit der für dieses Atom fehlenden Elektronendichte korreliert. Der mittlere *B*-Wert des gesamten Liganden beträgt lediglich 35.8 Å².

Zuletzt wurde noch mithilfe einer anomalen Dichtekarte überprüft, ob an Position des Cl-Atoms ein anomales Signal beobachtet werden kann. Dies war tatsächlich der Fall. Doch die anfängliche Differenzelektronendichte zusammen mit der durchgeführten Verfeinerung von **U08** ließ keine zweifelsfreie Platzierung des Liganden zu, obwohl eine teilweise Besetzung auch nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Das ist letztlich der Grund dafür, warum die Struktur nicht deponiert wurde.

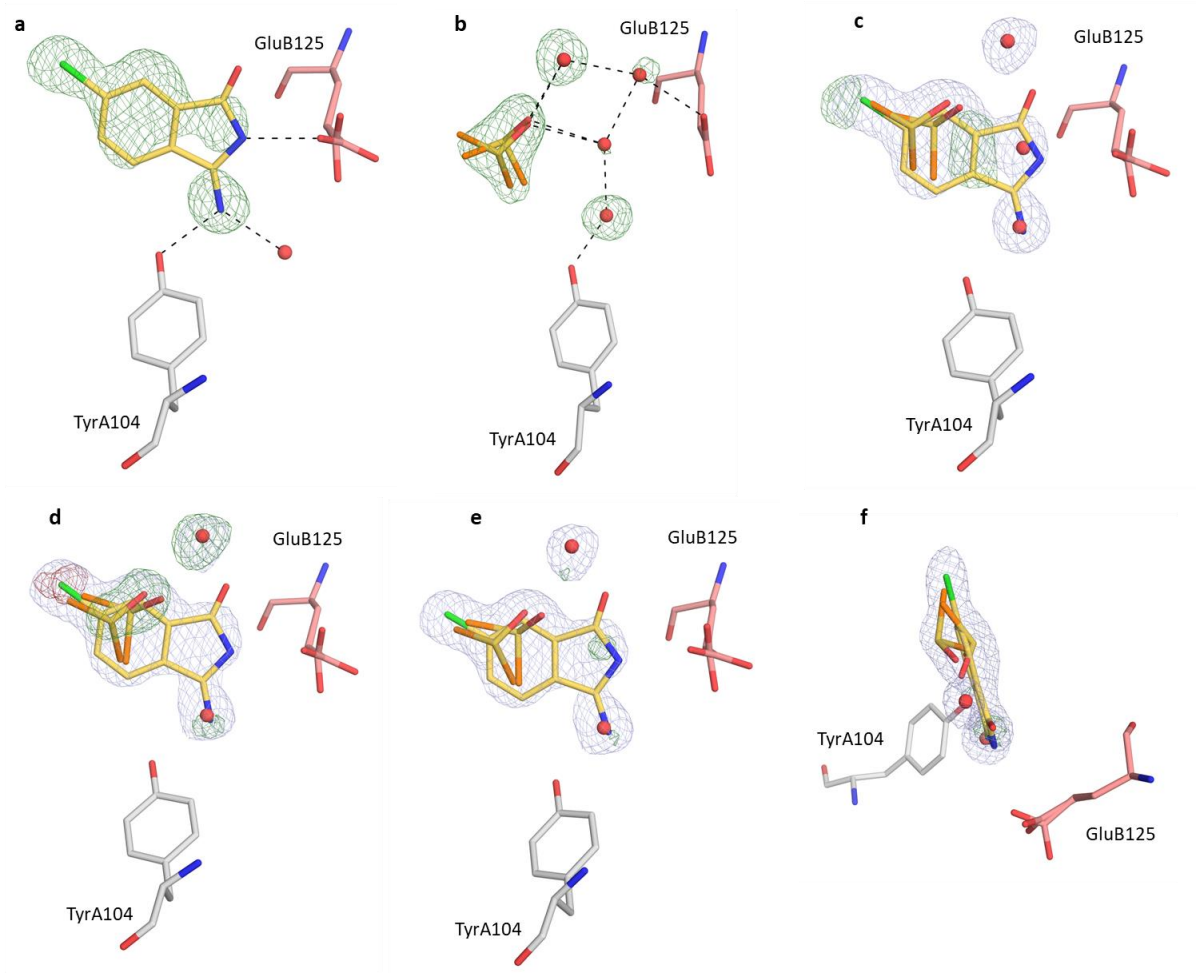


Abbildung 3.12-7: Darstellung der in* Interface-*Tasche 1 von Struktur „mlu32" vorhandenen Elektronendichte (nicht deponiert) und Vergleich mit der in der* Blank-*Struktur vorhandenen Elektronendichte (PDB-Code: 7pef). *TyrA104 (C-Atome: grau), GluB125 (C-Atome: rosa) und* ***U08*** *(C-Atome: gold) sind als Stäbchenmodelle gezeigt. Das DMSO-Molekül (C-Atome: orange, zwei unterschiedliche Orientierungen) ist ebenfalls als Stäbchenmodell gezeigt. Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt. O-Atome sind rot, N-Atome blau, S-Atome gelb und Cl-Atome grün. Die 2F_o-F_c-Elektronendichte ist bei 1.0 σ als hellblaues Netz und die F_o-F_c-Differenzelektronendichte bei 3.0 σ als grünes bzw. bei -3.0 σ als rotes Netz gezeigt.* ***a****: Darstellung der Differenzelektronendichte in* Interface-*Tasche 1 von Struktur „mlu32" nach dem Autorefine.* ***U08*** *ist nachträglich eingebaut worden. Denkbare H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt.* ***b****: Darstellung der Differenzelektronendichte in* Interface-*Tasche 1 der* Blank-*Struktur (PDB-Code: 7pef) zum Vergleich. Das DMSO-Molekül und vier H_2O-Moleküle sind nachträglich eingebaut worden. Denkbare H-Brücken sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt.* ***c****: Darstellung der Elektronendichte nach Einbau und Verfeinerung von DMSO-Molekül und drei Wassermolekülen (alle Besetzungen: 100 %).* ***U08*** *ist nachträglich eingebaut worden.* ***d****: Darstellung der Elektronendichte nach Einbau und Verfeinerung von* ***U08*** *(Besetzung: 100 %). Das DMSO-Molekül und zwei H_2O-Moleküle sind nachträglich eingebaut worden.* ***e*** *und* ***f****: Darstellung der Elektronendichte nach Einbau und Verfeinerung von* ***U08****, dem DMSO-Molekül und zwei H_2O-Molekülen aus zwei unterschiedlichen Blickrichtungen (Besetzung von* ***U08****: 46 %, Besetzung des DMSO-Moleküls: Orientierung A und B jeweils 27 %, Besetzung der H_2O-Moleküle: 54 %).*

3.12.6. Bindungsmodus von U08 und Überlagerung mit J2 und der entsprechenden *Docking*-Pose

Trotz nicht eindeutig zuweisbarer Differenzelektronendichte für diese *Follow-up*-Verbindung soll der vermeintliche Bindungsmodus mit der *Docking*-Pose verglichen werden. Dazu soll zunächst einmal der in der Kristallstruktur vorliegende Bindungsmodus betrachtet werden. Der Bindungsmodus von **U08** ist in **Abbildung 3.12-8 a** dargestellt. Über seinen Imin-Stickstoff bildet **U08** eine direkte H-Brücke mit TyrA104 aus. Eine weitere H-Brücke ausgehend vom Imin-Stickstoff besteht zu einem nahegelegenen H_2O-Molekül. Der Isoindol-Stickstoff kann aufgrund der Amin-Enamin-Tautomerie ebenfalls als H-Brücken-Donor fungieren. Im vorliegenden Fall besteht zwischen diesem Stickstoff und der Carboxygruppe von GluB125 eine H-Brücke.

Durch das *Docking* wurde für diese Verbindung eine andere Platzierung in *Interface*-Tasche 1 vorgeschlagen. Vorausgesagt wurde, dass der Carbonyl-Sauerstoff mit TyrA104 in Wechselwirkung tritt (siehe **Abbildung 3.12-8 b**). Ohne das Vorhandensein des Cl-Atoms wäre die Unterscheidung zwischen Carbonyl-Sauerstoff und Imin-Stickstoff anhand der Elektronendichte wahrscheinlich schwierig geworden. Doch die für das Cl-Atom vorhandene Elektronendichte deutet klar darauf hin, dass in der Kristallstruktur der Imin-Stickstoff mit TyrA104 interagiert.

Mitverantwortlich dafür könnte sein, dass für das *Docking* die Seitenkette von GluB125 ganz nach außen gedreht wurde, um den Eingang der Bindetasche für größere Liganden freizulegen. In der Kristallstruktur verschließt jedoch diese Seitenkette den Eingang der Bindetasche und kann so mit **U08** interagieren. Hier stellt sich die Frage, warum Verbindung **8** nicht einem *Docking*-Lauf entdeckt wurde, bei dem sich GluB125 in geschlossener Konformation befand. Hier wäre jedoch der Abstand zwischen Ligand und Seitenkette wahrscheinlich zu gering gewesen, denn die in der Kristallstruktur von **J2** vorliegende geschlossene Konformation ist nicht identisch zu der geschlossenen Konformation in der hier beschriebenen Struktur (siehe **Abbildung 3.12-8 c**).

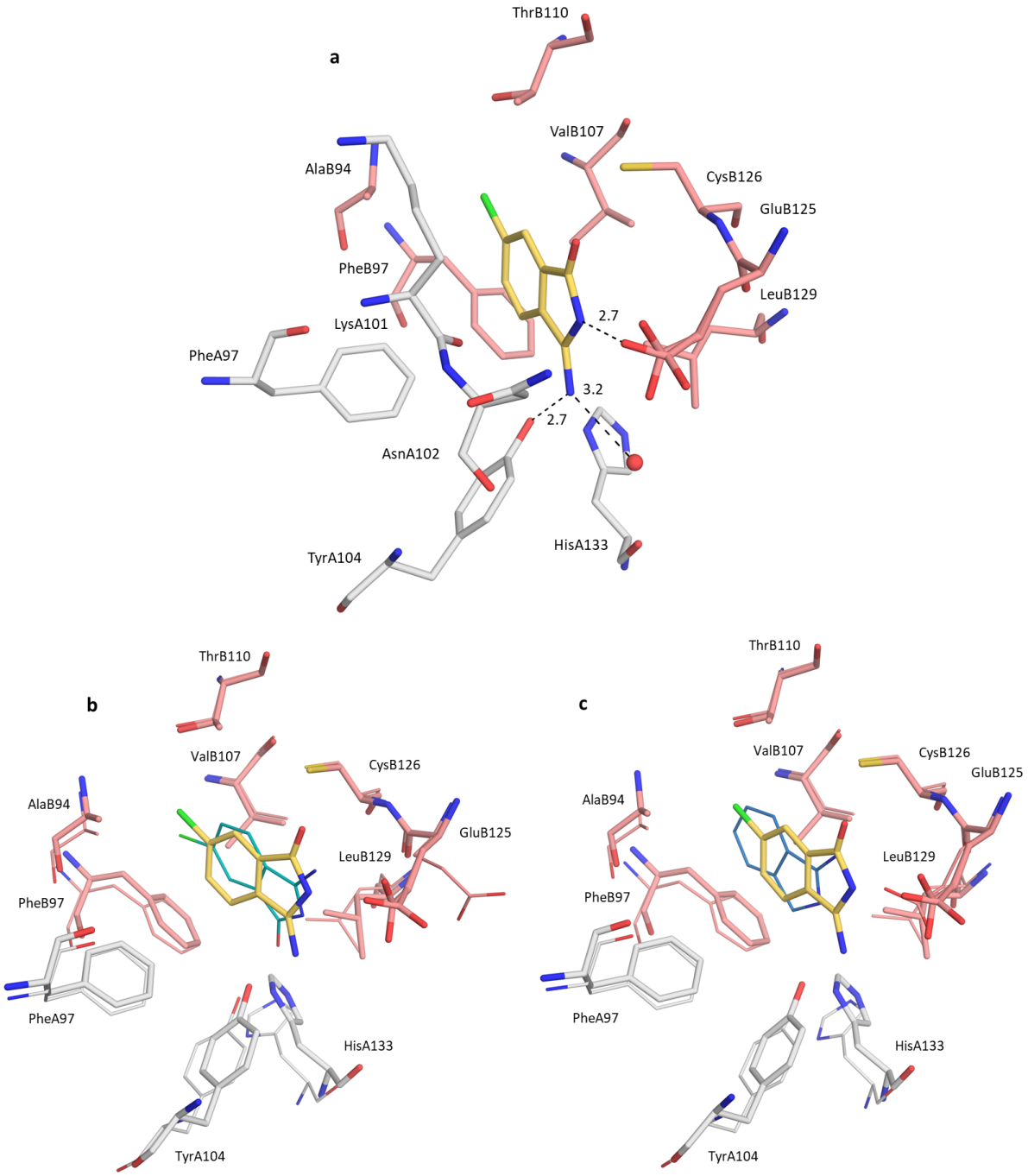


***Abbildung 3.12-8: Potentieller Bindungsmodus von U08 und Vergleich mit entsprechender* Docking-*Pose und Bindungsposition von J2 (PDB-Code: 7ayw). a**: Potentieller Bindungsmodus von **U08**. **b**: Überlagerung mit entsprechender* Docking-*Pose. **c**: Überlagerung mit **J2**. Aminosäuren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. Dabei sind C-Atome der Kette A grau und C-Atome der Kette B rosa. N-Atome sind blau, O-Atome rot, S-Atome gelb und Cl-Atome grün. **U08** (C-Atome: gold), Verbindung **8** (C-Atome: mint) und **J2** (C-Atome: mittelblau) sind ebenfalls als Stäbchenmodelle dargestellt. Die Stäbchen der überlagerten Strukturen besitzen einen geringeren Stäbchenradius. Bei der Strukturüberlagerung in* PyMOL *wurde nur Kette B berücksichtigt.*

3.12.7. Diskussion

Von den 17 ausgewählten *Follow-up*-Verbindungen konnten zwei Verbindungen eindeutig und ein weiteres Molekül möglicherweise kristallographisch bestätigt werden. Zwei Verbindungen befinden sich dort, wo ihre Bindung durch das *Docking* vorhergesagt wurde. Von zwei der 17 Verbindungen konnte innerhalb dieser Arbeit keine Komplexstruktur erhalten werden, da die entsprechenden Kristalle ein unzureichendes Streuvermögen besaßen (siehe **Kapitel 5.7.4**, **Tabelle 5.7-2**). Damit wurde bezüglich der *Follow-up*-Verbindungen eine *Hit*-Rate von 13.3 % (2 von 15) erzielt.

Follow-up-Hit **U11**

U11 ist eine der beiden Verbindungen, die eindeutig in der Elektronendichte zu erkennen waren. Mit **U11** wurde zunächst einmal der Bindungsmodus von **J20** bestätigt. **Abbildung 3.12-9** zeigt, inwieweit **J20** und **U11** den in *Interface*-Tasche 1 zur Verfügung stehenden Raum ausfüllen. Durch den Austausch des Pyrrolidinrings durch einen *para*-Chlorphenylring konnte der zusätzlich vorhandene Platz im hinteren Bereich der hydrophoben Bindetasche optimal ausgefüllt werden. Das Cl-Atom zeigt genau in die im oberen Bereich der Tasche vorhandene Ausbuchtung.

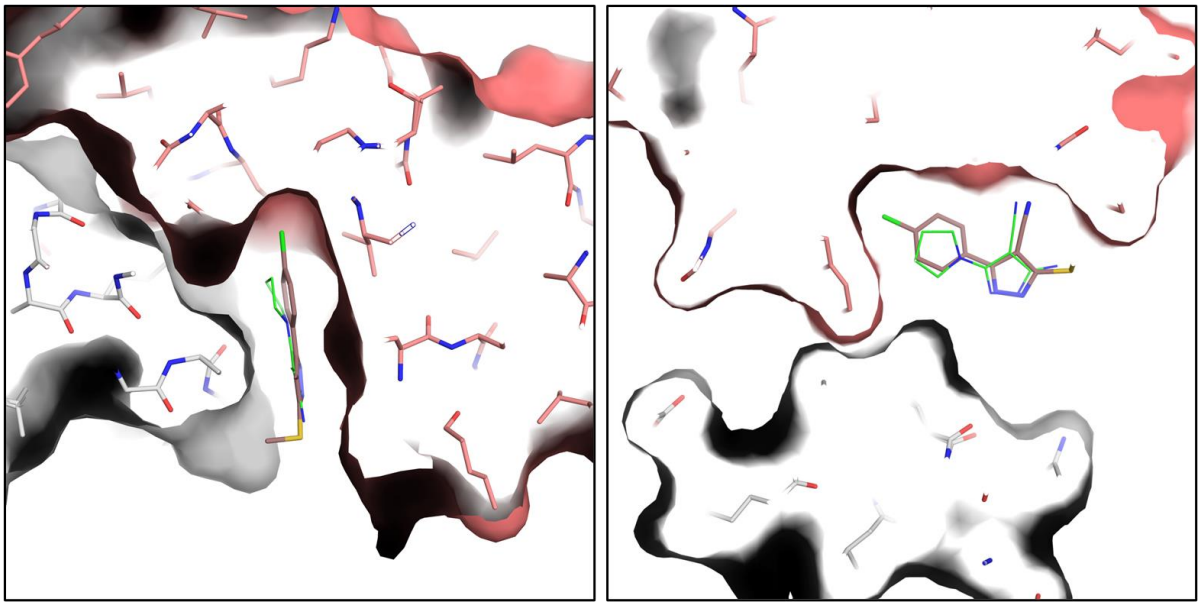


Abbildung 3.12-9: Darstellung des Volumens von* Interface-*Tasche 1 mit U11 und J20 aus zwei verschiedenen Blickrichtungen. *Für diese Darstellung wurde die Oberfläche beider Proteine dargestellt. Zusätzlich sind Aminosäuren als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome der Kette B sind rosa und C-Atome der Kette A grau.* ***U11*** *(C-Atome: braun, Cl-Atom: grün) und* ***J20*** *(C-Atome: grün) sind ebenfalls als Stäbchenmodelle dargestellt. N-Atome sind blau, O-Atome rot und S-Atome gelb.*

Die optimale Ausnutzung des zur Verfügung stehenden Raums wird mit hoher Wahrscheinlichkeit auch zu einer verbesserten Affinität des Moleküls beitragen. Affinitätsdaten konnten innerhalb dieser Arbeit jedoch leider nicht erhalten werden. Zur Bestätigung dieser Vermutung sollen daher die mittels *Contacsym* ermittelten Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand betrachtet werden (siehe **Tabelle 3.12-1**). Aufgrund der sehr hydrophoben Bindetasche beruht die Interaktion überwiegend auf VdW-Wechselwirkungen. Es konnten zwischen **U11** und dem Protein insgesamt 59 VdW-Wechselwirkungen ermittelt werden. Im Vergleich dazu ergaben sich zwischen **J20** und dem Protein nur 40 VdW-Wechselwirkungen. Unter Mitberücksichtigung von anwesenden H_2O-Molekülen ändert sich an dieser Tatsache nur wenig. Werden die beiden Moleküle in Bezug auf ausgebildete H-Brücken miteinander verglichen, schneidet **J20** etwas besser ab, da das Fragment zwei direkte und zwei wasservermittelte H-Brücken ausbildet. **U11** bildet dagegen zwei direkte, jedoch nur eine indirekte H-Brücke aus (vgl. **Kapitel 3.12.1**, **Abbildung 3.12-2**). Dies ist allerdings der Tatsache geschuldet, dass **J20** eine freie Aminogruppe besitzt und **U11** stattdessen eine Methylsulfanylgruppe aufweist. Die Methylsulfanylgruppe stellt keinen H-Brücken-Donor dar und kann daher nicht mit dem Rückgrat-Carbonyl-Sauerstoff von LysB122 interagieren. Die deutliche Erhöhung der Anzahl an ausgebildeten VdW-Wechselwirkungen (von 40 auf 59) zeigt, dass mit **U11** höchstwahrscheinlich ein verbesserter Ligand gefunden werden konnte.

Tabelle 3.12-1: Wechselwirkungen zwischen Protein und J20 bzw. U11 (ermittelt mit* Contacsym[126,127]*).

Ligand	Anzahl an VdW-Wechselwirkungen		Anzahl an H-Brücken	
	ohne H_2O	mit H_2O	ohne H_2O	mit H_2O
J20	40	44	2	4
U11	59	61	2	3

U11 könnte im weiteren Verlauf dieses Projekts als neuer Startpunkt angesehen werden, um erneut nach *Follow-up*-Verbindungen zu suchen, die größer sind und eine verbesserte Affinität aufweisen. Dabei müsste die Verbindung am Pyrazol-Stickstoff erweitert werden. Die mit GluB125 ausgebildete H-Brücke wird dadurch zwangsläufig verloren gehen. Die Methylsulfanyl-Gruppe könnte eventuell wieder durch eine Aminogruppe ausgetauscht werden, um so die verloren gegangene H-Brücke zu kompensieren.

Follow-up-Hit **U09**

Verbindung **U09** wurde an anderer Stelle als das für das *Docking* verwendete Startfragment gefunden. Die Frage, warum diese Verbindung nicht in *Interface*-Tasche 1 gefunden werden konnte, bleibt offen. Es wäre durchaus denkbar, dass dies durch eine Erhöhung der *Soaking*-Zeit eventuell doch noch erzielt werden könnte. Die *Soaking*-Zeit betrug im vorliegenden Fall lediglich 30 min. Erstaunlich ist, dass diese Verbindung trotz geringer *Soaking*-Zeit auf der konkaven Seite der ausgebildeten Superhelix angetroffen wird, obwohl sie keinerlei H-Brücken mit dem Protein eingeht.

Da **U09** genau dort bindet, wo auch IpaB mit IpgC interagiert, sollte sich diese Verbindung hervorragend als Startmolekül bei der Suche nach weiteren *Follow-up*-Verbindungen eignen. Über die Webseite von MolPort können mithilfe der „*substructure based search*“ beispielsweise zwei Verbindungen gefunden werden, die auf **U09** aufbauen und am Imin-Stickstoff einen zusätzlichen Substituenten besitzen. Werden die beiden Methylgruppen am Pyrimidinring für die Suche gelöscht, können sogar zehn Verbindungen gefunden werden. Diese Verbindungen könnten für ein erneutes *Docking* mit *SeeSAR* genutzt werden.

Mit **U09** und **U11** stehen also zwei *Follow-up*-Verbindungen zur Verfügung, die für weitere Designzyklen bestehend aus *in silico-Docking* und Kristallstrukturbestimmung genutzt werden sollten. Neben der Bestimmung der Affinität wäre eine schnelle Klarheit darüber, ob die Verbindungen im *Interface* zu einer Inhibierung der Sekretion bakterieller Proteine führen, von Nutzen. Um dies herauszufinden, müsste ein *Shigella*-Invasions-*Assay* durchgeführt werden. Sollte sich dabei herausstellen, dass eine Inhibierung der Sekretion durch Liganden im *Interface* nicht herbeigeführt werden kann, so bliebe zunächst nur **U09** zur weiteren Entwicklung eines potenten Wirkstoffs.

Warum haben nur zwei der 15 *Follow-up*-Verbindungen gebunden?

Um diese Frage zu klären, sollen zunächst noch einmal die *Follow-up*-Verbindungen betrachtet werden, die aus dem *Docking* mit Fragment-*Hit* **J20** als Startpunkt hervorgegangen waren (vgl. **Kapitel 3.11-2**, **Abbildung 3.11-2**). Mit Ausnahme von Verbindung **16** besitzen alle Verbindungen einen Substituenten am Pyrazol-Stickstoff. Dieser Substituent ragt laut *Docking*-Pose aus der Tasche heraus und interagiert entweder mit AsnA102 oder GluB125 (Ausnahme: Verbindung **3**). Hierbei handelt es sich um zwei sehr flexible Aminosäuren. AsnA102 ist Teil der Schleife, die je nach gebundenem Ligand-Molekül unterschiedliche Konformationen einnimmt. Die Seitenkette von GluB125 wurde für das *Docking* in vielen Fällen nach außen gedreht, um den Eingangsbereich der Tasche für größere Moleküle zugänglich zu machen. Es wurden zwar verschiedene Konformationen für das *Docking* ausgewählt, allerdings konnten nicht alle möglichen Szenarien getestet werden, da dies sowohl enorm viel Zeit als auch Rechenkapazität in Anspruch genommen hätte. Eventuell hätte hier zunächst eine Energieminimierung durchgeführt werden sollen, um energetisch günstige Konformationen der verschiedenen Seitenketten der Bindetasche zu ermitteln. Alternativ hätten auch verschiedene Kristallstrukturen mit unterschiedlichen Seitenkettenkonformationen für das *Docking* genutzt werden können, um so die Flexibilität des Proteins zu simulieren. Anschließend wären Liganden ausgewählt worden, die bei mehr als einer Konformation eine gute *Docking*-Pose einnehmen. In manchen Fällen konnte jedoch aufgrund fehlender Elektronendichte die Konformation der Seitenkette erst gar nicht bestimmt werden.

Verbindung **16** besitzt einen 5-Aminopentyl-Substituenten, der laut Vorhersage im hydrophoben Bereich der Tasche positioniert sein sollte. Mit dieser Verbindung sollte überprüft werden, ob innerhalb der hydrophoben Tasche eventuell eine H-Brücke mit der Hydroxygruppe von ThrB110 ausgebildet werden kann. Diese Verbindung hatte allerdings in der Kristallstruktur nicht gebunden. Es wäre denkbar, dass das Bindungsevent aufgrund eines zu großen Entropieverlusts durch Fixierung des 5-Aminopentyl-Substituenten ausgeblieben ist.

Verbindung **3** – die einzige Verbindung, die laut *Docking*-Pose weder mit AsnA102 noch mit GluB125 interagiert – hatte ebenfalls nicht gebunden. Der Grund dafür ist auf den ersten Blick nicht zu erkennen.

Bezüglich der *Follow-up*-Verbindungen, die auf das Fragment **J2** aufbauen, kann kein Zusammenhang zwischen dem Ausbleiben einer Bindung und der Wechselwirkung mit sehr flexiblen Aminosäuren festgestellt werden. Aber wie zuvor bereits angedeutet, müssen zur Erweiterung des Moleküls die zwischen Fragment und Protein ausgebildeten H-Brücken aufgebrochen werden. Nur in der *Docking*-Pose der Verbindungen **2** und **10** bleibt zumindest die H-Brücke mit GluB125 erhalten. Von Verbindung **2** konnte in dieser Arbeit jedoch keine Komplexstruktur erhalten werden.

Es wurden ebenfalls *Follow-up*-Verbindungen ausgewählt, die aus dem *Docking* mit Fragment-*Hit* **J45** hervorgingen. Allerdings muss hier bedacht werden, dass **J45** in der Kristallstruktur die Schleife bestehend aus den Aminosäuren Gly100-Asn102 teilweise nach außen drückt. Für das *Docking* wurde sowohl die geschlossene als auch die offene Konformation dieser Schleife verwendet. Allerdings ergaben sich nur mit geschlossener Konformation vielversprechende *Docking*-Posen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass **J45** in der Kristallstruktur nur über seine Hydroxygruppe eine direkte H-Brücke mit dem Rückgrat-Carbonyl-Sauerstoff von LysA101 der geschlossenen Konformation eingeht. Zwei weitere, wasservermittelte H-Brücken bestehen im Bereich des Tascheneingangs. Diese gehen – ähnlich wie im Falle von **J2** – bei Erweiterung des Moleküls verloren. **J20** dagegen – ein Fragment, welches in verschiedene Raumrichtungen H-Brücken mit dem Protein ausbildet – scheint ein besserer Startpunkt für die Suche nach *Follow-up*-Verbindungen zu sein. Nichtsdestotrotz wurden einige *Follow-up*-Verbindungen ausgehend von **J45** ausgewählt. Nur im Falle der Verbindungen **5** und **7** bleibt laut Vorhersage die Interaktion mit TyrA104 unverändert bestehen. Es wurden zwei Verbindungen ausgewählt, die laut *Docking*-Pose aus dem „oberen“ Teil der Tasche herausragen (Verbindungen **5** und **6**). In diesem Fall wird eine Interaktion mit den flexiblen Aminosäuren AsnA102 und GluB125 vermieden. Verbindung **5** hatte nicht gebunden. Diese Verbindung hätte ohnehin laut Vorhersage „nur“ zusätzliche VdW-Wechselwirkungen ausbilden sollen. Von Verbindung **6** konnte im Laufe dieser Arbeit keine Komplexstruktur erhalten werden. Dabei soll laut Vorhersage gerade diese Verbindung zusätzliche H-Brücken mit dem Protein ausbilden, wenn auch unter angespannten Torsionswinkeln.

Soaking-Zeit und Löslichkeit der Verbindungen als mögliche Ursache

Neben den möglichen Erklärungen basierend auf der Struktur der Moleküle gibt es weitere denkbare Gründe, warum nur sehr wenige *Follow-up*-Verbindungen gebunden haben. Je größer die Verbindung ist, desto mehr Zeit wird vermutlich benötigt, bis das Molekül seine Position eingenommen hat bzw. bis das Molekül überhaupt durch Lösungsmittelkanäle die Bindetasche erreicht hat. Daher kann es sein, dass die *Soaking*-Zeit, die beim Fragment-*Screening* zum Einsatz kam, hier nicht ausreicht, um eine Komplexstruktur zu erhalten. Es konnten nur für acht der 17 *Follow-up*-Verbindungen messbare Kristalle nach 24 h *Soaking* erhalten werden. Dies gelang nur unter Anwendung einer modifizierten *Soaking*-Methode, bei der sich die Konzentration an *Follow-up*-Verbindung im Tropfen erst einstellen musste (siehe **Kapitel 5.7.4**, **Tabelle 5.7-2**). Es wird angenommen, dass eine *Soaking*-Zeit von 10-60 min unter Anwendung der bewährten Methode in etwa einer *Soaking*-Zeit von 3-3.5 h unter Anwendung der modifizierten *Soaking*-Methode entspricht. Im Falle der Verbindung **11** reichten allerdings 10 min mit der herkömmlichen *Soaking*-Methode nicht aus, um eine Komplexstruktur zu erhalten. Nach 3-3.5 h unter Anwendung der modifizierten Methode konnte das Molekül jedoch in der Kristallstruktur beobachtet werden (siehe **Kapitel 3.12.1**).

Ein weiterer Grund könnte die bei einigen *Follow-up*-Verbindungen beobachtete geringe Löslichkeit sein. Von diesen Verbindungen wurden Suspensionen für das *Soaking* verwendet. Allerdings muss davon ausgegangen werden, dass in diesem Fall die Einstellung des Gleichgewichts deutlich länger dauert, da nur weiterer Feststoff in Lösung übergeht, wenn ein Teil des in Lösung vorhandenen Moleküls in den Kristall eindiffundiert und so dem Gleichgewicht entzogen wird. Die Verbindungen **10**, **13** und **14** stellten sich als besonders schlecht löslich heraus. Diese Verbindungen wurden daher nicht in DMSO, sondern in H_2O gelöst. Dort war die Löslichkeit geringfügig besser. Es konnte zumindest eine 0.5-molare Suspension der *Follow-up*-Verbindungen erzeugt werden.

In zukünftigen Experimenten könnte versucht werden, den Feststoff direkt zum Kristallisationstropfen hinzuzugeben bzw. weitere Kristallstrukturen nach 24 h *Soaking* zu erhalten.

Die Suche nach weiteren *Follow-up*-Verbindungen

Leider ist es im Laufe dieser Arbeit nicht gelungen, einen Liganden zu entwickeln, der die hydrophobe Tasche verlässt und zusätzlich in einer weiteren Subtasche bindet. Eine Verbindung konnte nach dem *Docking* beobachtet werden, die laut Vorhersage optimal in einer Subtasche liegt (siehe **Abbildung 3.12-10**). Allerdings wurde diese Verbindung nicht ausgewählt, da sowohl inter- und intramolekulare Kollisionen als auch Torsionswinkel schlecht bewertet wurden. Diese Subtasche gilt es u.a. in zukünftigen *Dockings* zu adressieren.

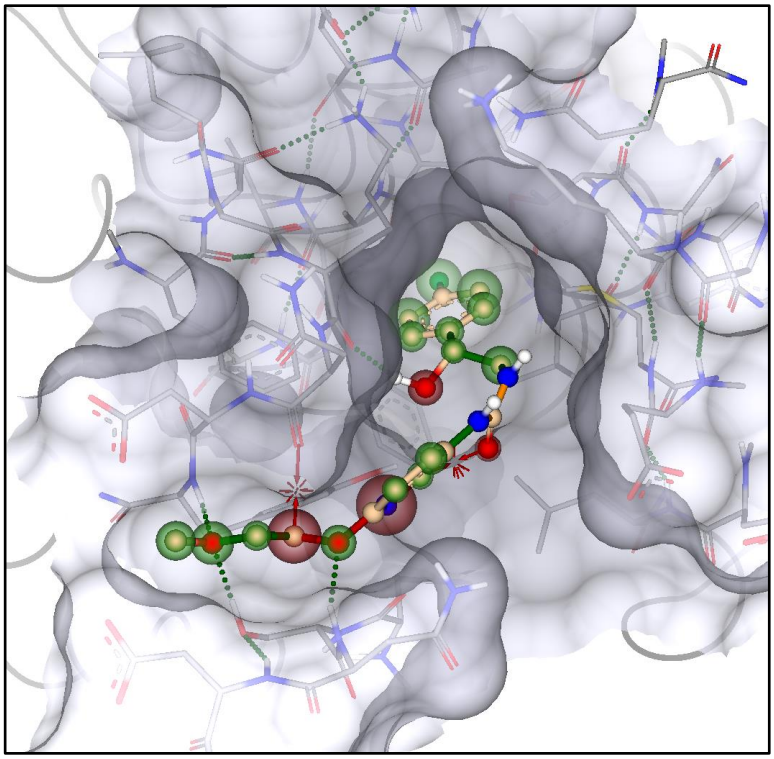


Abbildung 3.12-10: **Docking-*Pose eines für das* Docking *verwendeten Moleküls (MolPort-ID: 019-657-211).*** *Die Oberfläche der Bindetasche ist in Grau dargestellt. Die Aminosäuren der Bindetasche sind als Stäbchenmodelle gezeigt. C-Atome sind grau, N-Atome blau, O-Atome rot, S-Atome gelb und H-Atome weiß. H-Brücken sind als grün gepunktete Linien gezeigt. Das Molekül ist ebenfalls als Stäbchenmodell dargestellt, inklusive der in* SeeSAR *vorgenommenen Bewertungen (Koronas, inter- und intramolekulare Kollisionen und Torsionswinkel (siehe* ***Kapitel 3.11-1****)).*

Um Moleküle zu finden, die ebenfalls in der in **Abbildung 3.12-10** gezeigten Subtasche binden, könnten Verbindungen in das *Docking* mit einbezogen werden, die zwar noch nicht käuflich erworben, allerdings vom Hersteller mit hoher Wahrscheinlichkeit synthetisiert werden können. So würde die Anzahl an möglichen Verbindungen und damit auch die Erfolgswahrscheinlichkeit erhöht. Vielleicht ist es aber auch sinnvoll, zusätzlich zu dem oben genannten Weg zu versuchen, ein optimales Molekül per Hand zu entwerfen. Auch das könnte mit *SeeSAR* erfolgen. Atome oder Atomgruppen können per Mausklick an das jeweilige Fragment angehängt werden. Anschließend können *Docking*-Posen erzeugt und Bindungsaffinitäten

abgeschätzt werden. Das so geplante Molekül müsste jedoch im Anschluss an das *Docking* synthetisiert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, erneut ein Fragment-*Screening* durchzuführen. Dieses Mal könnten jedoch vermehrt Fragmente verwendet werden, die einen ähnlichen Aufbau wie die in **Abbildung 3.12-10** gezeigte 2-Methoxyethoxy-Gruppe besitzen. Die in dieser Arbeit verwendete 96er Fragment-Bibliothek besitzt nur wenige Fragmente, die kein Ringsystem enthalten. Sollte bei einem erneuten Fragment-*Screening* ein *Hit* in dieser Subtasche erzielt werden, könnte dieser *Hit* mit einem der in *Interface*-Tasche 1 gebundenen Fragment-*Hits* verknüpft werden.

4. Zusammenfassung

Die Shigellenruhr ist eine entzündliche Erkrankung des Dickdarms, welche durch die Bakteriengattung *Shigella* ausgelöst wird. Sie tritt vorwiegend in Entwicklungsländern auf und fordert jährlich eine hohe Zahl an Todesopfern. Zur Pathogenitätsentwicklung müssen die Bakterien in die Epithelzellen des Dickdarms eindringen. Dazu verwenden sie ein Typ-III-Sekretionssystem. IpgC – ein Klasse-II-Chaperon – tritt mit einer Vielzahl an relevanten Proteinen in Wechselwirkung und ist somit für den Befall der Epithelzellen essentiell. Im Zentrum dieser Arbeit stand daher die Suche nach einer Leitstruktur zur Inhibierung des für die Ausbildung der *Shigella*-Pathogenität notwendigen Chaperons IpgC.

Das Protokoll zur heterologen Produktion und Reinigung von IpgC wurde aus vorherigen Arbeiten übernommen und geringfügig verändert. Der erste Schritt bestand darin, eine Kristallisationsbedingung für IpgC zu etablieren. Dazu kam zunächst eine am C-Terminus um vier Aminosäuren verkürzte Proteinvariante zum Einsatz. Mit dieser Variante konnte eine Kristallisationsbedingung gefunden werden, welche jedoch Kristalle entstehen ließ, die höchstwahrscheinlich aufgrund ihres sehr hohen Lösungsmittelgehalts ein zu geringes Streuvermögen besaßen. Neben dem Versuch, eine besser kristallisierbare Proteinvariante unter Anwendung des Prinzips der Oberflächenentropiereduktion zu ermitteln, wurde eine weitere, am N-Terminus um zusätzliche neun Aminosäuren verkürzte Variante für Kristallisationsexperimente verwendet. Mit dieser Proteinvariante konnten schließlich Kristalle mit hohem Streuvermögen gezüchtet werden (**Kapitel 3.6**-**3.7**).

Trotz der Tatsache, dass diese Kristalle überwiegend verzwillingt waren, gelang es, die Struktur von IpgC zu bestimmen. Mit einer Auflösung von 1.58 Å wurde die erste hochauflösende Kristallstruktur für IpgC erhalten. Im Vergleich zu den bis dato in der PDB deponierten IpgC-Strukturen konnte neben einer deutlich besseren Auflösung eine bislang noch nicht beobachtete Dimer-Anordnung des Proteins erhalten werden. Dies könnte in Zukunft noch eine wichtige Rolle spielen, denn auch in Lösung liegt IpgC als Dimer vor (**Kapitel 3.8**).

Mit der gefundenen Kristallisationsbedingung war es möglich, ein kristallographisches Fragment-*Screening* unter Verwendung einer hauseigenen Fragment-Bibliothek (96 strukturell verschiedene Fragmente) durchzuführen. Es konnten zehn Fragment-*Hits* identifiziert werden. Diese hatten an insgesamt fünf unterschiedlichen Stellen gebunden. Die meisten

Fragmente hatten in einer Tasche im *Interface* des Dimers (*Interface*-Tasche 1) gebunden (**Kapitel 3.9**).

Im Anschluss an das kristallographische Fragment-*Screening* wurden die 96 Fragmente erneut für die Durchführung eines *Thermal-Shift-Assays* verwendet. Dieses *Assay* hatte zum Ziel, die im kristallographischen Fragment-*Screening* gefundenen *Hits* zu bestätigen. Es konnten jedoch keine Fragmente gefunden werden, die den Schmelzpunkt des Proteins erhöhten, was auf einen stabilisierenden Effekt hingedeutet hätte. Stattdessen wurden 26 Fragmente identifiziert, die den Schmelzpunkt herabsetzten. Darunter befanden sich einige Fragmente, die beim kristallographischen Fragment-*Screening* als *Hit* identifiziert worden waren und im *Interface* des Dimers gebunden hatten. Dies könnte darauf hindeuten, dass einige der im *Interface* gebundenen Fragmente das Dimer durch das Aufbrechen von H-Brücken destabilisieren (**Kapitel 3.10**).

Die im *Interface* vorgefundenen Fragmente wurden als guter Startpunkt zur Entwicklung von Wirkstoffen angesehen. Mittels *in silico-Docking* und unter Verwendung des Programms *SeeSAR* sollten potentielle *Follow-up*-Verbindungen ermittelt werden, die auf den Fragment-*Hits* aufbauen, jedoch eine verbesserte Affinität besitzen. Durch die Verwendung ausschließlich kommerziell erhältlicher Verbindungen konnte eine aufwändige Synthese der Verbindungen vermieden werden. Aufgrund vielversprechender *Docking*-Resultate und aufbauend auf drei Fragment-*Hits* wurden 17 *Follow-up*-Verbindungen ausgewählt (**Kapitel 3.11**).

Anhand von *Soaking*-Experimenten und anschließender Kristallstrukturbestimmung sollten aus diesen 17 *Follow-up*-Verbindungen die Substanzen ermittelt werden, die tatsächlich mit IpgC einen Komplex eingehen. Zwei Verbindungen konnten eindeutig als *Hit* identifiziert werden. Eine weitere Verbindung stellt einen zusätzlichen potentiellen *Hit* dar. Zwei dieser Verbindungen (**U08** und **U11**) hatten – wie vorhergesagt – in *Interface*-Tasche 1 gebunden. Eine dieser beiden Verbindungen (**U11**) bestätigte den bei **J20** beobachteten Bindungsmodus und füllte den hydrophoben Bereich der Bindetasche im Vergleich zu **J20** deutlich besser aus. Die dritte Verbindung (**U09**) nahm wider Erwarten eine vollkommen andere Bindestelle ein. Genau diese Bindestelle ist jedoch von großer Bedeutung. Es handelt sich um die bislang einzige bekannte Bindestelle eines Interaktionspartners, nämlich um eine Bindestelle von IpaB. Mit den *Follow-up*-Verbindungen **U09** und **U11** konnten zwei für zukünftige Experimente bedeutende Liganden ermittelt werden (**Kapitel 3.12**).

Es wurden ebenfalls Experimente mit einigen Interaktionspartnern von IpgC durchgeführt. Spa13 – Bestandteil des Typ-III-Sekretionssystems – sollte in dieser Arbeit kloniert, rekombinant produziert und gereinigt werden, um letztlich sowohl die dreidimensionale Struktur von Spa13 als auch die Struktur des IpgC-Spa13-Komplexes röntgenkristallographisch bestimmen zu können. Es konnte ein Protokoll zur heterologen Produktion und Reinigung von Spa13 etabliert werden. Neben der Produktion als GST-Fusionsprotein wurde Spa13 als MBP-Fusionsprotein produziert. Mithilfe des GST-*Tags* wurde nur unlösliches Protein erhalten. Mithilfe des MBP-*Tags* konnte Spa13 jedoch in löslicher Form produziert und gereinigt werden. Allerdings stellte sich heraus, dass Spa13 in hochaggregierter Form vorlag, wodurch eine vollständige Darstellung erschwert wurde. Aus diesem Grund konnte Spa13 letztendlich nicht vollständig rein und monodispers erhalten werden. Auch der Versuch, Spa13 zusammen mit seinem Interaktionspartner IpgC zu produzieren, führte nicht zum Erfolg (**Kapitel 3.1**).

Um dennoch Informationen über die Interaktion zwischen IpgC und Spa13 zu erhalten, wurde ein Peptid-*Microarray* durchgeführt. Dabei wurden Sequenzabschnitte von Spa13 auf einer Membran fixiert. Der Nachweis der Interaktion dieser Peptide mit IpgC sollte mithilfe geeigneter Antikörper erfolgen. Auf diese Weise sollte das Bindungsepitop von Spa13 ermittelt werden. Die Ergebnisse waren jedoch nicht aufschlussreich. Nur eine der drei Positivkontrollen war tatsächlich erfolgreich. Für zwei der Spa13-Peptide konnte ein sehr schwaches Signal erhalten werden. Diese Peptid-Sequenzen konnten in ersten Versuchen mittels MST jedoch nicht als IpgC-Bindungsepitop bestätigt werden. Dies lag z.T. an der eingeschränkten Löslichkeit der Spa13-Peptide (**Kapitel 3.3**).

Die Bindungsepitope von MxiE und IpaC konnten bereits in vorherigen Arbeiten ermittelt werden. Darauf aufbauend wurde in dieser Arbeit versucht, die Struktur von IpgC mit den Bindungsepitopen von MxiE und IpaC zu ermitteln. Dazu wurden Kokristallisationsexperimente durchgeführt. Im Falle der Kokristallisation von IpgC mit dem MxiE-Peptid stellte sich jedoch nach Erhalt ausreichend streuender Kristalle mehrfach heraus, dass das Peptid nicht gebunden hatte. Die Kokristallisation von IpgC mit dem IpaC-Peptid gelang mithilfe der für IpaB bekannten Kokristallisationsbedingung. Hier konnte zwar ein Datensatz bis zu einer Auflösung von 2.62 Å gesammelt werden, mit diesem gelang jedoch aus bislang ungeklärten Gründen die Strukturbestimmung nicht (**Kapitel 3.5**).

5. Material und Methoden

5.1. Materialien

5.1.1. Laborgeräte

Tabelle 5.1-1: Verwendete Laborgeräte.

Gerät	Hersteller
ÄKTAprime™ plus	GE HEALTHCARE
Analysenwaage SBC 32	SCALTEC
Autoklav T-Line	FEDEGARI
ChemiDoc™ Imaging System	BIO-RAD
Elektrophorese-Kammer	BIO-RAD
EmulsiFlex-C5	AVESTIN
MAR345 Image Plate Detektor mit Iμ-S Mikrofokusröhre	MAR-INCOATEC
Mikroskop SZ-60	OLYMPUS
CP2P Mikrowaage	SARTORIUS
MiniCycler	MJ RESEARCH
Monolith NT.115	NANOTEMPER
Nanodrop™ 2000c	THERMO SCIENTIFIC
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR BIOSCIENCES
Peristaltikpumpe P-1	GE HEALTHCARE
913 pH-Meter	METROHM
Präzisionswaage PCB 3500-2	KERN
Real-Time PCR System QuantStudio™ 3	THERMO FISHER SCIENTIFIC
Schüttler Innova 4200	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
Schüttler Innova 4230	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
Sonifier™ 250	BRANSON
Thermomixer Comfort 2 mL	EPPENDORF
Trans-Blot® Turbo	BIO-RAD
Zentrifuge Avanti™ J-25	BECKMAN COULTER
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	HERAEUS
Zentrifuge 1-14K	SIGMA

5.1.2. Chemikalien

Tabelle 5.1-2: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
N-(2-Acetamido)iminodiessigsäure (ADA)	CARL ROTH
Agar-Agar	CARL ROTH
Agarose, SeaKem®	LONZA
Ammoniumformat	RIEDEL DE HAËN
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	CARL ROTH
Ammoniumsulfat	CARL ROTH
Ampicillin Natriumsalz	CARL ROTH
BICIN	FLUKA
BIS-TRIS	CARL ROTH
Bromphenolblau	MERCK
Calciumchlorid	CARL ROTH
Chloramphenicol	CARL ROTH
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	CARL ROTH
Coomassie® Brillant Blau R250	CARL ROTH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ACROS ORGANICS
Dinatriumhydrogenphosphat	CARL ROTH
Dithiothreitol (DTT)	CARL ROTH
Essigsäure	CARL ROTH
Ethanol	CARL ROTH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	MERCK
Ethylenglykol	CARL ROTH
Glutathion (reduziert, GSH)	CARL ROTH
Glycerol	CARL ROTH
Glycin	CARL ROTH
Guanidin-HCl	CARL ROTH
Hefeextrakt	CARL ROTH
HEPES, PUFFERAN®	CARL ROTH
1,6-Hexandiol, 5 M	JENA BIOSCIENCE
Imidazol	CARL ROTH
Isopropyl-β-D-galactopyranosid (IPTG)	CARL ROTH
Kaliumchlorid	MERCK
Kaliumdihydrogenphosphat	CARL ROTH
Lithiumsulfat-Monohydrat	ACROS ORGANICS
Lithiumsulfat, 2.7 M	QIAGEN
Lysozym	CARL ROTH
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	CARL ROTH
Magnesiumnitrat-Hexahydrat	FLUKA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MERCK
D-Maltose-Monohydrat	CARL ROTH
β-Mercaptoethanol	MERCK
MES, PUFFERAN®	CARL ROTH
2-Methylpentan-2,4-diol (MPD)	SIGMA ALDRICH
Milchpulver, fettarm, *blotting grade*	CARL ROTH
MOPS	CARL ROTH
Natriumacetat, *pH* 4.6, 1 M	JENA BIOSCIENCE
Natriumbromid	MERCK
Natriumchlorid	FISHER SCIENTIFIC
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Pellets	CARL ROTH
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung, 10 %	INVITROGEN
Natriumfluorid	CARL ROTH
Natriumhydroxid	CHEMSOLUTE
Natriumkaliumtartrat-Tetrahydrat	GRÜSSING
Natriumkaliumtartrat, 2 M	QIAGEN

Chemikalien	Hersteller
PEG 2000	CARL ROTH
PEG 3350	CARL ROTH
PEG 4000	CARL ROTH
PEG 8000	CARL ROTH
PEG 20000	FLUKA
PEG 550-Monomethylether	MERCK
Roti®-Blue 5x	CARL ROTH
Rotiphorese® Gel 30	CARL ROTH
Rotiphorese 10x SDS-PAGE	CARL ROTH
D(+)-Saccharose	CARL ROTH
SYBR™ Safe DNA gel stain	INVITROGEN
SYPRO™ Orange protein gel stain	INVITROGEN
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	CARL ROTH
Thrombin	CSL BEHRING
Trinatriumcitrat-Dihydrat	CARL ROTH
TRIS, PUFFERAN®	CARL ROTH
TRIS *pH* 7.0, 1 M	QIAGEN
TRIS-HCl, PUFFERAN®	CARL ROTH
Trypton/Pepton	CARL ROTH
Tween® 20	CARL ROTH
Wasser, doppelt-destilliert	CARL ROTH
X-TEW	JENA BIOSCIENCE

5.1.3. Puffer und Lösungen

Tabelle 5.1-3: Verwendete Puffer und Lösungen.

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
Ampicillin-Lösung	100 mg/mL Ampicillin
APS-Lösung	10 % Ammoniumperoxodisulfat
BIS-TRIS-Puffer (IpgC)	20 mM BIS-TRIS pH 6.0
BIS-TRIS-Elutionspuffer (IpgC)	20 mM BIS-TRIS 1 M NaCl pH 6.0
Blockierungspuffer	5 % Sucrose 4 % Milchpulver in TBS-T-Puffer
Chloramphenicol-Lösung	50 mg/mL Chloramphenicol
Cleavage-Puffer	50 mM TRIS-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT pH 7.0
Coomassie®-Entfärbelösung	10 % (*V*/*V*) Essigsäure 40 % (*V*/*V*) Ethanol
Coomassie®-Färbelösung	10 % (*V*/*V*) Essigsäure 40 % (*V*/*V*) Ethanol 0.1 % *Coomassie® Brillant Blau R250*

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
DEAE-Bindepuffer (Spa13)	20 mM TRIS 3 mM DTT pH 7.5
DEAE-Elutionspuffer (Spa13)	20 mM TRIS 1 M NaCl 3 mM DTT pH 7.5
Dextrin-S-Bindepuffer (Spa13)	20 mM TRIS-HCl 200 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT pH 7.4
Dextrin-S-Elutionspuffer (Spa13)	20 mM TRIS-HCl 200 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 10 mM Maltose pH 7.4
GSH-Elutionspuffer	25 mM Glutathion (reduziert) in 1x PBS-Puffer pH 7.3
GSTrap-Elutionspuffer	50 mM TRIS-HCl 10 mM Glutathion (reduziert) 5 mM DTT pH 8.0
Guanidin-HCl-Lösung	6 M Guanidin-HCl
Hochsalzpuffer	20 mM TRIS 1 M NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT pH 7.4
IPTG-Lösung	1 M IPTG
Nickel-Bindepuffer	20 mM TRIS 500 mM NaCl pH 8.0
Nickel-Elutionspuffer	16 mM TRIS 400 mM NaCl 200 mM Imidazol pH 8.0
PBS-Puffer (1x)	140 mM NaCl 2.8 mM KCl 10 mM Na_2HPO_4 1.7 mM KH_2PO_4 5 mM DTT pH 7.3
Phenyl-S-Puffer-A	0.1 M TRIS 1.5 M NaCl pH 8.0
Phenyl-S-Puffer-B	0.1 M TRIS pH 8.0

Pufferbezeichnung	**Zusammensetzung**
PreScission-Lagerpuffer	50 mM TRIS-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 5 % (*V*/*V*) Glycerol pH 7.5
PreScission-Puffer	50 mM TRIS-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT pH 7.5
Roti®-Blue-Entfärbelösung	25 % (*V*/*V*) Ethanol
Roti®-Blue-Färbelösung	20 % (*V*/*V*) *Roti®-Blue 5x*
Sammelgel-Puffer	1 M TRIS pH 6.8
SEC-Puffer (IpgC)	10 mM HEPES 150 mM NaCl pH 7.5
SDS-Probenpuffer (4x)	250 mM TRIS 200 mM DTT 0.04 % Bromphenolblau 8 % SDS 40 % (*V*/*V*) Glycerol pH 6.0
TAE-Puffer (1x)	40 mM TRIS 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8.0
TBS-Puffer (1x)	50 mM TRIS 27 mM KCl 136 mM NaCl pH 8.0
TBS-T-Puffer (1x)	50 mM TRIS 27 mM KCl 136 mM NaCl 0.05 % (*V*/*V*) *Tween® 20* pH 8.0
Transfer-Puffer	10 % (*V*/*V*) Ethanol 1.92 mM Glycin 2.48 mM TRIS
Trenngel-Puffer	1 M TRIS pH 8.8
TSA-Puffer	50 mM HEPES 150 mM NaCl pH 7.5

5.1.4. Medien

Tabelle 5.1-4: Verwendete Medien.

Medium	Zusammensetzung
LB-Agar	LB-Medium +1.5 % Agar-Agar
LB-Medium	0.5 % Hefeextrakt 1.0 % Trypton 1.0 % NaCl
Super-LB-Medium	1.5 % Hefeextrakt 2.5 % Trypton 0.5 % NaCl

5.1.5. Verbrauchsmaterial

Tabelle 5.1-5: Verbrauchsmaterial sortiert nach Einsatzgebiet.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cryschem 24 Well Crystallization Plates	HAMPTON RESEARCH
VDX 24 Well Crystallization Plates without sealant	HAMPTON RESEARCH
Crystal Clear Sealing Tape (Shark-Tape)	HAMPTON RESEARCH
Silikonpaste Korasilon mittelviskos	KURT OBERMEIER GMBH
Deckgläser, Durchmesser 22 mm	THERMO FISHER SCIENTIFIC
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL	THERMO FISHER SCIENTIFIC
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	THERMO FISHER SCIENTIFIC
Blottingpapier GB 002 (Whatman® 3 mm)	WHATMAN
Nitrozellulose Transfer Membran PROTRAN®, 0.45 µm	WHATMAN
PVDF-Membran, Immobilon™ P, 0.45 µm	MILLIPORE
Nalgene™ Rapid-Flow™ Bottle Top Filter 0.2 µm	THERMO FISHER SCIENTIFIC
ZelluTrans Dialysemembran MWCO 12000-14000	CARL ROTH
ZelluTrans Dialysemembran MWCO 6000-8000	CARL ROTH
Vivaspin® 20 MWCO 5.000	SARTORIUS
Vivaspin® 20 MWCO 10.000	SARTORIUS
Vivaspin® 20 MWCO 30.000	SARTORIUS
Spritzenfilter Rotilabo® 0.22 µm, steril	CARL ROTH
Spritzenfilter Rotilabo® 0.45 µm, steril	CARL ROTH
Spritzenfilter Rotilabo® 0.8 µm, unsteril	CARL ROTH
Küvetten	SARSTEDT

5.1.6. Primer

Tabelle 5.1-6: Verwendete Primer.

Oligoname	Sequenz (5‘ → 3‘)
pGEX-spa13-pMAL-for	AGTCGAGCTCGCTGGAAGTTCTGTCCAGGGG
pGEX-spa13-pMAL-back	GTGCGGATCCTTACCGAATCCCGTATTTC
IpgC0,-4S_pETDuet_forward	GTGGATATCGTCCCCTATACTAGGTTATTGG
IpgC0,-4S_pETDuet_back	GGTTAATTAAGCTTACTGAATTGCGTCCAAG
spa13_pETDuet_forward	CCGAATTCGCTGGAAGTTCTGTTCCAG
pETDuet_spa13_backward_2	GGCGGCCGCTTAGCGAATGCCATATTTC
pMAL-back (Sequenzierprimer)	TGTCCTACTCAGGAGAGCGTTCAC
T7_term_2 (Sequenzierprimer)	CAAGGGGTTATGCTAGTTATTGC
IpgC-9,-4S_K122A_K124A_E125A_for	GAAAGCCCCCTTAGCAGCTGCAGCGTGCTTCGAACTCG
IpgC-9,-4S_K122A_K124A_E125A_rev	CGAGTTCGAAGCACGCTGCAGCTGCTAAGGGGGCTTTC

5.1.7. Kits

Tabelle 5.1-7: Verwendete Kits.

Kits	Hersteller
Phusion High-Fidelity PCR Kit	THERMO FISHER SCIENTIFIC
PureYield™ Plasmid Miniprep System	PROMEGA
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	AGILENT TECHNOLOGIES
SuperSignal™ Femto Maximum Sensitivity Substrate	THERMO FISHER SCIENTIFIC
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	PROMEGA

5.1.8. Enzyme, Proteine, Molekular-Standards & Co

Tabelle 5.1-8: Verwendete Enzyme, Proteine, Molekular-Standards & Co.

Enzym/Protein/Molekular-Standard	Hersteller
DNA Gel Loading Dye (6x)	THERMO FISHER SCIENTIFIC
Endonuklease *Nde*I FD	THERMO FISHER SCIENTIFIC
Endonuklease *Bam*HI	THERMO FISHER SCIENTIFIC
Endonuklease *Sac*I	THERMO FISHER SCIENTIFIC
Endonuklease *Eco*RV FD	THERMO FISHER SCIENTIFIC
Endonuklease *Pac*I FD	THERMO FISHER SCIENTIFIC
Endonuklease *Eco*RI FD	THERMO FISHER SCIENTIFIC
Endonuklease *Not*I FD	THERMO FISHER SCIENTIFIC
FastRuler™ Low range DNA Ladder, ready-to-use	THERMO FISHER SCIENTIFIC
FastRuler™ Middle range DNA Ladder, ready-to-use	THERMO FISHER SCIENTIFIC
FastRuler™ High range DNA Ladder, ready-to-use	THERMO FISHER SCIENTIFIC
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	THERMO FISHER SCIENTIFIC
Nuklease-freies Wasser	THERMO FISHER SCIENTIFIC
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	THERMO FISHER SCIENTIFIC
T4 DNA-Ligase (5 U/µl)	THERMO FISHER SCIENTIFIC

5.1.9. Bakterienstämme

Tabelle 5.1-9: Verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Hersteller
BL21-Gold (DE3)	STRATAGENE
BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL	STRATAGENE
BL21 (DE3) pLysS	STRATAGENE
ONE Shot™ TOP10	INVITROGEN
XL2-Blue	STRATAGENE

5.1.10. Vektoren

Tabelle 5.1-10: Verwendete Vektoren.

Vektor	Hersteller
pETDuet™-1	NOVAGEN
pGEX-6P-mod	GRIMM[93]
pMAL™-c5X	NEW ENGLAND BIOLABS

5.1.11. Säulen

Tabelle 5.1-11: Verwendete Säulen.

Säule	Hersteller
Dextrin Sepharose™ HP	GE HEALTHCARE
GSTrap™ FF 5 mL-Säule	GE HEALTHCARE
HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade	AMERSHAM BIOSCIENCES
HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade	AMERSHAM BIOSCIENCES
HiPrep™ Phenyl HP 16/10	GE HEALTHCARE
HisTrap™ HP 5 mL	GE HEALTHCARE
HiTrap™ DEAE FF 5 mL	GE HEALTHCARE
HiTrap™ SP HP 5 mL	GE HEALTHCARE
mit Glutathion-Sepharose® 4 FF gefüllte XK16/20-Säule	PHARMACIA BIOTECH
mit Sephadex™ G-25 gefüllte XK16/40-Säule	PHARMACIA BIOTECH

5.1.12. Antikörper

Tabelle 5.1-12: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Hersteller
GST Polyclonal Antibody, Host Species: Rabbit	QED BIOSCIENCE
IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	IR-COR BIOSCIENCES
Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobuline HRP	DAKO

5.1.13. Peptide

Tabelle 5.1-13: Im Zusammenhang mit dieser Arbeit synthetisierte Peptide.

Name	Sequenz	Hersteller
IpaB	Ac-LIPELKAPKS-$CONH_2$	AG STEINMETZER, Universität Marburg (UM)
IpaB-G	Ac-LIPE**G**KAPKS-$CONH_2$	
IpaB-A	Ac-LIPE**A**KAPKS-$CONH_2$	
IpaB-S	Ac-LIPE**S**KAPKS-$CONH_2$	
IpaB-I	Ac-LIPE**I**KAPKS-$CONH_2$	
IpaB-N	Ac-LIPE**N**KAPKS-$CONH_2$	
IpaB-D	Ac-LIPE**D**KAPKS-$CONH_2$	
IpaC10.5	Ac-LLKLSEQVQH-$CONH_2$	AG STEINMETZER, UM
IpaC11	Ac-LLKLSEQVQH**D**-$CONH_2$	DANIELA MÜLLER, Technische Hochschule Mittelhessen (THM)
IpaC11	Ac-LLKLSEQVQH**D**-$CONH_2$	AG STEINMETZER, UM
IpaC11	Ac-LLKLSEQVQH**D**-$CONH_2$	GENSCRIPT
MxiE10S	Ac-AEKSIHFYHE-$CONH_2$	AG STEINMETZER, UM
MxiE-A1	Ac-AEKSIHFYHE-$CONH_2$	DANIELA MÜLLER, THM
MxiE-A2	Ac-A**A**KSIHFYHE-$CONH_2$	
MxiE-A3	Ac-AE**A**SIHFYHE-$CONH_2$	
MxiE-A4	Ac-AEK**A**IHFYHE-$CONH_2$	
MxiE-A5	Ac-AEKS**A**HFYHE-$CONH_2$	
MxiE-A6	Ac-AEKSI**A**FYHE-$CONH_2$	
MxiE-A7	Ac-AEKSIH**A**YHE-$CONH_2$	
MxiE-A8	Ac-AEKSIHF**A**HE-$CONH_2$	
MxiE-A9	Ac-AEKSIHFY**A**E-$CONH_2$	
MxiE-A10	Ac-AEKSIHFYH**A**-$CONH_2$	
Spa13-1	Ac-MKQLDKVLKIKDKYQRSVKL-$CONH_2$	AG STEINMETZER, UM
Spa13-2	Ac-KDKYQRSVKLIEAHILTLKK-$CONH_2$	
Spa13-3	Ac-IEAHILTLKKKNSLYRDVEA-$CONH_2$	
Spa13-4	Ac-KNSLYRDVEALDKRIIYFLQ-$CONH_2$	
Spa13-5	Ac-LDKRIIYFLQLENDLEPVGA-$CONH_2$	
Spa13-6	Ac-LENDLEPVGAQSVSQLFNTR-$CONH_2$	
Spa13-7	Ac-QSVSQLFNTRRKIAIVKKHI-$CONH_2$	
Spa13-8	Ac-RKIAIVKKHIIQYQSERILL-$CONH_2$	
Spa13-9	Ac-IIQYQSERILLKGRIEEIQK-$CONH_2$	
Spa13-10	Ac-KGRIEEIQKDIDEANASKRK-$CONH_2$	
Spa13-11	Ac-IDEANASKRKLLHKESKICK-$CONH_2$	
Spa13-12	Ac-LLHKESKICKRIGLIKRNNF-$CONH_2$	
Spa13-13	Ac-RIGLIKRNNFAKQLILDELS-$CONH_2$	
Spa13-14	Ac-FAKQLILDELSQEDMKYGIR-$CONH_2$	

5.1.14. *Follow-up*-Verbindungen

Tabelle 5.1-14: **Follow-up-*Verbindungen.***

***Follow-up*-ID**	**MolPort-ID**	**Hersteller**
1	MolPort-047-389-362	ChemBridge Corporation
2	MolPort-002-296-948	ChemBridge Corporation
3	MolPort-002-302-666	ChemBridge Corporation
4	MolPort-047-550-026	ENAMINE Ltd.
5	MolPort-020-055-212	ENAMINE Ltd.
6	MolPort-047-337-193	ENAMINE Ltd.
7	MolPort-020-056-638	ENAMINE Ltd.
8	MolPort-038-948-311	ENAMINE Ltd.
9	MolPort-004-837-875	ENAMINE Ltd.
10	MolPort-004-249-696	ENAMINE Ltd.
11	MolPort-002-905-453	Maybridge, Ltd.
12	MolPort-002-905-332	Maybridge, Ltd.
13	MolPort-002-905-336	Maybridge, Ltd.
14	MolPort-002-905-463	Maybridge, Ltd.
15	MolPort-002-051-031	Otava, Ltd.
16	MolPort-000-693-554	Otava, Ltd.
17	MolPort-030-033-993	UkrOrgSynthesis Ltd.

5.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zu Beginn einer Klonierung wurde das gewünschte Gen im vorliegenden Vektor amplifiziert und dabei durch die Verwendung geeigneter Primer mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen versehen. Als DNA-Polymerase wurde *Phusion™ High-Fidelity* (HF) (THERMO FISHER SCIENTIFIC) verwendet. Ein typischer PCR-Ansatz ist in **Tabelle 5.2-1** gezeigt.

Tabelle 5.2-1: Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes.

Bestandteile	Volumen [µL]	Finale Konzentration
Reaktionspuffer, HF (5x)	10	1x
5´-Primer in H_2O; 2.5 pmol/µL	1	
3´-Primer in H_2O; 2.5 pmol/µL	1	
dsDNA-Templat		100-200 ng
dNTP-Mix, je 10 mM		200 µM
H_2O, Nuklease-frei		
Phusion™-Polymerase, 2 U/µL	0.5	1 U
Gesamtvolumen	∑ 50	

Die *Phusion™*-Polymerase wurde als letzte Komponente hinzugegeben. Der fertige Ansatz wurde in einen *PCR Mini Cycler* (MJ RESEARCH) gestellt und das zuvor einprogrammierte Temperaturprogramm wurde gestartet (siehe **Tabelle 5.2-2**).

Tabelle 5.2-2: Temperaturprogramm für eine PCR.

Anzahl	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Schritte der PCR
1	30	98	Initiale Denaturierung
30	10	98	Denaturierung
	30		Primerhybridisierung
	pro 1 kb 15-30		Elongation
1	600	72	Finale Elongation
1	∞	4	Lagerung

Die Temperatur für die Primerhybridisierung hängt von den jeweils verwendeten Primern ab. Zur Abschätzung der für die Primerhybridisierung notwendigen Temperatur wurde der T_m *Calculator* (THERMO FISHER SCIENTIFIC) verwendet. Die Elongationszeit ist von der Länge des Vektors mit dem zu replizierenden Gen abhängig. Daher sind die Temperaturen für diese Schritte der PCR in **Tabelle 5.2-2** nicht angegeben.

5.2.2. Enzymatischer Verdau

Das PCR-Produkt bzw. die Plasmid-DNA wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen versetzt. Bei der Verwendung von *FastDigest*- (FD-) Enzymen wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Bei herkömmlichen Enzymen dauerte der enzymatische Verdau i.d.R. 2-3 h. Beim Verdau von Vektor-DNA, in die später das gewünschte Gen eingebracht werden sollte, wurde zu dem Ansatz Alkalische Phosphatase hinzugegeben, um zu verhindern, dass sich der linearisierte Vektor während der Ligation wieder schließt. Wurde der Verdau nicht mit FD-, sondern mit herkömmlichen Enzymen durchgeführt, wurde die Alkalische Phosphatase erst nach 2-2.5 h hinzugegeben. Ein typischer Ansatz für einen enzymatischen Verdau ist in **Tabelle 5.2-3** gezeigt.

Tabelle 5.2-3: Typischer Ansatz eines enzymatischen Verdaus.

Bestandteile	***Insert* [µL]**	**Vektor [µL]**
PCR-Produkt/Plasmid-DNA (1000-2000 ng)		
H_2O, Nuklease-frei		
10x FD *Green Buffer*	4	4
Restriktionsenzym 1 FD	1	1
Restriktionsenzym 2 FD	1	1
Alkalische Phosphatase FD	-	1
Gesamtvolumen	40	40

5.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines Agarose-Gels wurden 0.5 g Agarose mit 50 mL TAE-Puffer (1x) versetzt und in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis sich der Feststoff vollständig gelöst hatte. Es wurde 1 µL des Farbstoffs *SYBR® Safe* hinzugegeben, um die DNA im Gel unter der Anwendung von UV-Licht bzw. blauem Licht sichtbar zu machen. Die Lösung wurde in eine Kammer gegossen. Mithilfe eines Kamms wurden für die Proben Vertiefungen im Gel erzeugt. Die Kammer wurde nach dem Erstarren mit 1x TAE-Puffer gefüllt, sodass das Gel vollständig mit Puffer bedeckt war. Proben und Marker wurden in die Vertiefungen pipettiert. Die DNA-Proben waren zuvor mit 6x Probenpuffer versetzt worden. Die Elektrophorese wurde 50 min bei 100 V betrieben. Die Apparatur wurde während des Betriebs mit Alufolie abgedeckt. Mithilfe einer UV-Platte und eines entsprechenden Filters konnten die DNA-Banden anschließend analysiert werden.

5.2.4. Gelextraktion

Die gewünschten DNA-Banden wurden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Zur Extraktion und Aufreinigung der DNA-Fragmente wurde das Gelextraktionskit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (PROMEGA) verwendet. Dazu wurde eine DNA-Bande in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und je nach Größe des Gelfragments mit 100-200 µL *Membrane Binding Solution* versetzt. Der Ansatz wurde schüttelnd bei 60 °C inkubiert, bis sich das Gel vollständig aufgelöst hatte. Der Mix aus DNA und *Membrane Binding Solution* wurde auf eine *Wizard® SV* Säule gegeben und in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß gestellt. Es wurde 1 min bei 13000 rpm (1-14K, SIGMA) zentrifugiert. Nach der Zugabe von 700 µL Waschlösung wurde erneut 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde ein zweites Mal mit 300 µL Waschlösung gewaschen. Dieses Mal betrug die Zentrifugationszeit 3 min. Die gewünschte DNA wurde mit 30 µL Nuklease-freiem Wasser eluiert und in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß aufgefangen.

5.2.5. Ligation

Bei der Ligation wurden meist mehrere Ansätze gleichzeitig durchgeführt. Diese unterschieden sich lediglich im Verhältnis von *Insert* zu Vektor-DNA. Ein typischer Ansatz kann **Tabelle 5.2-4** entnommen werden. Dieser Ansatz wurde 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 5.2-4: Typischer Ansatz einer Ligation.

Bestanteile	**Finale Konzentration bzw. Volumen**	**1. Ansatz**	**2. Ansatz**
Insert:Vektor Vektor: 20-100 ng	Verhältnis 1:1-5:1 ca. 16 µL insgesamt	3:1	4:1
Ligase-Puffer (10x)	1x	2	2
DNA-Ligase (5 U/µL)	0.125 U	0.5	0.5
H_2O, Nuklease-frei			
Gesamtvolumen		20 µL	20 µL

5.2.6. Transformation

6 µL eines Ligationsansatzes bzw. eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA wurden mit 25 µL kompetenten Zellen vereint. Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Die Dauer des darauffolgenden Hitzeschocks bei 42 °C war abhängig von den verwendeten Zellen. Bei *XL2-Blue* ultrakompetenten Zellen (AGILENT TECHNOLOGIES) dauerte der Hitzeschock 30 s und bei *BL21-CodonPlus* kompetenten Zellen (AGILENT TECHNOLOGIES) 20 s. Die Dauer des Hitzeschocks ist für eine optimale Transformation sehr entscheidend. Es wurde daher strikt nach Handbuch der jeweiligen Zellen verfahren. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen ein paar Minuten auf Eis inkubiert. Um ein Endvolumen von 1000 µL zu erhalten, wurde die entsprechende Menge LB-Medium hinzugegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C und 350 rpm (*Thermomixer Comfort 2 mL*, EPPENDORF). Der Ansatz wurde anschließend bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert (*1-14K*, SIGMA). 750 µL des Überstandes wurden verworfen. Das Zellpellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert. Der Ansatz wurde auf eine Ampicillin-Agarplatte pipettiert, gleichmäßig verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.2.7. Übernachtkultur

LB-Medium wurde unter sterilen Bedingungen mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Bei der rekombinanten Produktion von IpgC wurden Chloramphenicol (finale Konzentration: 50 µg/mL) und Ampicillin (finale Konzentration: 100 µg/mL) hinzugegeben, bei der von Spa13 wurde nur Ampicillin (finale Konzentration: 100 µg/mL) eingesetzt. Eine Übernachtkultur wurde entweder mit einer Zellkolonie einer zuvor durchgeführten Transformation oder mit Zellen aus einem Glycerol-Stock angeimpft und für 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

5.2.8. Plasmidpräparation

Für eine Plasmidpräparation wurden 4 mL Übernachtkultur verwendet. Diese wurde mithilfe des *PureYield™ Plasmid Miniprep Systems* (PROMEGA) durchgeführt.

5.2.9. Bestimmung der DNA-Konzentration und Sequenzierung

DNA-Konzentrationen wurden spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels *Nanodrop 2000c* (THERMO FISHER SCIENTIFIC) bestimmt. Die Proben wurden von EUROFINS GENOMICS sequenziert.

5.2.10. Herstellung eines Glycerol-Stocks

Nach einer erfolgreichen Klonierung bzw. Mutagenese wurden 750 µL einer zuvor angesetzten Übernachtkultur mit 250 µL sterilem Glycerol vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.2.11. Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR

Für die Mutagenese wurde das *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma AGILENT TECHNOLOGIES verwendet. Die Mutationen wurden über Primer, die die Mutation bereits durch Basenaustausch beinhalteten, ins Gen eingeführt. Das nach der PCR noch vorhandene Ausgangsplasmid wurde durch die Zugabe von 1.5 µL *Dpn*I und 1-stündige Inkubation bei 37 °C zerstört. Die detaillierte Vorgehensweise ist im entsprechenden *Manual* nachzulesen.

5.3. Proteinbiochemische Methoden

5.3.1. Heterologe Expression von rekombinanten *spa13*-Genen in *E. coli*

Steriles LB-Medium wurde mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt, mit dem entsprechenden Glycerol-Stock angeimpft und bei 37 °C 16 h schüttelnd inkubiert. 2 L steriles LB-Medium, welches zuvor mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt worden war, wurde mit 20 mL dieser Übernachtkultur versetzt. Die Zellkultur wurde bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD_{600} (optische Zelldichte bei 600 nm) von 0.6-0.8 schüttelnd inkubiert. Die Temperatur wurde auf 16 °C gesenkt. Die Proteinproduktion wurde durch die Zugabe von 2 mL 1-molarer IPTG-Lösung induziert. Es folgten weitere 16-20 h Inkubation schüttelnd bei 16 °C. Die Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation bei 4 °C und 10000 rpm über einen Zeitraum von 10 min (*Avanti™ J-25, JA-10 Rotor*, BECKMAN COULTER). Die Zellen von je 2 bzw. 4 L Expressionsmedium wurden vereint, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.3.2. Messung der optischen Dichte einer Zellkultur

Die Messung der OD erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm. Dazu wurden etwa 1 mL Zellkultur in eine Einmalküvette (SARSTEDT) überführt und mittels *Nanodrop 2000c* (THERMO FISHER SCIENTIFIC) vermessen. Für den Nullabgleich diente das zellfreie Medium.

5.3.3. Zellaufschluss und -ernte

Die Zellen von 2 bzw. 4 L Expressionsmedium wurden in 80-100 mL Puffer resuspendiert, homogenisiert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Ultraschallbehandlung erfolgte mittels *Sonifier™ 250* (BRANSON) dreimal über einen Zeitraum von 3 min mit einer Stärke von 3/10 bei 70 % *Output*. Die Zellen befanden sich die gesamte Zeit über auf Eis. Die festen Zellbestandteile wurden durch 1-stündige Zentrifugation bei 4 °C und 20000 rpm abgetrennt (*Avanti™ J-25, JA-25.50 Rotor*, BECKMAN COULTER).

5.3.4. Affinitätschromatographie mittels Dextrin-Sepharose-Säule

Die Zellen wurden mit Dextrin-S-Bindepuffer resuspendiert und aufgeschlossen. Das Zelllysat wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min auf eine zuvor mit 5 Säulenvolumina (SV) H_2O und 5 SV Dextrin-S-Bindepuffer äquilibrierte *Dextrin Sepharose™ HP*-Säule (GE HEALTHCARE) geladen. Die Säule wurde anschließend mit 12 SV Dextrin-S-Bindepuffer gespült und an ein *ÄKTAprime™ plus FPLC System* (GE HEALTHCARE) angeschlossen. Die Elution erfolgte mit Dextrin-S-Elutionspuffer und einer Flussrate von 1.5 mL/min.

Bei Anwendung einer reversen Dextrin-Sepharose-Säule wurde die Säule auf gleiche Weise äquilibriert. Die auf Dextrin-S-Bindepuffer umgepufferte Proteinlösung wurde nach erfolgter Abspaltung des MBP-*Tags* auf die Säule geladen. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Auf diese Weise kann für gewöhnlich das MBP-*Tag* abgefangen werden, das Protein befindet sich im Durchfluss.

5.3.5. Affinitätschromatographie mittels Glutathion-Sepharose-Säule

Zellen wurden mit *Cleavage*-Puffer resuspendiert und aufgeschlossen. Das Zelllysat wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min auf eine mit *Glutathion-Sepharose® 4 FF* gefüllte *XK16/20*-Säule (PHARMACIA BIOTECH) – kurz GSH-Säule – geladen, die zuvor mit 3 SV H_2O und 3 SV *Cleavage*-Puffer äquilibriert worden war. Anschließend wurde die beladene Säule mit 250 mL *Cleavage*-Puffer bei einer Flussrate von 1.5 mL/min gewaschen. 1.5 mg *PreScission*-Protease wurden in *Cleavage*-Puffer gelöst und mit einer Spritze auf die Säule geladen. Die Säule wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und an ein *ÄKTAprime™ plus FPLC System* (GE HEALTHCARE) angeschlossen. Die Elution erfolgte mit *Cleavage*-Puffer und einer Flussrate von 1 mL/min.

Bei Anwendung einer reversen GSH-Säule wurde die Säule zuvor mit 3 SV H_2O und 3 SV Dextrin-S-Bindepuffer äquilibriert. Das Eluat der reversen Dextrin-Sepharose-Säule wurde auf die GSH-Säule geladen und der Durchfluss wurde aufgefangen. Auf diese Weise erfolgte die Abtrennung der *PreScission*-Protease. Da die *PreScission*-Protease ein Fusionsprotein der 3C-Protease des humanen Rhinovirus und der Glutathion-S-Transferase darstellt, kann sie durch die Anwendung einer reversen GSH-Säule von der Proteinlösung abgetrennt werden.

5.3.6. Affinitätschromatographie mittels Nickelsäule

Das Zelllysat – die Resuspension der Zellen war mit Nickel-Bindepuffer erfolgt – wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min auf eine zuvor mit 4 SV H_2O und 4 SV Nickel-Bindepuffer äquilibrierte *HisTrap™ HP 5 mL*-Säule (GE HEALTHCARE) geladen. Die Säule wurde an ein *ÄKTAprime™ plus FPLC System* (GE HEALTHCARE) angeschlossen und solange mit Nickel-Bindepuffer gespült, bis eine konstante UV-Absorption beobachtet wurde. Die Elution erfolgte mithilfe eines linearen Gradienten (0-100 % Nickel-Elutionspuffer in 60 min) und einer Flussrate von 1 mL/min.

5.3.7. Pufferaustausch mittels Dialyse

Der Pufferaustausch erfolgte mittels Dialyse. Dazu wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch (*ZelluTrans* Dialysemembran, ROTH) überführt. Für Fusionsproteine wurde eine Membran mit einem MWCO von 12-14 kDa eingesetzt, für die in dieser Arbeit verwendeten Zielproteine wurde eine Membran mit einem MWCO von 6-8 kDa verwendet. Der Dialyseschlauch wurde je nach Volumen der Proteinlösung in 3-5 L Dialysepuffer überführt und über Nacht bei 4 °C unter Rühren inkubiert.

5.3.8. Abspaltung eines MBP-*Tags*

Die Abspaltung des MBP-*Tags* erfolgte nach Dextrin-Sepharose-Säulenchromatographie und Pufferaustausch bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 4 h. Dazu wurden 1 mg *PreScission*-Protease zur Proteinlösung hinzugegeben. Alternativ erfolgte die Abspaltung des MBP-*Tags* zeitgleich mit dem Pufferaustausch über Nacht bei 4 °C. Dies war abhängig von der Stabilität des Proteins im verwendeten Puffersystem.

5.3.9. Ionenaustauschchromatographie mittels DEAE-Säule

Eine *HiTrap™ DEAE Sepharose FF 5 mL*-Säule (GE HEALTHCARE) wurde mit 3 SV H_2O und 3 SV DEAE-Bindepuffer äquilibriert. Das nach Pufferaustausch in DEAE-Bindepuffer vorliegende Protein wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die Säule geladen. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Die Säule wurde anschließend mit 50 mL DEAE-Bindepuffer gespült. Die Flussrate dabei betrug 2 mL/min. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten. Über einen Zeitraum von 60 min wurde bei einer Flussrate von 1 mL/min der Anteil an DEAE-Elutionspuffer von 0 auf 100 % erhöht.

5.3.10. Ionenaustauschchromatographie mittels SP HP-Säule

Eine *HiTrap™ SP HP 5 mL*-Säule (GE HEALTHCARE) wurde mit 3 SV H_2O und 3 SV SP-Bindepuffer äquilibriert. Das Dialysat wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die Säule geladen. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Die Säule wurde anschließend bei einer Flussrate von 1.5 mL/min mit 50 mL SP-Bindepuffer gespült. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten (0-100 % SP-Elutionspuffer in 60 min) bei einer Flussrate von 1 mL/min.

5.3.11. Präparative Molekularsiebchromatographie

In dieser Arbeit wurde sowohl eine *HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade*-Säule (AMERSHAM BIOSCIENCES) – kurz SEC-200 – als auch eine *HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade*-Säule (AMERSHAM BIOSCIENCES) – kurz SEC-75 – verwendet. Der Unterschied zwischen den Säulen besteht in ihrer Porengröße. Eine SEC-75 ist in der Lage, Proteine zwischen 3 und 70 kDa aufzutrennen. Eine SEC-200 kann Moleküle bis zu einer Größe von 600 kDa auftrennen. Beide Säulen besitzen ein SV von 300 mL. Vor Gebrauch wurden sie mit 1.5 SV H_2O und 2 SV SEC-Puffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde vor Anwendung der SEC-Säule auf ein Volumen von 10 mL aufkonzentriert, um so mithilfe eines 10 mL-*Loops* auf die Säule geladen werden zu können. Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 2 mL/min auf die Säule geladen. Die Elution erfolgte ebenfalls bei einer Flussrate von 2 mL/min mit SEC-Puffer.

5.3.12. Heterologe Produktion und Reinigung der *PreScission*-Protease

100 mL steriles LB-Medium wurden mit 100 µL einer 100 mg/mL Ampicillin-Lösung versetzt und mit dem entsprechenden Glycerol-Stock angeimpft. Der Glycerol-Stock enthielt *E. coli BL21-Gold(DE3)* kompetente Zellen mit dem Gen für die *PreScission*-Protease. Die Übernachtkultur wurde 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die *PreScission*-Protease besitzt die Erkennungssequenz Leu-Phe-Gln-Gly-Pro und schneidet spezifisch zwischen Gln und Gly. In dieser Arbeit wurde die Protease gereinigt und anschließend zur Abspaltung eines MBP-*Tags* eingesetzt. Mit 100 mL Übernachtkultur wurden 1.8 L Super-LB-Medium inklusive 1.8 mL einer 100 mg/mL Ampicillin-Lösung angeimpft und bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD_{600} von 2 bis 3 wurde die Temperatur auf 15 °C gesenkt. Die Kolben wurden mit 1.8 mL einer einmolaren IPTG-Lösung versetzt und 16 h bei 120 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation des Mediums bei 4 °C und 10000 rpm über einen Zeitraum von 10 min (*Avanti™ J-25, JA-10 Rotor*, BECKMAN COULTER). Die Pellets einer 1.8 L-Kultur wurden vereint, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Zellen von 1.8 L Expressionsmedium wurden mit etwa 80-100 mL PBS-Puffer und einer Spatelspitze Lysozym versetzt und resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mithilfe von Ultraschall. Nach Abtrennung fester Zellbestandteile durch Zentrifugation über einen Zeitraum von 60 min bei 20000 rpm und 4 °C (*Avanti™ J-25, JA-25.50 Rotor*, BECKMAN COULTER) wurde das Zelllysat bei einer Flussrate von 1 mL/min auf eine *GSTrap FF 5 mL*-Säule (GE HEALTHCARE) geladen, die zuvor mit PBS-Puffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit PBS-Puffer und einer Flussrate von 2 mL/min gespült, bis die UV-Absorption in etwa den Ausgangswert erreicht hatte. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten (0-100 % GSTrap-Elutionspuffer in 20 min) und einer Flussrate von 2 mL/min. Das Protein wurde über Nacht bei 4 °C mittels Dialyse auf *PreScission*-Puffer umgepuffert. Der Proteinlösung wurden 5 % Glycerol zugesetzt. Mithilfe einer Ultrafiltriereinheit (*Vivaspin 20 MWCO 30.000*, SARTORIUS) wurde die Proteinlösung auf 5 mg/mL aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.3.13. Heterologe Produktion und Reinigung von rekombinantem IpgC und der trunkierten Varianten IpgC0,-4S und IpgC-9,-4S

300 mL LB-Medium wurden unter sterilen Bedingungen mit 300 µL Ampicillin-Lösung (100 mg/ml) und 300 µL Chloramphenicol-Lösung (50 mg/mL) versetzt und mit dem entsprechenden Glycerol-Stock angeimpft. Die anfangs verwendeten Glycerol-Stocks wurden von HASEWINKEL[102] angefertigt. HASEWINKEL hatte den Bakterienstamm *BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL* mit den Plasmiden pGEX-4T-Mod-ipgC, pHW1-ipgC0,-4S und pHW1-ipgC-9,-4S transformiert. Die angeimpften 300 mL LB-Medium wurden für 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Jeweils 25 mL dieser Übernachtkultur wurden verwendet, um 2 L steriles LB-Medium anzuimpfen. Die Zellen wurden bei 37 °C und 120 rpm bis zu einer OD_{600} von 0.8 inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0.8 erfolgte die Induktion mit 2 mL einmolarer IPTG-Lösung pro 2 L Kultur. Die Zellen wurden bei 15 °C und 120 rpm etwa 18 h inkubiert. Es folgte die Zellernte. Die festen Zellbestandteile wurden für 10 min bei 4 °C und 10000 rpm abzentrifugiert (*Avanti™ J-25, JA-10 Rotor*, BECKMAN COULTER). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets von je 4 L Kultur wurden vereint, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die in 4 L Expressionsmedium gewachsenen Zellen wurden mit etwa 80-100 mL PBS-Puffer versetzt und resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mithilfe von Ultraschall (*Sonifier 250*, BRANSON). Dazu wurde die Suspension dreimal 3 min mit einer Stärke von 3/10 bei 70 % *Output* behandelt. Die festen Zellbestandteile wurden durch einstündige Zentrifugation bei 4 °C und 20000 rpm abgetrennt (*Avanti™ J-25, JA-25.50 Rotor*, BECKMAN COULTER).
Das auf Eis gelagerte Lysat wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min auf eine mit 15 mL *Glutathion-Sepharose* gefüllte und mit PBS-Puffer äquilibrierte *XK 16/20*-Säule (PHARMACIA BIOTECH) – kurz GSH-Säule – geladen. Die Säule wurde mit etwa 400 mL PBS-Puffer gespült. 500 U Thrombin (CSL BEHRING) wurden in 15 mL PBS-Puffer gelöst und mit einer Spritze auf die Säule geladen. Die Säule wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die Elution des nun vom GST-*Tag* befreiten Proteins wurde die Säule an ein *ÄKTAprime™ plus FPLC System* (GE HEALTHCARE) angeschlossen. Das Protein wurde mit PBS-Puffer und einer Flussrate von 1 mL/min eluiert.

Das Eluat wurde mithilfe einer mit *Sephadex™ G-25* gefüllten *XK16/40*-Säule (GE HEALTHCARE) – kurz PD-10-Säule – umgepuffert. Zuvor musste das Eluat mithilfe einer Ultrafiltriereinheit (*Vivaspin®20 MWCO 5000*, SARTORIUS) auf ein Volumen von 10 mL aufkonzentriert werden. Die mit BIS-TRIS-Puffer äquilibrierte PD-10-Säule wurde an das *ÄKTAprime™ plus FPLC System* angeschlossen. Das aufkonzentrierte Eluat wurde über einen 10 mL-*Loop* auf die Säule geladen. Die Elution von der PD-10-Säule erfolgte ebenfalls unter Verwendung von BIS-TRIS-Puffer.

Im Anschluss daran wurde dieses Eluat auf eine *HiTrap™ DEAE FF 5 mL*-Säule (GE HEALTHCARE) – kurz DEAE-Säule – aufgetragen. Hier wurde entweder das Eluat zuvor auf 10 mL aufkonzentriert und über den 10 mL-*Loop* auf die Säule geladen oder mithilfe einer Peristaltikpumpe (*P-1 GE*, GE HEALTHCARE) auf die Säule geladen. Die Säule wurde solange mit BIS-TRIS-Puffer und einer Flussrate von 2 mL/min gespült, bis die UV-Absorption in etwa den Anfangswert erreicht hatte. Über einen Zeitraum von 60 min wurde der Anteil an BIS-TRIS-Elutionspuffer von 0 auf 100 % erhöht. Das auf 10 mL aufkonzentrierte Eluat wurde über Nacht bei 4 °C in 4 L SEC-Puffer dialysiert. Dazu wurde ein Dialyseschlauch mit einem MWCO von 5-6 kDa (*ZelluTrans* Dialysemembran, ROTH) verwendet.

Zuletzt wurde eine SEC-Säule (*HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade*, AMERSHAM BIOSCIENCES) verwendet. Diese wurde zunächst mit SEC-Puffer äquilibriert. Das 10 mL-Dialysat wurde mit einer Spritze auf die Säule geladen. Die Elution erfolgte mit SEC-Puffer und einer Flussrate von 2 mL/min. Das Protein eluierte nach einem Elutionsvolumen von etwa 150-200 mL und wurde mittels Ultrafiltriereinheit (*Vivaspin®20 MWCO 10.000*, SARTORIUS) auf 10 mg/mL aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Es konnten aus einer 4 L-Kultur durchschnittlich 50 mg IpgC, 35 mg IpgC0,-4S bzw. 35 mg IpgC-9,-4S erhalten werden. In **Abbildung 5.3-1** ist eine SDS-PAGE mit Proben einer Aufreinigung von IpgC0,-4S gezeigt. Es ist klar zu erkennen, dass das Protein nach erfolgter Aufreinigung keine Verunreinigungen mehr aufwies. **Abbildung 5.3-2** zeigt eine SDS-PAGE mit Proben aller drei Proteinvarianten. Die Unterschiede in der molaren Masse sind eindeutig zu erkennen. Dass die jeweiligen Banden für die IpgC-Varianten auf dem Gel zwischen 10 und 15 kDa zu beobachten sind und nicht zwischen 15 und 25 kDa, wo sie eigentlich hätten beobachtet werden müssen, hat wahrscheinlich mit der nicht-globulären Form des Proteins zu tun und wurde bereits von HASEWINKEL[102] angemerkt.

Die hier beschriebene Aufreinigung basiert auf einem Protokoll, welches von HASEWINKEL[102] etabliert und von JÜNGEL[118] optimiert wurde. Es sind jedoch kleine Änderungen vorgenommen worden. Auf die Benzamidin-Säule zur Abtrennung des Thrombins wurde verzichtet und anstelle eines starkbindenden Anionenaustauschers (Q Sepharose) wurde ein schwachbindender Anionenaustauscher (DEAE) verwendet.

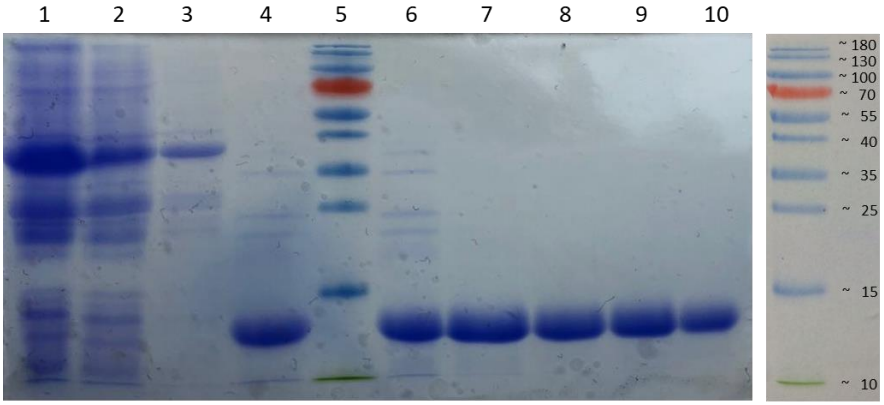


Abbildung 5.3-1: SDS-PAGE mit Proben einer Reinigung von IpgC0,-4S. *Von links nach rechts: 1: Lysat; 2: Durchfluss der GSH-Säule; 3: Waschen der GSH-Säule; 4: Eluat der GSH-Säule (mit bereits entferntem GST-*Tag*); 5: Proteinmarker; 6: Eluat der PD-10-Säule; 7: Eluat der DEAE-Säule; 8: Fraktion 21 der SEC-Säule; 9: Fraktion 22 der SEC-Säule; 10: vereinigte Fraktionen der SEC-Säule. Rechts ist der Proteinmarker mit den molaren Massen für die Markerbanden in kDa dargestellt.*

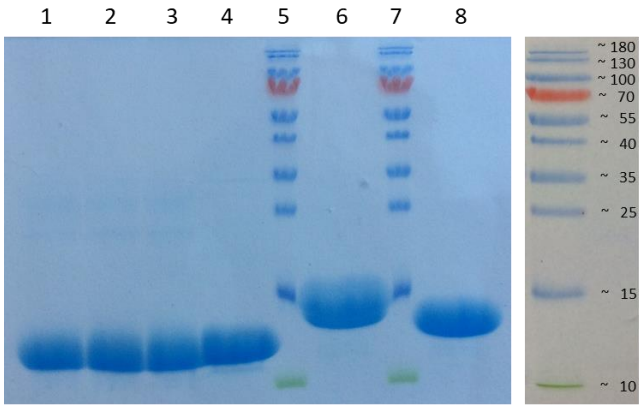


Abbildung 5.3-2: SDS-PAGE mit gereinigtem IpgC-9,-4S, IpgC und IpgC0,-4S. *Von links nach rechts: 1-4: Vier unterschiedliche Chargen von IpgC-9,-4S: „X3“, „X4“, „X5“, „X6“; 5: Proteinmarker; 6: IpgC-Charge „F1“; 7: Proteinmarker; 8: IpgC0,-4S-Charge „H1“. Rechts ist der Proteinmarker mit den molaren Massen für die Markerbanden in kDa dargestellt.*

5.3.14. Reinigung des Fusionsproteins GST-IpgC0,-4S

Die heterologe Produktion wurde bereits in **Kapitel 5.3.13** ausführlich beschrieben. Die Zellen von 4 L Expressionsmedium wurden mit etwa 80-100 mL PBS-Puffer versetzt und resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mithilfe von Ultraschall (*Sonifier 250*, BRANSON). Dazu wurde die Zellsuspension dreimal 3 min mit einer Stärke von 3/10 bei 70 % *Output* behandelt. Die festen Zellbestandteile wurden durch einstündige Zentrifugation bei 4 °C und 20000 rpm abgetrennt (*Avanti™ J-25, JA-25.50 Rotor*, BECKMAN COULTER).

Das auf Eis gelagerte Lysat wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min auf eine mit 15 mL *Glutathion-Sepharose* gefüllte und mit PBS-Puffer äquilibrierte *XK 16/20*-Säule (PHARMACIA BIOTECH) – kurz GSH-Säule – geladen. Die Säule wurde anschließend mit etwa 400 mL PBS-Puffer gespült. Für die Elution wurde die Säule an ein *ÄKTAprime™ plus FPLC System* (GE HEALTHCARE) angeschlossen. Das Protein wurde mit einem linearen Gradienten (0-100 % GSH-Elutionspuffer in 60 min) und einer Flussrate von 1 mL/min eluiert. Über Nacht und bei 4 °C erfolgte mittels Dialyse ein Pufferaustausch auf PBS-Puffer. Dazu wurde ein Dialyseschlauch mit einem MWCO von 12-14 kDa (*ZelluTrans* Dialysemembran, ROTH) verwendet.

Das Dialysat wurde mithilfe einer mit *Sephadex™ G-25* gefüllten *XK16/40*-Säule (GE HEALTHCARE) – kurz PD-10-Säule – umgepuffert. Zuvor musste das Dialysat mithilfe einer Ultrafiltriereinheit (*Vivaspin®20 MWCO 30000*, SARTORIUS) auf ein Volumen von 10 mL aufkonzentriert werden. Die mit Phenyl-S-Puffer-A äquilibrierte PD-10-Säule wurde an das *ÄKTAprime™ plus FPLC System* angeschlossen. Das aufkonzentrierte Eluat wurde über einen 10 mL-*Loop* auf die Säule geladen. Die Elution erfolgte ebenfalls unter Verwendung von Phenyl-S-Puffer-A. Im Anschluss daran wurde das auf 10 mL aufkonzentrierte PD-10-Eluat mit einem 10 mL-*Loop* auf eine zuvor mit Phenyl-S-Puffer-A äquilibrierte *HiPrep™ Phenyl HP 16/10*-Säule (GE HEALTHCARE) geladen. Die Säule wurde mit etwa 30-40 mL Phenyl-S-Puffer-A gewaschen, bevor ein linearer Gradient (0-100 % Phenyl-S-Puffer-B in 80 min) gestartet wurde. Die Proteinlösung wurde auf 6 mg/mL aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.3.15. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Bestimmung der Reinheit aufgereinigter Proteine und der Abschätzung ihrer molaren Masse wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dabei wurden Gele mit einem Gehalt von 15 % (*V*/*V*) Acrylamid verwendet. Dies war insofern wichtig, da in dieser Arbeit besonders kleine Proteine analysiert wurden und diese bei einem geringeren Gehalt an Acrylamid mit der Laufmittelfront aus dem Gel herausliefen. In **Tabelle 5.3-1** ist die Zusammensetzung von 15-%-Acrylamid-Gelen gezeigt.

Tabelle 5.3-1: Zusammensetzung der SDS-Gele mit 15 % Acrylamid im Trenngel.

Bestandteile	Trenngel Volumen [mL]	Sammelgel Volumen [mL]
30 % Acrylamid + 0.8 % Bisacrylamid *(Rotiphorese® Gel 30)*	34	6.5
H_2O	8.4	24.3
Trenngel-Puffer	23.8	-
Sammelgel-Puffer	-	7.8
SDS	0.663	0.390
APS	0.663	0.390
TEMED	0.061	0.039
Gesamtvolumen	67.589	39.419

Die Proben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer gemischt (finale Konzentration: 1x SDS-Probenpuffer) und durch eine 10-minütige Inkubation bei 95 °C denaturiert. Das Gel wurde in eine Elektrophorese-Kammer (BIO-RAD) überführt. Die Kammer wurde mit *Rotiphorese® 1x SDS-PAGE* (ROTH) befüllt. Das Gel wurde mit den Proben beladen, dabei wurden meist 10 µL der Proben aufgetragen. Als Protein-Standard („Proteinmarker“) – davon wurden 5 µL aufs Gel aufgetragen – dienten *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* bzw. *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (THERMO FISHER SCIENTIFIC). Es wurde eine Spannung von 130 V angelegt. Sobald die Proben das Sammelgel verlassen hatten und ins Trenngel gewandert waren, wurde die Spannung auf 180 V erhöht. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt. Das Trenngel wurde in *Coomassie*-Färbelösung gelegt und 15 min schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde es mehrfach in frische *Coomassie*-Entfärbelösung gelegt und schüttelnd inkubiert, bis das Gel entfärbt war. Das Bandenmuster wurde fotografisch festgehalten. Alternativ zur *Coomassie*-Färbetechnik wurden Gele in *Roti®-Blue*-Färbelösung transferiert und über Nacht schüttelnd inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Gel kurz in *Roti®-Blue*-Entfärbelösung transferiert und schüttelnd inkubiert.

5.3.16. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde UV-VIS-spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm (*Nanodrop 2000c*, THERMO FISHER SCIENTIFIC) bestimmt. Der dazu notwendige theoretische Extinktionskoeffizient des Proteins wurde mit dem Programm *ProtParam*[36] bestimmt.

5.3.17. Elektrophoretischer Proteintransfer (Western Blot)

Bei einem Western Blot werden Proteine von einem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran transferiert. Auf dieser Trägermembran kann das Protein anschließend anhand verschiedener Nachweismethoden identifiziert werden.

Zunächst erfolgte mittels SDS-PAGE die Auftrennung der Proteinproben. Der Transfer auf die Trägermembran (Nitrocellulose (NC) bzw. Polyvinylidenfluorid (PVDF)) wurde elektrophoretisch unter Anwendung des *Semi-Dry*-Prinzips erzielt. PVDF-Membranen mussten vor Verwendung in 100 % Methanol aktiviert werden. Dies war bei NC-Membranen nicht erforderlich. Sechs *Whatman®*-Papiere und die Trägermembran wurden vor dem *Blotting* kurz in Transfer-Puffer eingelegt. Der Versuchsaufbau ist in **Abbildung 5.3-3** gezeigt. War alles nach Versuchsaufbau angeordnet, wurde der Membranstapel mit einer Glaspipette überrollt, um eventuell vorhandene Luftblasen zu entfernen. Es wurde mit einer Blotkammer (*Trans-Blot® Turbo*, BIO-RAD) für 7 min eine Stromstärke von 2.5 A angelegt.

Kathode
3 x *Whatman®*-Papier
Polyacrylamidgel (SDS-PAGE)
Trägermembran (NC oder PVDF)
3 x *Whatman®*-Papier
Anode

Abbildung 5.3-3: Versuchsaufbau eines Western Blots. *Am Boden befindet sich die Anode. Darauf werden drei* Whatman®*-Papiere gelegt. Es folgt die Trägermembran, das Polyacrylamidgel und drei weitere* Whatman®*-Papiere. Oberhalb dieser befindet sich die Kathode.*

5.4. Peptid-*Microarray*

Bei der von PEPTIDES&ELEPHANTS erworbenen Membran handelte es sich um eine 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin- (TOTD-) Membran, eine Cellulose-Membran, an der sogenannte TOTD-*Spacer* über eine Etherbindung mit der Cellulose verbunden sind. Die ausgewählten N-acetylierten Peptide wurden mittels SPOT-Synthese auf die Membran aufgebracht und dabei C-terminal mit den TOTD-*Spacern* verbunden. Es wurden 26 Peptide ausgewählt, die in zwei Reihen mit je 13 Positionen angeordnet wurden (siehe **Abbildung 5.4-1** und **Tabelle 5.4-1**). Es befanden sich von jedem Peptid etwa 2 ng auf der Membran.

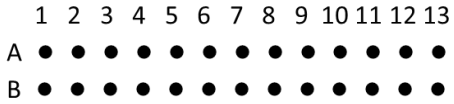


Abbildung 5.4-1: Peptidanordnung auf der Membran. *26 Peptide befinden sich an den Positionen 1-13 in Reihe A und B.*

Tabelle 5.4-1: Anordnung der verschiedenen Peptide auf der Membran.

Nr.	Position	Peptid	Nr.	Position	Peptid	Nr.	Position	Peptid	Nr.	Position	Peptid
1	A1	$Spa13^{1-20}$	8	A8	$Spa13^{71-90}$	15	B2	MxiEA1	22	B9	MxiEA8
2	A2	$Spa13^{11-30}$	9	A9	$Spa13^{80-99}$	16	B3	MxiEA2	23	B10	MxiEA9
3	A3	$Spa13^{21-40}$	10	A10	$Spa13^{92-111}$	17	B4	MxiEA3	24	B11	MxiEA10
4	A4	$Spa13^{31-50}$	11	A11	$Spa13^{102-121}$	18	B5	MxiEA4	25	B12	IpaB10
5	A5	$Spa13^{41-60}$	12	A12	$Spa13^{112-131}$	19	B6	MxiEA5	26	B13	IpaC10.5
6	A6	$Spa13^{51-70}$	13	A13	$Spa13^{122-141}$	20	B7	MxiEA6			
7	A7	$Spa13^{61-80}$	14	B1	$Spa13^{131-150}$	21	B8	MxiEA7			

Zur Hydratisierung der Peptide wurde die Membran zu Beginn unter Schütteln 10 min mit 100 % Methanol behandelt. Alle im weiteren Verlauf beschriebenen Inkubationen wurden ebenfalls schüttelnd durchgeführt. Es folgten drei Waschschritte, bei denen die Membran jeweils 5 min mit TBS-Puffer gewaschen wurde. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde die Membran 2 h bei Raumtemperatur mit Blockierungspuffer behandelt. Die Membran wurde im Anschluss 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Es folgte eine zweistündige Inkubation der Membran in Proteinlösung (1.2 µg/mL GST-*getaggtes* IpgC0,-4S in Blockierungspuffer) bei Raumtemperatur. Die Membran wurde dreimal jeweils 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Als Erstantikörper diente ein *anti*-GST-Antikörper aus dem Kaninchen (QED BIOSCIENCE), der mit einer Verdünnung von 1:1000 verwendet wurde. Die Membran wurde mit dieser in Blockierungspuffer verdünnten Antikörperlösung 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde die Membran dreimal jeweils 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Als Zweitantikörper diente ein aus dem Schwein gewonnener HRP-

gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-Antikörper (DAKO) mit einer Verdünnung von 1:40000. Auch in dieser mit Blockierungspuffer verdünnten Antikörperlösung wurde die Membran 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschritte mit TBS-T-Puffer (jeweils 5 min) und ein letzter Waschschritt mit TBS-Puffer, ebenfalls 5 min. Die anschließende Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz. Dazu wurde die Membran von überschüssigem Puffer befreit auf eine Folie gelegt. Die Membran wurde mit 0.5 mL des *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrates* (THERMO FISHER SCIENTIFIC) behandelt. Zum Einsatz kam ein *ChemiDoc™ Imaging System* (BIO-RAD).

5.5. *Surface Entropy Reduction Prediction Server*

Bei der Suche nach einer Proteinvariante, die leichter zu kristallisieren ist, wurde der „*Surface Entropy Reduction Prediction Server*“, kurz *SERp Server*, verwendet. Dieser Webserver hilft beim Design von Proteinvarianten unter Anwendung der Oberflächenentropiereduktion. Einzelne Aminosäuren, die eine flexible Seitenkette aufweisen und sich auf der Oberfläche des Proteins befinden, sollen gegen solche mit einem geringeren Entropiebeitrag ausgetauscht werden. Dadurch kommt es zur Reduktion des Verlustes an Entropie während der Kristallisation und die Kristallisation wird wahrscheinlicher. Mithilfe dieses Webservers konnten bereits einige Proteine kristallisiert werden, deren Wildtyp-Formen keine Kristalle produzierten.[114]

Der Vorschlag von Mutationen erfolgt mithilfe eines Algorithmus, welcher aus drei Schritten besteht. Einmal wird ein Konformationsentropieprofil erstellt, zudem wird eine Sekundärstrukturvorhersage mittels *PSIPRED*[99] durchgeführt und es erfolgt die Suche nach konservierten Aminosäuren mit *PSI-BLAST*[139]. Als geeignete Aminosäuren werden solche mit einem hohen Entropiebeitrag angesehen, die sich in Lösungsmittel-exponierten und entropiereichen Regionen befinden, nicht konserviert und bestenfalls Teil einer Schleife sind. Sobald die Suche nach solchen Aminosäuren abgeschlossen ist, wird nach Regionen gesucht, in denen sich mehrere solcher Aminosäuren in enger Umgebung befinden.[114]

Bei der Benutzung des Webservers wurden die Standardeinstellungen verwendet. Die minimale Anzahl an Mutationen pro Cluster betrug eins, die maximale Anzahl drei. Mutationen innerhalb eines Clusters durften maximal durch zwei weitere Aminosäuren voneinander getrennt sein. Zu den Aminosäuren mit einer hohen Entropie wurden gezählt: Lysin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Glutamin. Alle Aminosäuren wurden bei der Mutagenese durch Alanin-Reste ersetzt. Alle weiteren Standardeinstellungen, wie beispielsweise die Gewichtung einzelner Aspekte, können der Webseite entnommen werden.[140]

5.6. *Thermal-Shift-Assay*

Für das *Thermal-Shift-Assay* wurden die Proteinvariante IpgC-9,-4S ($M_{IpgC\text{-}9,\text{-}4S}$: 16.296 kDa) und die 96er Fragment-Bibliothek (*„Frag Xtal Screen"*)[71] verwendet. Pro Ansatz wurden 2000 µL TSA-Puffer mit 8 µL *SYPRO Orange* (5000x, THERMO FISHER SCIENTIFIC) vereint. Aus dieser Lösung wurden 1942.5 µL entnommen und mit 105 µL zuvor filtrierter Proteinlösung (10 mg/mL IpgC-9,-4S in SEC-Puffer) vermischt. Von dieser Lösung wurden 19.5 µL in eine *MicroAmp™ Fast 96-Well Reaction Plate 0.1 mL* (THERMO FISHER SCIENTIFIC) pipettiert, zudem 0.5 µL der jeweiligen Fragmentlösung (100 mM Fragment in 100 % DMSO). Zur Erfassung des Nullwertes wurden 0.5 µL DMSO eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µL. Die finale Proteinkonzentration betrug 0.5 mg/mL bzw. 30.7 µM und die finale Fragmentkonzentration 2.5 mM. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die *Wells* wurden mit durchsichtiger Adhäsionsfolie (*MicroAmp™ Optical Adhesive Film*, THERMO FISHER SCIENTIFIC) verschlossen. Zur Erfassung der Schmelzkurven kam ein *QuantStudio 3 Real-Time PCR System* (THERMO FISHER SCIENTIFIC) zum Einsatz. Die Messung wurde bei 10 °C gestartet. Die Temperatur wurde pro Sekunde um 0.05 °C erhöht. Die maximale Temperatur betrug 90 °C. Dabei wurde das Fluoreszenzsignal erfasst. Zur Bestimmung der Schmelztemperatur diente das Maximum der ersten Ableitung der Schmelzkurve. Die Auswertung erfolgte mit der *Protein Thermal Shift™ Software Version 1.4* (THERMO FISHER SCIENTIFIC).

5.7. Kristallographische Methoden

5.7.1. MARXTAL-*Screens*

Am MARXTAL wurden mithilfe von Kristallisationsrobotern (*Honeybee 963* und *Cartesian 4000*) kommerziell erhältliche Kristallisations-*Screens* durchgeführt. Die *Screens* **AmSO$_4$**, **Anions**, **Classics**, **Classics Lite**, **JCSG Core Suite I-IV** (**Core I-IV**), **Cryos**, **JSCG plus**, **MBC I** bzw. **II** und **PACT** sind erhältlich bei der Firma QIAGEN. **Morpheus I** und **II** sind erhältlich bei MOLECULAR DIMENSIONS und **JB Penta** ist erhältlich bei JENA BIOSCIENCE. Der Kristallisationstropfen bestand aus 0.3 µL Proteinlösung und 0.3 µL Reservoirlösung. Im Reservoir befanden sich 80 µL der Kristallisationslösung (= Reservoirlösung). Alle Platten wurden bei 18 °C (später bei 20 °C) gelagert. Die im jeweiligen MARXTAL-*Screen* durchgeführten Kristallisations-*Screens* sind in **Tabelle 5.7-1** aufgelistet. Bilder wurden mithilfe des *RockImagers RI 190* standardmäßig direkt nach dem Pipettieren der Platten und nach 1, 2, 3, 5, 8, 13 und 21 Tagen gemacht.

***Tabelle 5.7-1: MARXTAL-Kristallisations*-Screens.**

Screen	IpgC0,-4S	IpgC-9,-4S mit/ohne *X-TEW*	IpgC0,-4S mit MxiE10S/IpaC10.5	IpgC-9,-4S mit MxiE10S/IpaC10.5	IpgC mit MxiE10S bzw. IpgC-9,-4S mit IpaC11
AmSO$_4$	x	x	x	x	x
Anions	x	x		x	
Classics	x	x	x	x	x
Classics Lite	x	x	x	x	x
Core I	x	x	x	x	x
Core II	x	x	x	x	x
Core III	x	x	x	x	x
Core IV	x	x	x	x	x
Cryos	x	x	x	x	x
JB Penta		x	x	x	x
JSCG plus	x	x	x	x	x
MBC I	x	x	x	x	x
MBC II	x	x	x	x	
Morpheus I		x	x	x	x
Morpheus II		x	x	x	x
PACT	x	x	x	x	x

5.7.2. *Streak-seeding*-Methode

Bei Anwendung der *streak-seeding*-Methode wurde ein Pferdehaar durch einen Tropfen mit enthaltenen Kristallen gezogen, anschließend durch einen Tropfen mit Reservoirlösung (Waschschritt, um die Anzahl an *Microseed*-Kristallen zu verringern) und letztlich durch den neuen Kristallisationstropfen. Danach wurde das Pferdehaar im jeweiligen Reservoir gewaschen, bevor es für den nächsten Tropfen verwendet wurde. Diese Vorgehensweise wurde jedoch nicht zwangsläufig bei jedem Tropfen wiederholt. Manchmal wurde auch das Pferdehaar, nachdem es durch einen Tropfen mit enthaltenen Kristallen gezogen wurde, durch eine ganze Reihe bzw. eine ganze Platte mit neu angesetzten Kristallisationstropfen gezogen. Das war allerdings nur der Fall, wenn die Kristallisationsbedingung der einzelnen Tropfen identisch war.

5.7.3. *Soaking* der 96er Fragment-Bibliothek

Kristalle wurden mit der *sitting drop*-Methode auf einer 24-*Well* Kristallisationsplatte (HAMPTON RESEARCH) erhalten. Die Reservoirlösung beinhaltete 25-30 % (*w*/*V*) PEG 4000, 0.2-0.35 M $MgCl_2$ und 0.05-0.1 M TRIS *pH* 7-8. Der Kristallisationstropfen bestand aus 1-2 µL Proteinlösung (10 mg/mL IpgC-9,-4S in SEC-Puffer) und 1 µL Reservoirlösung. Im Reservoir befanden sich 500 µL Reservoirlösung. Die *streak-seeding*-Methode kam zum Einsatz. Die *Wells* wurden mit *Shark-Tape®* (HAMPTON RESEARCH) verschlossen. Die Kristallisationsplatten wurden bei 18-25 °C (18 °C-Raum bzw. S1-Labor mit unbeständiger Raumtemperatur) angesetzt und gelagert.

Für das *Soaking* wurden die Kristalle in einen Tropfen überführt, der aus 90 % Reservoirlösung und 10 % Fragmentlösung bestand (4.5 µL Reservoirlösung und 0.5 µL Fragmentlösung). An der Zusammensetzung der Reservoirlösung wurde nur dann etwas verändert, wenn die Kristalle in einer Bedingung mit einer PEG-Konzentration kleiner als 30 % gewachsen waren. In diesem Fall wurde die PEG-Konzentration auf 30 % erhöht. Ein zusätzliches Kryo-Reagenz, welches die Kristalle vor dem Einfrieren schützen soll, war nicht erforderlich. Die Fragmentlösung beinhaltete 1 M Fragment in 100 % DMSO. In die vorbereiteten *Soaking*-Tropfen wurden Kristalle überführt. Die *Wells* wurden verschlossen. Die Kristalle wurden zwischen wenigen Minuten bis zu einer Stunde in dieser Lösung inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

5.7.4. *Soaking* der *Follow-up*-Verbindungen

Kristalle, die für das *Soaking* mit *Follow-up*-Verbindungen verwendet wurden, waren bei 25 °C (25°C-Inkubator) unter Anwendung der *sitting-drop*- bzw. *hanging-drop*-Methode in einer Lösung bestehend aus 28-33 % (*w*/*V*) PEG 4000, 0.3 M $MgCl_2$ und 0.1 M TRIS *pH* 8.0 gewachsen. Die mithilfe des *Dockings* ermittelten *Follow-up*-Verbindungen wurden über MolPort bestellt. Alle 17 Verbindungen wurden für *Soaking*-Experimente verwendet. Zunächst wurden Kristalle auf die gleiche Art und Weise *gesoakt*, wie zuvor die Fragmente der 96er Fragment-Bibliothek. Dies bedeutete, dass Kristalle direkt in eine Lösung aus 90 % Kristallisationslösung und 10 % *Follow-up*-Lösung (1 M *Follow-up*-Verbindung in 100 % DMSO) überführt wurden. Von drei *Follow-up*-Verbindungen (**10**, **13**, **14**) wurden 0.5-molare Lösungen im Lösungsmittel H_2O hergestellt, da sie in DMSO eine sehr schlechte Löslichkeit besaßen. Die *Soaking*-Zeit betrug maximal 1 h. Viele Kristalle bildeten jedoch kurz nach Überführen in *Soaking*-Lösung Risse, sodass zusätzlich eine modifizierte *Soaking*-Methode getestet wurde. Diese bestand darin, dass die Kristalle zunächst in einen Tropfen aus Kristallisationslösung überführt wurden und der Tropfen mit *Follow-up*-Verbindung daneben pipettiert wurde, sodass ein Konzentrationsausgleich nur langsam stattfand und somit ein osmotischer Schock minimiert wurde. So konnten die Kristalle in manchen *Soaking*-Lösungen 3-3.5 h bzw. 24 h verweilen, ohne Risse zu bilden und besaßen danach immer noch ein gutes Streuvermögen. In **Tabelle 5.7-2** ist zusammengefasst, welche *Soaking*-Methode bei welcher Verbindung zur Anwendung kam. Aufgrund einer limitierten Anzahl an Kristallen konnten nicht alle *Follow-up*-Verbindungen 24 h *gesoakt* werden. Mit einem Strich (-) sind die Datensätze markiert, bei denen kein Ligand in der Elektronendichte beobachtet werden konnte. Mit einem Kreuz (x) markiert sind die ermittelten *Hits*. Leere Felder bedeuten, dass die entsprechende *Soaking*-Methode für die jeweilige *Follow-up*-Verbindung entweder nicht durchgeführt wurde oder dass die entsprechenden Kristalle kein ausreichendes Streuvermögen zeigten.

Tabelle 5.7-2: **Soaking-*Methode für die 17* Follow-up-*Verbindungen.***

***Follow-up*-Verbindung**	***Soaking***		
	modifizierte *Soaking*-Methode		
	10-60 min	**3-3.5 h**	**24 h**
U01	-	-	
U02			
U03	-		-
U04	-		
U05		-	-
U06			
U07	-		-
U08	x		
U09	x		
U10	-	-	
U11	-	x	x
U12	-	-	-
U13	-	-	-
U14		-	-
U15		-	
U16		-	
U17	-		-

5.7.5. Datensammlung und -prozessierung sowie Strukturbestimmung und Verfeinerung

Alle erhaltenen Kristalle wurden an einem hauseigenen Röntgengerät *(MAR345)* auf ihre Streufähigkeit hin untersucht. Kristalle, die ausreichendes Streuvermögen zeigten, wurden an Synchrotron-Einrichtungen vermessen. Die Daten wurden bei 100 K an den *Beamlines* 14.1 und 14.2 des Synchrotrons *BESSY II* (HZB) gesammelt. Die erforderliche Anzahl an Bildern und die benötigte Drehwinkelbreite wurde anhand von zwei Testbildern im Abstand von 90° zueinander und einer Strategieberechnung mit *Mosflm*[141] bestimmt.

Die Datensätze wurden mit *XDSAPP2*[142] prozessiert und skaliert. Der molekulare Ersatz wurde mit *CCP4 Phaser*[143] durchgeführt. Als Startmodell für die *Apo*-Struktur (PDB-Code: 6scb) dienten die Aminosäuren 32-151 der Kette A von IpgC (PDB-Code: 3gyz[37]), als Startmodell für alle weiteren Strukturen diente das Dimer (Kette A und Kette B) der in dieser Arbeit bestimmten *Apo*-Struktur (PDB-Code: 6scb).

Phenix Refine[116,117] (Version 1.16-3549) diente zur Verfeinerung. 5 % der Reflexe wurden für die Berechnung des R_{free}-Wertes verwendet. Es wurden fünf Zyklen des *Cartesian simulated annealing* durchgeführt, gefolgt von fünf weiteren Verfeinerungszyklen. Darauf folgten alternierende Zyklen von Modellbau in *COOT*[144] und Verfeinerung in *Phenix*, wobei insbesondere die XYZ-Koordinaten, die *B*-Werte und die Besetzung alternativer Konformationen von Aminosäureseitenketten und der Liganden verfeinert wurden. Die *B*-Faktoren wurden mit TLS-Parametern verfeinert. Zudem wurde die vorhandene nicht-kristallographische Symmetrie (engl. *non-crystallographic symmetry*, NCS) zur Verfeinerung genutzt. *CCP4 Refmac*[145] (Version 5.8.0189) diente zur Verfeinerung der verzwillingten Datensätze (PDB-Codes: 7pe0 und 7pef). Die Verfeinerung der Verzwilligung erfolgte basierend auf den Intensitäten. Der Gewichtungsfaktor wurde in *Refmac* manuell ermittelt. *PDB-Extract*[146] wurde verwendet, um die mit *Refmac* erzeugten *pdb*-Dateien in *mmcif*-Dateien umzuwandeln.

Beim Modellbau in *COOT* wurden einzelne Atome von Aminosäureseitenketten gelöscht, falls diese nicht eindeutig in der $2F_o$-F_c-Elektronendichte bei einem Sigma-*Level* von 1.0 σ zu erkennen waren. Wassermoleküle wurden eingebaut, wenn diese in der F_o-F_c-Differenzelektronendichte bei einem Sigma-*Level* von 3.0 σ zu erkennen waren. Die Einschränkungen (engl. *restraints*) der Liganden wurden mithilfe des *Grade Web Servers*[147] erhalten. Nur für den Liganden **U08** wurde eLBOW[148] verwendet. Wasserstoffatome wurden hinzugefügt, falls dies zu einem mindestens 0.5 % geringeren R_{free}-Wert führte.

Zur Validierung der Daten kamen die Programme *PROCHECK*[149] und *MOLEMAN*[150] zur Anwendung. Die Abbildungen zu den Kristallstrukturen wurden mit *PyMOL*[151] erstellt. Die kristallographischen Daten wurden in der PDB deponiert und befinden sich zudem im Anhang (**Tabelle 6.3-1**-**6.3-5**).

5.7.6. Ermittlung von Interaktionen mittels *Contacsym*

Zur Ermittlung von VdW-Wechselwirkungen, aber auch H-Brücken und Salzbrücken wurde das Programm *Contacsym*[126,127] verwendet. Kurze H-Brücken waren laut Definition kleiner als 2.5 Å, H-Brücken lagen zwischen 2.5 und 3.4 Å und Salzbrücken hatten einen maximalen Abstand von 3.8 Å. Kurze VdW-Wechselwirkungen waren kleiner als 3.47 Å und VdW-Wechselwirkungen hatten einen maximalen Abstand von 4.33 Å. Die mit *Contacsym* ermittelten H-Brücken wurden noch einmal visuell auf das Vorhandensein eines H-Atoms und auf bestehende Winkel hin untersucht. Zur Bestimmung der Protein-Ligand-Interaktionen erfolgte eine Parametrisierung der Ligand-Moleküle. Dabei wurde jedem Ligand-Atom ein VdW-Radius zugeordnet. Die dafür verwendeten VdW-Radien basierten auf den von GELIN UND KARPLUS[152] publizierten Werten. Zusätzlich wurden die Radien für die in **Tabelle 5.7-3** aufgeführten Atome basierend auf den von BONDI[153] publizierten Radien geschätzt.

Tabelle 5.7-3: Geschätzte VdW-Radien.

Atome	VdW-Radius [Å]
Fluor (F)	1.57
Chlor (Cl)	1.85
	1.80
	1.70
	1.60
	1.65

5.8. *In silico-Docking* mit *SeeSAR*

5.8.1. Allgemeine Durchführung

Zunächst mussten die Proteinstrukturen vorbereitet werden. Eventuell vorhandene H-Atome, nicht-relevante Wassermoleküle und alle weiteren Lösungsmittelmoleküle wurden aus der *pdb*-Datei entfernt. Besonderes Augenmerk lag auf der Bindetasche. Hier musste für jede Aminosäure, deren Seitenkette aufgrund fehlender Elektronendichte nicht vollständig eingebaut werden konnte, entschieden werden, welche Konformation diese erhalten soll. In *SeeSAR*[76] wird grundsätzlich nur Konformation A berücksichtigt. Daher mussten je nach Bedeutung der alternativen Seitenkettenkonformationen mehrere Läufe durchgeführt werden. Polare H-Atome der Aminosäuren innerhalb der Bindetasche (beispielsweise das Stickstoff-gebundene H-Atom des Imidazolrings von Histidin) wurden von *SeeSAR* später automatisch hinzugefügt. Auch die Protonierung polarer Gruppen (beispielsweise die Protonierung der *ε*-Aminogruppe von Lysin) und die Durchführung starrer Flips (beispielsweise der Positionstausch von Stickstoff- und Sauerstoffatom einer Carbamoylgruppe oder der Flip einer Histidin-Seitenkette) wurden von *SeeSAR* je nach *Follow-up*-Verbindung angepasst.

Nicht immer wurde das vollständige Fragment als Templat für das *Docking* ausgewählt. Dies hing z.B. davon ab, ob das Fragment in eine Raumrichtung bereits optimal mit dem Protein interagierte oder ob in der Bindetasche noch Platz vorhanden war, um eventuell vorhandene Gruppen des Fragments durch andere Gruppen, die die Bindetasche deutlich besser ausfüllten, zu ersetzen.

Zunächst wurde die modifizierte Proteinstruktur zusammen mit dem Templat-Molekül als *pdb*-Datei in *SeeSAR* geladen. Der Ligand musste bestimmt und die Bindetasche definiert werden. Bei der Definition der Bindetasche wurde wie folgt vorgegangen: Es wurde mit „*show unoccupied pockets*“ nach Proteintaschen gesucht. Bei der Tasche, die das Fragment enthielt, wurden mit „*add surrounding residues*“ alle Aminosäuren ausgewählt, die diese Tasche bildeten. Je nach Größe des Fragments war der Radius, in dem benachbarte Aminosäuren angezeigt wurden, für die Entwicklung größerer Verbindungen zu gering. Daher wurden meist per Mausklick weitere Aminosäuren ausgewählt und somit zur Bindetasche hinzugefügt. Es wurden teilweise auch einzelne Wassermoleküle zur Bindetasche hinzugefügt, sodass diese fixiert waren und durch kein Molekül verdrängt werden konnten.

Die Moleküle, die für das *Docking* verwendet worden waren, wurden wie folgt ausgewählt: Es wurde mithilfe des jeweiligen Templats auf der Webseite von MolPort eine *„substructure based search“* durchgeführt. So standen maximal 10000 Moleküle zur Verfügung. Je nach Templat waren es jedoch meistens deutlich weniger Moleküle, die bei einer Suche ausgegeben wurden. Diese Moleküle wurden als *sdf*-Datei in den *Docking*-Modus von *SeeSAR* geladen. Das Templat wurde ebenfalls in den *Docking*-Modus geladen und als Templat definiert.
Es erfolgte ein Templat-basiertes *Docking*, das heißt, der Teil des jeweiligen Moleküls, der dem Templat entsprach, wurde mehr oder weniger räumlich fixiert. Für das *Docking* wurde *FlexX*[79] verwendet. Danach erfolgte ein spezieller Filterprozess, bei dem zunächst Posen verworfen wurden, deren Abweichungen zwischen dem Strukturmotiv des Startfragments und der kristallographischen Pose des Templats zu groß waren. Dann wurden ähnliche Posen geclustert (drei Cluster pro *Follow-up*) und von jedem Cluster wurde nur eine repräsentative Pose weiterverwendet. Anschließend erfolgte das *Scoring* aller Posen mittels *HYDE*.[80] Dies alles erfolgte in Kollaboration mit dem HZB, denn dort wurde dafür ein spezieller KNIME-*Workflow* entwickelt.
Für die *Docking*-Experimente wurden drei *Hits* aus dem kristallographischen Fragment-*Screening* ausgewählt. Dabei handelt es sich um die Fragmente **J2**, **J20** und **J45**.

5.8.2. *Docking* ausgehend von J20

Vorbereitung des Proteins

Der Datensatz „mlf11“ mit **J20** (PDB-Code: 7axy) wurde nach dem zehnten Verfeinerungszyklus für das *Docking* verwendet. Für die Aminosäuren LeuB121, LysB122, LysB124 und GlnB132 wurden Seitenketten hinzugefügt bzw. vervollständigt. Bei den Aminosäuren LysB122, LysB124 und GlnB132 wurde so verfahren, dass der jeweiligen Seitenkette die durch die Dichte angedeutete wahrscheinlichste Konformation – im weiteren Verlauf als *„best guess“* bezeichnet – gegeben wurde. Im Falle von LeuB121 war eine solche Einschätzung nicht möglich, daher wurde der Seitenkette eine Konformation zugeteilt, die am meisten Platz für *Follow-up*-Moleküle bot, d.h. am wenigsten potentielle sterische Hinderung darstellte.

Definition des Templats

Als Templat wurde nur ein Teil des ursprünglichen Fragment-*Hits* ausgewählt. Zum einen lag dies darin begründet, dass es nicht genügend *Follow-up*-Moleküle bei MolPort gab, die den vollständigen Fragment-*Hit* beinhalteten. Zum anderen sollte nach einer Alternative für den Pyrrolidinring gesucht werden, da der Bereich der Bindetasche, in der sich der Pyrrolidinring befand, Platz für einen größeren Substituenten bot. Der Pyrrolidinring wurde durch eine Methylgruppe ersetzt, um anzudeuten, dass das Templat in diese Richtung erweitert werden sollte. Zudem wurde die Aminogruppe entfernt. Die Strukturformel des Fragment-*Hits* **J20** und die des verwendeten Templats („**J20**_1“) sind in **Abbildung 5.8-1** gezeigt.

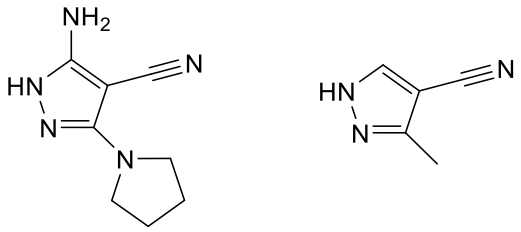


Abbildung 5.8-1: Strukturformeln des Fragment*-Hits *J20 (links) und des verwendeten Templats J20_1 (rechts).

Definition der Bindetasche

Die Bindetasche setzte sich aus folgenden Aminosäuren zusammen:

Kette A: 97, 98, 100, 101, 102, 103, 104, 133, 134, 135, 136.

Kette B: 90, 93, 94, 97, 106, 107, 110, 111, 114, 121, 122, 123, 125, 126, 128, 129, 132, 133.

Sessions

Es wurden insgesamt fünf verschiedene *Docking*-Läufe durchgeführt. Diese unterschieden sich zum einen in der Konformation der GluB125-Seitenkette am Eingang der Tasche, zum anderen darin, ob H_2O-33 als Teil der Bindetasche behandelt (fixiert) wurde, gelöscht wurde oder erhalten blieb. War das H_2O-Molekül enthalten aber nicht fixiert, entschied der *FlexX*-Algorithmus durch Probieren, ob es in der Position erhalten bleiben oder durch Atome des zu dockenden *Follow-up*-Moleküls ersetzt werden soll. H_2O-33 befindet sich in der Kristallstruktur zwischen **J20** und TyrA104 und geht sowohl mit **J20** als auch mit TyrA104 eine H-Brücke ein. Inwiefern sich die einzelnen Läufe voneinander unterscheiden, kann **Tabelle 5.8-1** entnommen werden.

Tabelle 5.8-1: Durchgeführte* Sessions *ausgehend von Fragment*-Hit *J20.

Session	GluB125	H_2O-33
1	*best guess*	fixiert
2	*best guess*	enthalten
3	außen	fixiert
4	außen	gelöscht
5	außen	enthalten

5.8.3. *Docking* ausgehend von J2

Vorbereitung des Proteins

Der Datensatz „mlf28“ mit **J2** (PDB-Code: 7ayw) wurde nach dem elften Verfeinerungszyklus für das *Docking* verwendet. Für die Aminosäuren GlnB132 und LysB124 wurde jeweils die der Dichte nach zu urteilen wahrscheinlichste Konformation der Seitenkette ausgewählt und hinzugefügt. GluB125 war in dieser Kristallstruktur sehr gut definiert. Die Seitenkette von GluB125 verschließt in ihrer ursprünglichen Konformation die Bindetasche, in der **J2** vorliegt. Daher wurden auch *Docking*-Läufe durchgeführt, bei denen die Seitenkette von GluB125 in Richtung GluB128 gedreht wurde, um den Eingangsbereich der Tasche für größere Moleküle freizumachen.

Definition des Templats

Da **J2** deutlich kleiner ist als **J20** und bei MolPort eine ausreichende Zahl von Molekülen gefunden werden konnte, die den vollständigen Fragment-*Hit* enthielten, wurde hier **J2** als Templat ausgewählt (siehe **Abbildung 5.8-2**). Die H-Atome des Benzolrings wurden während der MolPort-*Substructure Search* als invariant gesetzt. Alle Moleküle, die an diesem Ring Substituenten besitzen, wurden somit von den Ergebnissen ausgeschlossen. So sollte die Anzahl an Molekülen auf eine handhabbare Zahl verringert werden. Auf diese Moleküle konnte allerdings auch sehr gut verzichtet werden, da die Bindetasche ohnehin in diesem Bereich nicht genügend Platz für Substituenten bot. Eine Erweiterung des Fragments war also nur am Fünfring möglich. Weiterhin wurde die Suche nach Molekülen auf solche begrenzt, die ein maximales Molekulargewicht von 450 Da hatten.

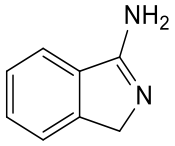


Abbildung 5.8-2: Strukturformel des Fragment*-Hits *J2, welcher ebenfalls als Templat verwendet wurde.

Definition der Bindetasche

Die ausgewählte Bindetasche entsprach der Tasche, die für das *Docking* ausgehend von **J20** verwendet wurde (siehe **Kapitel 5.8.2**).

Sessions

Es wurden vier verschiedene Läufe durchgeführt. Diese unterschieden sich wiederum zum einen durch die Konformation der GluB125-Seitenkette und zum anderen in der Tatsache, ob H_2O-33 als Teil der Bindetasche behandelt oder zuvor gelöscht wurde. Die durchgeführten Varianten sind in **Tabelle 5.8-2** aufgelistet. Die Kombination, bei der GluB125 seine ursprüngliche Konformation besitzt und H_2O-33 Teil der Bindetasche ist, wurde nicht durchgeführt, weil so das Fragment vollständig eingeschlossen und kein Wachstum des Fragments möglich gewesen wäre. Bei einem Lauf wurde der Indol-Stickstoff des Fragments bei der MolPort-Suche durch ein beliebiges Heteroatom ersetzt, mit der Absicht, die Anzahl an möglichen Molekülen zu erhöhen.

Tabelle 5.8-2: Durchgeführte* Sessions *ausgehend von Fragment*-Hit *J2.

Session	GluB125	H_2O-33	Templat
1	ursprüngliche Konformation	gelöscht	**J2**
2	ursprüngliche Konformation	gelöscht	Indol-Stickstoff durch beliebiges Atom ersetzt
3	außen	gelöscht	**J2**
4	außen	fixiert	**J2**

5.8.4. *Docking* ausgehend von J45

Vorbereitung des Proteins

Der Datensatz „mlf78“ mit **J45** als Fragment-*Hit* (PDB-Code: 7nrg) durchlief acht Verfeinerungszyklen, bevor er für das *Docking* verwendet wurde. LysB122 wurde um den Stickstoff der *ε*-Aminogruppe ergänzt, welcher in der Dichte nicht zu erkennen war. Im Falle von GlnA132 und LysA101 wurden die kompletten Seitenketten ergänzt. Die Seitenkette von GlnB132 wurde nicht ergänzt. Die Seitenkette von GluB125 wurde nach außen in Richtung GluB128

gedreht. Die Schleife mit den Aminosäuren Gly100-Asn102 der Kette A besitzt in der Kristallstruktur zwei unterschiedliche Konformationen. Konformation B („offene“ Konformation) wurde vollständig gelöscht. Die in der Elektronendichte nicht zu erkennende Seitenkette von AsnA102 der Konformation A wurde nach außen gedreht, sodass diese sich nicht im Eingang der Bindetasche befand. Für *Session* 4 wurde Konformation A der Schleife gelöscht und Konformation B blieb erhalten.

Definition des Templats

Als Templat wurde der vollständige Fragment-*Hit* **J45** ausgewählt (siehe **Abbildung 5.8-3**). In späteren *Sessions* wurde bei der MolPort-Suche das F-Atom durch ein beliebiges Halogenatom ersetzt.

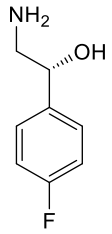


Abbildung 5.8-3: Strukturformel des Fragment-*Hits *J45, welcher ebenfalls als Templat verwendet wurde.

Definition der Bindetasche

Obwohl die Definition der Bindetasche immer auf gleiche Art und Weise erfolgte, berücksichtigte der Algorithmus in *SeeSAR* die Zusammensetzung der Bindetasche je nach *Docking* um wenige Aminosäuren unterschiedlich. Dies wurde allerdings erst später bemerkt. Die hier im Vergleich zu vorangehenden *Docking*s (siehe **Kapitel 5.8.2** und **5.8.3**) hinzugekommenen Aminosäuren sind grün markiert, die fehlenden Aminosäuren sind rot markiert.

Kette A: 97, 98, **99**, 100, 101, 102, 103, 104, 133, 134, 135, 136.

Kette B: **87**, 90, **91**, 93, 94, **95**, **96**, 97, **98**, 106, 107, **108**, 110, 111, 114, 121, 122, 123, 125, 126, 128, 129, **132**, **133**.

Die hinzugekommenen Aminosäuren spielen eine unbedeutende Rolle, da sie auf der Rückseite der Bindetasche gelegen sind. Die zwei fehlenden Aminosäuren sind von größerer Bedeutung und sollten bei zukünftigen Läufen unbedingt hinzugefügt werden.

Sessions

Es wurden vier unterschiedliche Läufe durchgeführt, deren Unterschiede sind in **Tabelle 5.8-3** aufgelistet.

Tabelle 5.8-3: Durchgeführte* Sessions *ausgehend von Fragment*-Hit *J45.

Session	**Schleife (GlyA100-AsnA102)**	**H_2O-33**
1	geschlossene Konformation	gelöscht
2	geschlossene Konformation	fixiert
3	geschlossene Konformation	enthalten
4	offene Konformation	fixiert

6. Anhang

6.1. Sequenzen

IpgC

KSDLVPR*GSHMRGS MSLNITENES ISTAVIDAIN SGATLKDINA IPDDMMDDIY
SYAYDFYNKG RIEEAEVFFR FLCIYDFYNV DYIMGLAAIY QIKEQFQQAA DLYAVAFALG
KNDYTPVFHT GQCQLRLKAP LKAKECFELV IQHSNDEKLK IKAQSYLDAI QDIKE

IpgC0,-4S

MGSMYPR*G MSLNITENES ISTAVIDAIN SGATLKDINA IPDDMMDDIY SYAYDFYNKG
RIEEAEVFFR FLCIYDFYNV DYIMGLAAIY QIKEQFQQAA DLYAVAFALG KNDYTPVFHT
GQCQLRLKAP LKAKECFELV IQHSNDEKLK IKAQSYLDAI Q

IpgC-9,-4S

MGSMYPR*GS ISTAVIDAIN SGATLKDINA IPDDMMDDIY SYAYDFYNKG
RIEEAEVFFR FLCIYDFYNV DYIMGLAAIY QIKEQFQQAA DLYAVAFALG KNDYTPVFHT
GQCQLRLKAP LKAKECFELV IQHSNDEKLK IKAQSYLDAI Q

Spa13 (in pMAL-c5x und pGEX-6P-mod)

LEVLFQ*GPH MKQLDKVLKI KDKYQRSVKL IEAHILTLKK KNSLYRDVEA LDKRIIYFLQ
LENDLEPVGA QSVSQLFNTR RKIAIVKKHI IQYQSERILL KGRIEEIQKD IDEANASKRK
LLHKESKICK RIGLIKRNNF AKQLILDELS QEDMKYGIR

Spa13 (in pETDuet)

HH HHHHSQDPNS LEVLFQ*GPH MKQLDKVLKI KDKYQRSVKL IEAHILTLKK
KNSLYRDVEA LDKRIIYFLQ LENDLEPVGA QSVSQLFNTR RKIAIVKKHI
IQYQSERILL KGRIEEIQKD IDEANASKRK LLHKESKICK RIGLIKRNNF
AKQLILDELS QEDMKYGIR

Abbildung 6.1-1: Aminosäure-Sequenzen der Zielproteine IpgC und Spa13. *Verwendet wird der Einbuchstaben-code.*

6.2. TSA-Daten

Tabelle 6.2-1: Ermittelte Schmelzpunkte für IpgC-9,-4S und die 96er Fragment-Bibliothek.

JENA-ID	T_m [°C]	JENA-ID	T_m [°C]	JENA-ID	T_m [°C]	JENA-ID	T_m [°C]
1	50.37	**25**	48.92	**49**	47.70	**73**	-
2	50.16	**26**	49.89	**50**	50.50	**74**	50.38
3	48.02	**27**	50.11	**51**	50.44	**75**	45.88
4	50.64	**28**	50.48	**52**	50.60	**76**	50.64
5	50.48	**29**	50.32	**53**	50.34	**77**	50.85
6	48.39	**30**	49.30	**54**	-	**78**	50.74
7	49.63	**31**	50.11	**55**	50.44	**79**	50.80
8	50.16	**32**	50.21	**56**	50.60	**80**	50.58
9	50.16	**33**	-	**57**	49.90	**81**	51.12
10	49.95	**34**	49.05	**58**	50.50	**82**	50.66
11	47.05	**35**	47.98	**59**	50.60	**83**	50.12
12	50.37	**36**	49.91	**60**	50.92	**84**	49.80
13	50.37	**37**	50.60	**61**	50.76	**85**	50.71
14	49.84	**38**	50.18	**62**	50.60	**86**	50.71
15	50.48	**39**	50.44	**63**	50.71	**87**	50.23
16	50.80	**40**	48.46	**64**	50.63	**88**	50.80
17	50.37	**41**	50.66	**65**	50.60	**89**	50.39
18	50.53	**42**	48.34	**66**	49.69	**90**	50.28
19	49.63	**43**	50.66	**67**	50.66	**91**	50.71
20	50.43	**44**	50.50	**68**	50.71	**92**	50.60
21	50.43	**45**	49.42	**69**	50.34	**93**	50.76
22	50.32	**46**	50.50	**70**	50.71	**94**	50.55
23	49.57	**47**	50.44	**71**	50.66	**95**	50.76
24	49.95	**48**	49.21	**72**	50.55	**96**	50.71

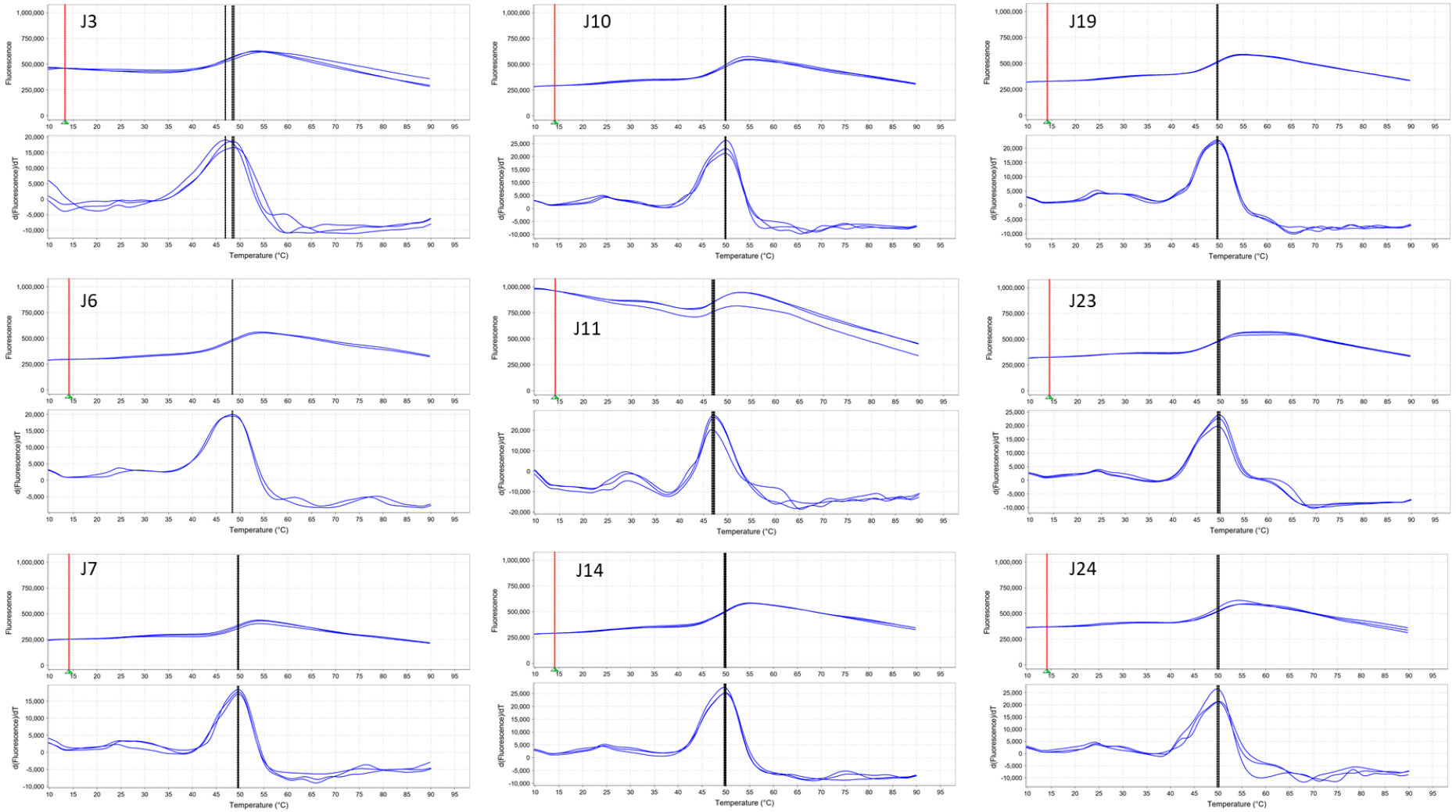


Abbildung 6.2-1: Schmelzkurven der Fragmente, die den Schmelzpunkt des Proteins im TSA signifikant absenkten. *Oben ist jeweils die Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen mit dem Schmelzpunkt des Proteins als Wendepunkt der Kurve. Die Messung wurde bei 10 °C begonnen und in 0.05 °C/s auf 90 °C erhöht. Unten ist jeweils die erste Ableitung der Schmelzkurve mit dem Schmelzpunkt des Proteins als Maximum der Kurve dargestellt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen (Ausnahme: Doppelbestimmung bei **J6**) durchgeführt.*

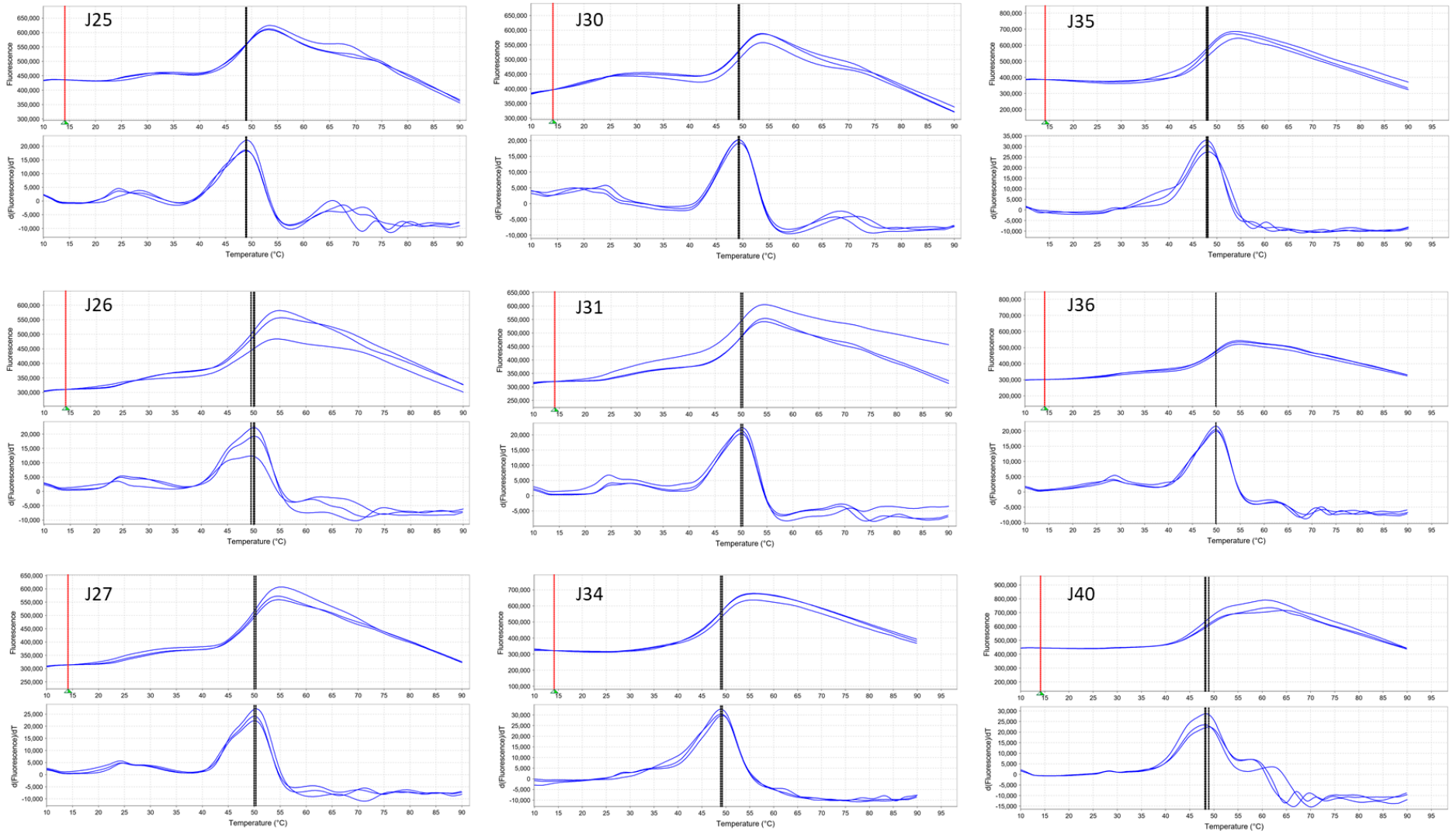


Abbildung 6.2-1: Schmelzkurven der Fragmente, die den Schmelzpunkt des Proteins im TSA signifikant absenkten. *Oben ist jeweils die Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen mit dem Schmelzpunkt des Proteins als Wendepunkt der Kurve. Die Messung wurde bei 10 °C begonnen und in 0.05 °C/s auf 90 °C erhöht. Unten ist jeweils die erste Ableitung der Schmelzkurve mit dem Schmelzpunkt des Proteins als Maximum der Kurve dargestellt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.*

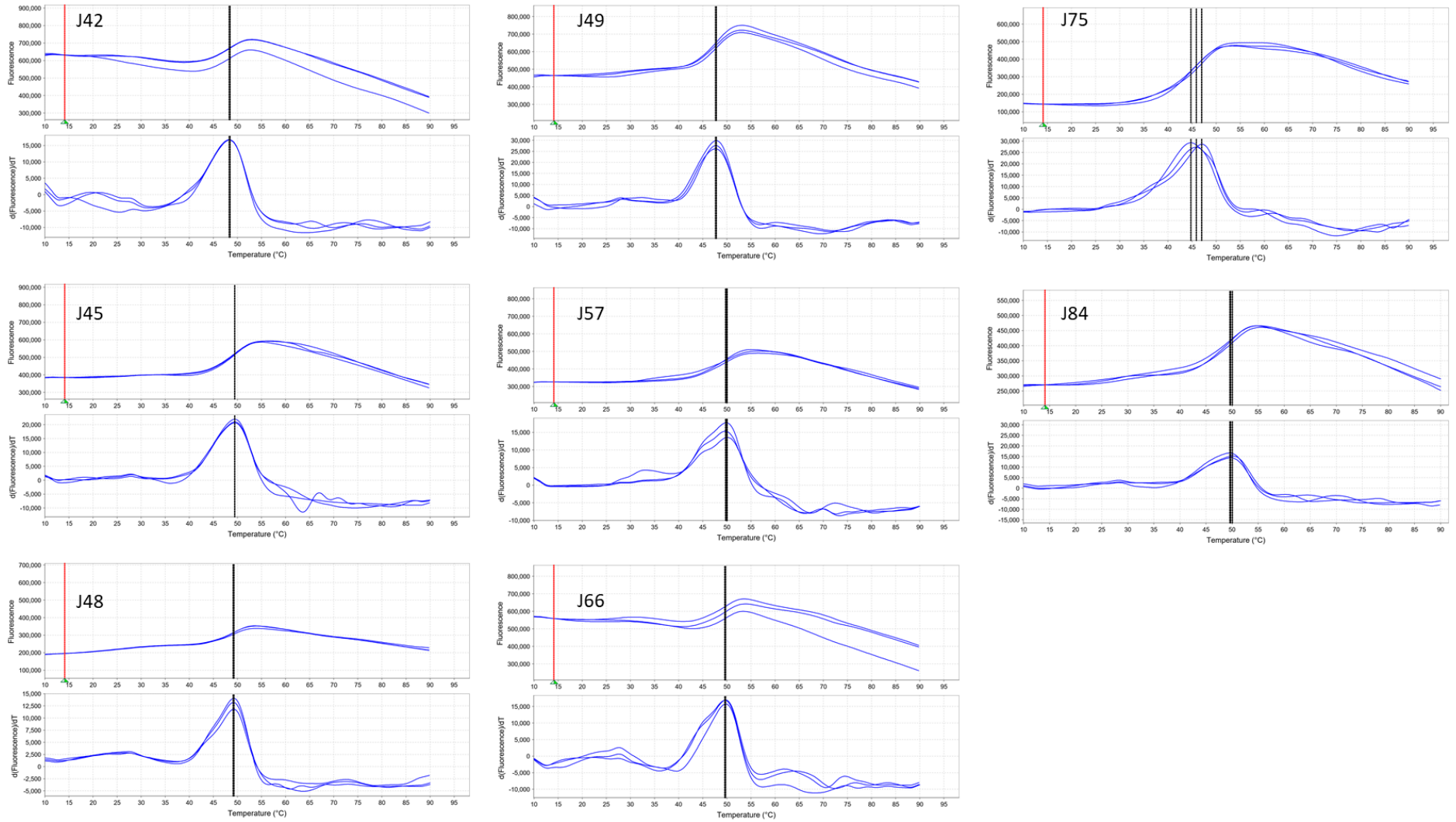


Abbildung 6.2-1: Schmelzkurven der Fragmente, die den Schmelzpunkt des Proteins im TSA signifikant absenkten. *Oben ist jeweils die Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen mit dem Schmelzpunkt des Proteins als Wendepunkt der Kurve. Die Messung wurde bei 10 °C begonnen und in 0.05 °C/s auf 90 °C erhöht. Unten ist jeweils die erste Ableitung der Schmelzkurve mit dem Schmelzpunkt des Proteins als Maximum der Kurve dargestellt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.*

6.3. Kristallographische Tabellen

Tabelle 6.3-1: Kristallographische Tabelle für die Strukturen mit den PDB-Codes 6scb, 7azv und 7axy.

PDB-Code (Ligand) (Struktur-ID)	**6scb (*Apo*-Struktur)** (mlm23)	**7azv (J33)** (mlf06)	**7axy (J20)** (mlf11)
Datensammlung und Prozessierung			
Anzahl genutzter Kristalle	1	1	1
Beamline (BESSY II)	14.1	14.2	14.1
Wellenlänge [Å]	0.9184	0.9184	0.9184
Raumgruppe	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$
Einheitszellparameter			
a [Å]	57.6	58.4	57.5
b [Å]	57.6	58.4	57.5
c [Å]	160.0	155.0	159.4
MATTHEWS Koeffizient [Å³/Da][a]	2.4	2.3	2.3
Lösungsmittelgehalt [%][a]	47.7	47.5	47.3
Diffraktionsdaten[b]			
Auflösungsbereich [Å]	47.59-1.58 (1.66-1.58)	48.06-1.68 (1.77-1.68)	47.55-1.63 (1.72-1.63)
symmetrieunabhängige Reflexe	43023 (6816)	35809 (5690)	38957 (6172)
$CC_{1/2}$ [%]	99.9 (90.6)	99.9 (78.6)	99.9 (85.3)
$R(I)_{sym}$ [%]	5.5 (57.0)	5.9 (84.3)	5.1 (70.0)
Vollständigkeit [%]	99.6 (99.4)	99.9 (99.8)	99.4 (99.0)
Redundanz	4.9 (4.7)	7.1 (7.3)	5.5 (5.3)
$I/\sigma(I)$	16.6 (2.4)	19.1 (2.2)	16.4 (1.8)
Verfeinerung			
Auflösungsbereich [Å]	47.59-1.58	24.95-1.68	42.26-1.63
Anzahl verwendeter Reflexe *(work/free)*	40880/2141	34017/1791	37009/1948
R_{free} [%]	21.5	20.8	23.0
R_{work} [%]	17.5	17.9	19.7
Aminosäuren (Kette A/Kette B)	128/142	142/133	127/136
Ligandatome	-	24	13
Wassermoleküle	251	205	183
RMSD – idealisierte Werte			
Bindungslängen [Å]	0.008	0.009	0.006
Bindungswinkel [°]	1.0	0.9	0.8
Ramachandran-Auftragung [%][c] (Kette A/Kette B)			
favorisierte Regionen	93.2/93.9	93.9/93.4	92.4/93.6
zusätzlich erlaubte Regionen	6.4/6.1	5.3/5.7	6.8/6.4
tolerierbare Regionen	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
unerlaubte Regionen	0.0/0.0	0.8/0.8	0.8/0.0
mittlere *B*-Faktoren [Å²][d]			
Protein	25.2	29.2	30.3
Ligand	-	34.7/39.8	33.4
Wassermoleküle	33.2	37.6	41.3

[a] Diese Werte wurden mit *MATTPROB* bestimmt.[119,154,155]; [b] Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale; [c] Diese Werte wurden mit *PROCHECK* bestimmt.[149]; [d] Diese Werte wurden mit *MOLEMAN* bestimmt.[150]

Tabelle 6.3-2: Kristallographische Tabelle für die Strukturen mit den PDB-Codes 7b1u, 7nl8 und 7o6s.

PDB-Code (Ligand) (Struktur-ID)	**7b1u (J11)** (mlf18)	**7nl8 (J1)** (mlf26)	**7o6s (J6)** (mlf27)
Datensammlung und Prozessierung			
Anzahl genutzter Kristalle	1	1	1
Beamline (BESSY II)	14.1	14.1	14.1
Wellenlänge [Å]	0.9184	0.9184	0.9184
Raumgruppe	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$
Einheitszellparameter			
a [Å]	57.4	57.5	57.7
b [Å]	57.4	57.5	57.7
c [Å]	159.2	159.5	159.5
MATTHEWS Koeffizient [Å³/Da][a]	2.3	2.3	2.4
Lösungsmittelgehalt [%][a]	47.1	47.3	47.7
Diffraktionsdaten[b]			
Auflösungsbereich [Å]	47.47-1.59 (1.68-1.59)	47.56-1.59 (1.67-1.59)	49.91-1.58 (1.66-1.58)
symmetrieunabhängige Reflexe	41739 (6654)	42121 (6695)	43093 (6793)
$CC_{1/2}$ [%]	99.7 (86.5)	100.0 (93.2)	99.9 (91.5)
$R(I)_{sym}$ [%]	7.3 (77.3)	4.5 (80.0)	5.9 (69.0)
Vollständigkeit [%]	99.5 (99.4)	99.6 (99.2)	99.6 (99.3)
Redundanz	5.5 (5.3)	7.6 (7.8)	7.6 (7.8)
$I/\sigma(I)$	11.4 (1.8)	24.1 (2.5)	18.8 (2.6)
Verfeinerung			
Auflösungsbereich [Å]	47.49-1.59	47.58-1.59	47.64-1.58
Anzahl verwendeter Reflexe *(work/free)*	39652/2087	40014/2106	40938/2155
R_{free} [%]	22.3	21.9	22.4
R_{work} [%]	19.3	19.1	19.1
Aminosäuren (Kette A/Kette B)	128/142	129/142	137/142
Ligandatome	17	11	16
Wassermoleküle	177	181	192
RMSD – idealisierte Werte			
Bindungslängen [Å]	0.005	0.005	0.009
Bindungswinkel [°]	0.8	0.7	1.0
Ramachandran-Auftragung [%][c] (Kette A/Kette B)			
favorisierte Regionen	92.4/93.2	93.3/94.7	92.9/92.4
zusätzlich erlaubte Regionen	6.7/6.8	6.7/4.5	7.1/6.8
tolerierbare Regionen	0.0/0.0	0.0/0.8	0.0/0.0
unerlaubte Regionen	0.8/0.0	0.0/0.0	0.0/0.8
mittlere *B*-Faktoren [Å²][d]			
Protein	31.2	28.7	27.4
Ligand	38.1	39.0	36.8
Wassermoleküle	41.8	39.0	36.2

[a] Diese Werte wurden mit *MATTPROB* bestimmt.[119,154,155]; [b] Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale; [c] Diese Werte wurden mit *PROCHECK* bestimmt.[149]; [d] Diese Werte wurden mit *MOLEMAN* bestimmt.[150]

Tabelle 6.3-3: Kristallographische Tabelle für die Strukturen mit den PDB-Codes 7ayw, 7o04 und 7nrg.

PDB-Code (Ligand) (Struktur-ID)	**7ayw (J2)** (mlf28)	**7o04 (J36)** (mlf44)	**7nrg (J45)** (mlf78)
Datensammlung und Prozessierung			
Anzahl genutzter Kristalle	1	1	1
Beamline (BESSY II)	14.1	14.2	14.1
Wellenlänge [Å]	0.9184	0.9184	0.9184
Raumgruppe	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$
Einheitszellparameter			
a [Å]	56.8	58.2	57.9
b [Å]	56.8	58.2	57.9
c [Å]	162.0	155.2	159.1
MATTHEWS Koeffizient [Å³/Da][a]	2.3	2.2	2.4
Lösungsmittelgehalt [%][a]	46.6	44.5	47.9
Diffraktionsdaten[b]			
Auflösungsbereich [Å]	49.18-1.78 (1.88-1.78)	47.90-1.69 (1.78-1.69)	47.81-1.57 (1.65-1.57)
symmetrieunabhängige Reflexe	29962 (4751)	35016 (5519)	44125 (6947)
$CC_{1/2}$ [%]	99.9 (80.4)	99.9 (76.7)	99.9 (84.8)
$R(I)_{sym}$ [%]	7.0 (78.4)	9.9 (105.7)	5.4 (78.2)
Vollständigkeit [%]	99.9 (99.7)	99.9 (99.5)	99.8 (99.3)
Redundanz	7.5 (7.5)	10.0 (10.3)	7.6 (7.8)
$I/\sigma(I)$	17.3 (2.5)	15.6 (2.0)	20.8 (2.4)
Verfeinerung			
Auflösungsbereich [Å]	47.08-1.78	26.42-1.74	47.83-1.57
Anzahl verwendeter Reflexe *(work/free)*	28463/1499	30517/1607	41920/2207
R_{free} [%]	22.8	22.1	20.5
R_{work} [%]	18.0	17.8	18.2
Aminosäuren (Kette A/Kette B)	138/143	142/131	137/140
Ligandatome	20	11	11
Wassermoleküle	185	192	132
RMSD – idealisierte Werte			
Bindungslängen [Å]	0.009	0.008	0.008
Bindungswinkel [°]	1.0	0.8	0.9
Ramachandran-Auftragung [%][c] (Kette A/Kette B)			
favorisierte Regionen	93.7/90.2	93.9/95.0	94.5/93.8
zusätzlich erlaubte Regionen	5.5/9.8	6.1/5.0	5.5/6.2
tolerierbare Regionen	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
unerlaubte Regionen	0.8/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
mittlere *B*-Faktoren [Å²][d]			
Protein	30.2	25.4	27.1
Ligand	30.7/36.3	32.1	32.8
Wassermoleküle	37.2	33.0	36.2

[a] Diese Werte wurden mit *MATTPROB* bestimmt.[119,154,155]; [b] Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale; [c] Diese Werte wurden mit *PROCHECK* bestimmt.[149]; [d] Diese Werte wurden mit *MOLEMAN* bestimmt.[150]

Tabelle 6.3-4: Kristallographische Tabelle für die Strukturen mit den PDB-Codes 7nhw, 7pe0 und 7pef.

PDB-Code (Ligand) (Struktur-ID)	**7nhw (J66)** (mlf126)	**7pe0 (J52)** (mlf163_2)	**7pef (DMSO)** (mlf234)
Datensammlung und Prozessierung			
Anzahl genutzter Kristalle	1	1	1
Beamline (BESSY II)	14.2	14.1	14.2
Wellenlänge [Å]	0.9184	0.9184	0.8266
Raumgruppe	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$
Einheitszellparameter			
a [Å]	57.5	57.6	57.5
b [Å]	57.5	57.6	57.5
c [Å]	159.5	159.6	159.5
MATTHEWS Koeffizient [Å³/Da][a]	2.3	2.4	2.3
Lösungsmittelgehalt [%][a]	47.3	47.6	47.3
Diffraktionsdaten[b]			
Auflösungsbereich [Å]	49.81-1.92 (2.03-1.92)	47.64-1.50 (1.58-1.50)	47.52 -1.54 (1.62-1.54)
symmetrieunabhängige Reflexe	24220 (3785)	50323 (7975)	46180 (7299)
$CC_{1/2}$ [%]	99.9 (96.8)	99.9 (87.3)	99.9 (89.1)
$R(I)_{sym}$ [%]	9.8 (79.7)	5.4 (87.9)	6.3 (89.0)
Vollständigkeit [%]	100.0 (99.8)	99.9 (99.5)	99.7 (99.1)
Redundanz	19.6 (20.3)	10.7 (11.0)	9.7 (10.2)
$I/\sigma(I)$	21.4 (3.6)	19.8 (2.2)	19.9 (2.2)
Verfeinerung			
Auflösungsbereich [Å]	26.87-1.92	47.64-1.50	47.52-1.54
Anzahl verwendeter Reflexe *(work/free)*	23008/1211	47701/2517	43918/2309
R_{free} [%]	23.7	18.5	18.4
R_{work} [%]	19.2	17.4	16.1
Aminosäuren (Kette A/Kette B)	128/142	128/142	128/142
Ligandatome	11	16	8
Wassermoleküle	135	162	170
RMSD – idealisierte Werte			
Bindungslängen [Å]	0.006	0.009	0.009
Bindungswinkel [°]	0.7	1.2	1.2
Ramachandran-Auftragung [%][c] (Kette A/Kette B)			
favorisierte Regionen	94.1/92.4	91.6/92.4	93.3/93.2
zusätzlich erlaubte Regionen	5.9/6.8	8.4/7.6	5.9/6.8
tolerierbare Regionen	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
unerlaubte Regionen	0.0/0.8	0.0/0.0	0.8/0.0
mittlere *B*-Faktoren [Å²][d]			
Protein	35.5	29.6	25.5
Ligand	49.6	32.7	25.6
Wassermoleküle	42.5	36.7	30.7

[a] Diese Werte wurden mit *MATTPROB* bestimmt.[119,154,155]; [b] Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale; [c] Diese Werte wurden mit *PROCHECK* bestimmt.[149]; [d] Diese Werte wurden mit *MOLEMAN* bestimmt.[150]

Tabelle 6.3-5: Kristallographische Tabelle für die Strukturen mit den PDB-Codes 7owv und 7p42 und der Struktur-ID „mlu32“.

PDB-Code (Ligand) (Struktur-ID)	**7owv (U11)** (mlu37)	**7p42 (U09)** (mlu33)	**nicht deponiert (U08)** (mlu32)
Datensammlung und Prozessierung			
Anzahl genutzter Kristalle	1	1	1
Beamline (BESSY II)	14.1	14.1	14.1
Wellenlänge [Å]	0.9184	0.9184	0.9184
Raumgruppe	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$
Einheitszellparameter			
a [Å]	57.6	57.6	57.6
b [Å]	57.6	57.6	57.6
c [Å]	159.9	159.1	159.9
MATTHEWS Koeffizient [Å³/Da][a]	2.4	2.3	2.4
Lösungsmittelgehalt [%][a]	47.7	47.4	47.7
Diffraktionsdaten[b]			
Auflösungsbereich [Å]	47.77-1.59 (1.68-1.59)	47.62-1.50 (1.58-1.50)	47.63-1.41 (1.48-1.41)
symmetrieunabhängige Reflexe	42465 (6615)	50007 (7774)	60567 (9444)
$CC_{1/2}$ [%]	99.9 (89.3)	99.9 (91.1)	99.9 (92.0)
$R(I)_{sym}$ [%]	4.9 (82.1)	5.5 (79.5)	5.8 (86.5)
Vollständigkeit [%]	99.5 (97.5)	99.3 (97.1)	99.6 (97.8)
Redundanz	9.6 (9.9)	10.7 (10.3)	10.8 (10.9)
$I/\sigma(I)$	21.3 (2.1)	22.4 (2.8)	18.7 (2.3)
Verfeinerung			
Auflösungsbereich [Å]	36.54-1.59	31.13-1.50	-
Anzahl verwendeter Reflexe *(work/free)*	40341/2124	47505/2501	-
R_{free} [%[	22.0	21.9	-
R_{work} [%]	18.8	19.7	-
Aminosäuren (Kette A/Kette B)	138/140	136/142	-
Ligandatome	15	18	-
Wassermoleküle	156	216	-
RMSD – idealisierte Werte			
Bindungslängen [Å]	0.006	0.006	-
Bindungswinkel [°]	0.8	0.8	-
Ramachandran-Auftragung [%][c] (Kette A/Kette B)			
favorisierte Regionen	93.0/93.0	93.7/93.9	-
zusätzlich erlaubte Regionen	6.3/7.0	5.6/5.3	-
tolerierbare Regionen	0.0/0.0	0.0/0.8	-
unerlaubte Regionen	0.8/0.0	0.8/0.0	-
mittlere *B*-Faktoren [Å²][d]			
Protein	36.1	26.1	-
Ligand	34.3	43.9	-
Wassermoleküle	43.6	36.9	-

[a] Diese Werte wurden mit *MATTPROB* bestimmt.[119,154,155]; [b] Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale; [c] Diese Werte wurden mit *PROCHECK* bestimmt.[149]; [d] Diese Werte wurden mit *MOLEMAN* bestimmt.[150]

6.4. *HYDE-Coloring* für weitere *Follow-up*-Verbindungen

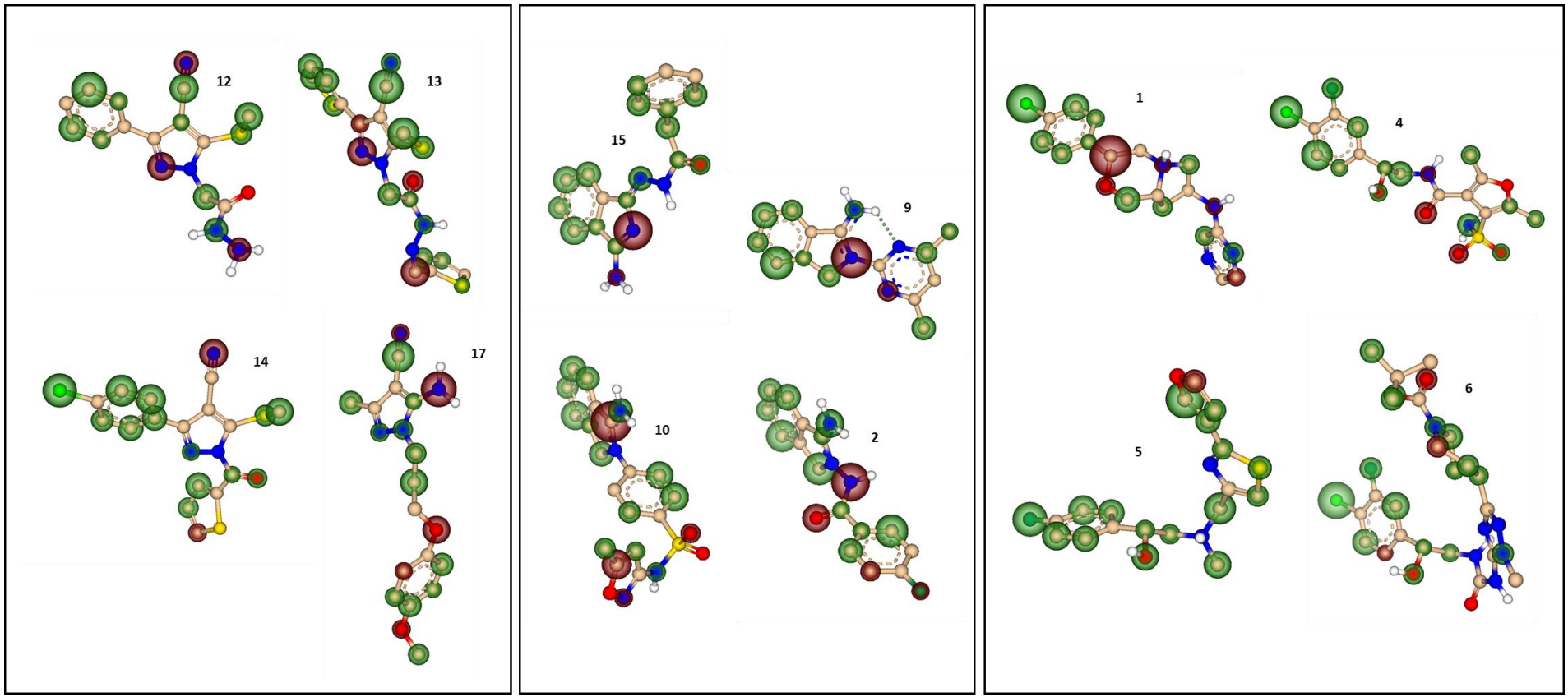


Abbildung 6.4-1: **HYDE-Coloring *für weitere* Follow-up-*Verbindungen.*** *Die* Follow-up-*Verbindungen sind als Kugel-Stab-Modelle gezeigt. C-Atome sind beige, N-Atome blau, O-Atome rot, S-Atome gelb, Cl-Atome hellgrün, F-Atome dunkelgrün und H-Atome weiß. Atome, die einen positiven Beitrag zur geschätzten Bindungsaffinität leisten, besitzen grüne Kugeln um das Atom herum, Atome, die einen negativen Beitrag leisten, besitzen braune Kugeln um das Atom herum. Die Größe der Kugel hängt von der Größe des positiven bzw. negativen Beitrags zur Bindungsenergie ab. Dies wird als* HYDE-Coloring *bezeichnet. Intramolekulare H-Brücken sind als grün gestrichelte Linien dargestellt. Von links nach rechts:* Follow-up-*Verbindungen aufbauend auf* ***J20****,* ***J2*** *und* ***J45****.*

6.5. *B*-Werte nach Verfeinerung der Struktur „mlu32“ mit U08

Tabelle 6.5-1: **B-*Werte und Besetzung der Atome von U08 und weiterer Atome nach der Verfeinerung.***

Atom-Bezeichnung	Molekül mit Konformation A, B bzw. C	Kette	Besetzung [%]	*B*-Werte [Å²]
O	AHOH	D 197	54	20.41
O	AHOH	D 198	54	37.85
N	CU08	C 1	46	30.74
C	CU08	C 1	46	48.78
O	CU08	C 1	46	80.26
C1	CU08	C 1	46	31.77
C2	CU08	C 1	46	31.03
C3	CU08	C 1	46	30.95
C4	CU08	C 1	46	28.17
C5	CU08	C 1	46	22.97
C6	CU08	C 1	46	35.37
C7	CU08	C 1	46	31.25
N1	CU08	C 1	46	31.88
Cl	CU08	C 1	46	26.89
O	ADMS	G 2	27	19.11
C1	ADMS	G 2	27	43.14
C2	ADMS	G 2	27	26.78
S	ADMS	G 2	27	24.78
O	BDMS	G 2	27	38.87
C1	BDMS	G 2	27	28.47
C2	BDMS	G 2	27	24.77

Literaturverzeichnis

1. Agerberth, B. *et al.* Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to Shigella dysenteriae type 1. *World Heal. Organ.* 1–70 (2005).
2. Williams, P. C. M. & Berkley, J. A. Guidelines for the treatment of dysentery (shigellosis): a systematic review of the evidence. *Paediatr. Int. Child Health* **38**, 50–65 (2018).
3. Levine, M. M., Kotloff, K. L., Barry, E. M., Pasetti, M. F. & Sztein, M. B. Clinical trials of Shigella vaccines: Two steps forward and one step back on a long, hard road. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 540–553 (2007).
4. Schroeder, G. N. & Hilbi, H. Molecular pathogenesis of Shigella spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 134–156 (2008).
5. Trofa, A. F., Ueno-Olsen, H., Oiwa, R. & Yoshikawa, M. Dr. Kiyoshi Shiga: Discoverer of the dysentery bacillus. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 1303–1306 (1999).
6. Donohue-Rolfe, A., Acheson, D. W. K. & Keusch, G. T. Shiga Toxin: Purification, Structure, and Function. *Rev. Infect. Dis.* **13**, 293–297 (1991).
7. Mounier, J., Vasselon, T., Hellio, R., Lesourd, M. & Sansonetti, P. J. Shigella flexneri enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole. *Infect. Immun.* **60**, 237–248 (1992).
8. Sansonetti, P. J. & Phalipon, A. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: Mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin. Immunol.* **11**, 193–203 (1999).
9. Zychlinsky, A., Prevost, M. C. & Sansonetti, P. J. Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* **358**, 167–169 (1992).
10. Hilbi, H., Chen, Y., Thirumalai, K. & Zychlinsky, A. The interleukin 1β-converting enzyme, caspase 1, is activated during Shigella flexneri-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* **65**, 5165–5170 (1997).
11. Sansonetti, P. J., Arondel, J., Huerre, M., Harada, A. & Matsushima, K. Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis. *Infect. Immun.* **67**, 1471–1480 (1999).
12. Sansonetti, P. J. Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **280**, 319–323 (2001).
13. Gerlach, R. G. & Hensel, M. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**, 401–415 (2007).
14. Costa, T. R. D. *et al.* Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 343–359 (2015).
15. Parsot, C., Hamiaux, C. & Page, A. L. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 7–14 (2003).

16. Cherradi, Y., Hachani, A. & Allaoui, A. Spa13 of Shigella flexneri has a dual role: Chaperone escort and export gate-activator switch of the type III secretion system. *Microbiology* **160**, 130–141 (2014).

17. Burgess, J. L. *et al.* Spa47 is an oligomerization-activated type three secretion system (T3SS) ATPase from Shigella flexneri. *Protein Sci.* **25**, 1037–1048 (2016).

18. Parsot, C. *et al.* A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in Shigella flexneri. *Mol. Microbiol.* **56**, 1627–1635 (2005).

19. Muthuramalingam, M., Whittier, S. K., Picking, W. L. & Picking, W. D. The shigella type iii secretion system: An overview from top to bottom. *Microorganisms* **9**, 1–26 (2021).

20. Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J. & Zhao, X. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 385–392 (2008).

21. Wright, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1451–1470 (2005).

22. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 42–51 (2015).

23. Kotloff, K. L. *et al.* A modified Shigella volunteer challenge model in which the inoculum is administered with bicarbonate buffer: clinical experience and implications for Shigella infectivity. *Vaccine* **13**, 1488–1494 (1995).

24. Dupont, H. L. *et al.* Immunity in Shigellosis. II. Protection Induced by Oral Live Vaccine or Primary Infection. *J. Infect. Dis.* **125**, 12–16 (1972).

25. Formal, S. B. *et al.* Effect of prior infection with virulent shigella flexneri 2a on the resistance of monkeys to subsequent infection with shigella sonnei. *J. Infect. Dis.* **164**, 533–537 (1991).

26. Mani, S., Wierzba, T. & Walker, R. I. Status of vaccine research and development for Shigella. *Vaccine* **34**, 2887–2894 (2016).

27. Liu, B. *et al.* Structure and genetics of Shigella O antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 627–653 (2008).

28. Kotloff, K. L. *et al.* Safety and immunogenicity of CVD 1208S, a live, oral ΔguaBA Δsen Δset Shigella flexneri 2a vaccine grown on animal-free media. *Hum. Vaccin.* **3**, 268–275 (2007).

29. Orr, N. *et al.* Community-based safety, immunogenicity, and transmissibility study of the Shigella sonnei WRSS1 vaccine in Israeli volunteers. *Infect. Immun.* **73**, 8027–8032 (2005).

30. Rappuoli, R. Glycoconjugate vaccines: Principles and mechanisms. *Sci. Transl. Med.* **10**, 1–7 (2018).

31. Bélot, F., Guerreiro, C., Baleux, F. & Mulard, L. A. Synthesis of two linear PADRE conjugates bearing a deca- or pentadecasaccharide B epitope as potential synthetic vaccines against Shigella flexneri serotype 2a infection. *Chem. - A Eur. J.* **11**, 1625–1635 (2005).

32. Ravenscroft, N. *et al.* Characterization and immunogenicity of a Shigella flexneri 2a O-antigen bioconjugate vaccine candidate. *Glycobiology* **29**, 669–681 (2019).

33. Turbyfill, K. R., Kaminski, R. W. & Oaks, E. V. Immunogenicity and efficacy of highly purified invasin complex vaccine from Shigella flexneri 2a. *Vaccine* **26**, 1353–1364 (2008).

34. Turbyfill, K. R., Clarkson, K. A., Vortherms, A. R., Oaks, E. V. & Kaminski, R. W. Assembly, Biochemical Characterization, Immunogenicity, Adjuvanticity, and Efficacy of Shigella Artificial Invaplex. *mSphere* **3**, 1–18 (2018).

35. Gerke, C. *et al.* Production of a Shigella sonnei vaccine based on generalized modules for membrane antigens (GMMA), 1790GAHB. *PLoS One* **10**, 1–22 (2015).

36. Wilkins, M. R. *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol. Biol.* **112**, 531–552 (1999).

37. Lunelli, M., Lokareddy, R. K., Zychlinsky, A. & Kolbe, M. IpaB-IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 9661–9666 (2009).

38. Das, A. K., Cohen, P. T. W. & Barford, D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: Implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* **17**, 1192–1199 (1998).

39. Cerveny, L. *et al.* Tetratricopeptide repeat motifs in the world of bacterial pathogens: Role in virulence mechanisms. *Infect. Immun.* **81**, 629–635 (2013).

40. Lokareddy, R. K., Lunelli, M., Eilers, B., Wolter, V. & Kolbe, M. Combination of two separate binding domains defines stoichiometry between type III secretion system chaperone IpgC and translocator protein IpaB. *J. Biol. Chem.* **285**, 39965–39975 (2010).

41. Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G. & Wyckoff, H. A Three-dimensional Model of the Myoglobin Molecule obtained by X-ray Analysis. *Nature* **181**, 662–666 (1958).

42. McPherson, A. & Gavira, J. A. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **70**, 2–20 (2014).

43. Friedrich, W., Knipping, P. & Laue, M. Interferenzerscheinungen bei Röntgenstrahlen. *Verlag der Königlich Bayer. Akad. der Wissenschaften* 971–988 (1912).

44. Bragg, W. H. & Bragg, W. L. The Reflection of X-rays by Crystals. *Nature* **91**, 428–438 (1913).

45. Taylor, G. L. Introduction to phasing. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 325–338 (2010).

46. Darwin, C. G. XCII. The reflexion of X-rays from imperfect crystals. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **43**, 800–829 (1922).

47. Parsons, S. Introduction to twinning. *Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.* **59**, 1995–2003 (2003).

48. Campeotto, I. *et al.* Pathological macromolecular crystallographic data affected by twinning, partial-disorder and exhibiting multiple lattices for testing of data processing and refinement tools. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).

49. Dauter, Z. Twinned crystals and anomalous phasing. *Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.* **59**, 2004–2016 (2003).

50. Surabhi & Singh, B. K. Computer aided drug design: an overview. *J. Drug Deliv. Ther.* **8**, 504–509 (2018).

51. Shi, Y. & von Itzstein, M. How size matters: Diversity for fragment library design. *Molecules* **24**, 1–10 (2019).

52. de Souza Neto, L. R. *et al.* In silico Strategies to Support Fragment-to-Lead Optimization in Drug Discovery. *Front. Chem.* **8**, 1–18 (2020).

53. Erlanson, D. A., Fesik, S. W., Hubbard, R. E., Jahnke, W. & Jhoti, H. Twenty years on: The impact of fragments on drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 605–619 (2016).

54. Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P. & Fesik, S. W. Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science* **274**, 1531–1534 (1996).

55. Lo, M. C. *et al.* Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Anal. Biochem.* **332**, 153–159 (2004).

56. Pantoliano, M. W. *et al.* High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J. Biomol. Screen.* **6**, 429–440 (2001).

57. Silvestre, H. L., Blundell, T. L., Abell, C. & Ciulli, A. Integrated biophysical approach to fragment screening and validation for fragment-based lead discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 12984–12989 (2013).

58. Kranz, J. K. & Schalk-Hihi, C. Protein Thermal Shifts to Identify Low Molecular Weight Fragments. *Methods Enzymol.* **493**, 277–298 (2011).

59. Swayze, E. E. *et al.* SAR by MS: A ligand based technique for drug lead discovery against structured RNA targets. *J. Med. Chem.* **45**, 3816–3819 (2002).

60. Ockey, D. A. *et al.* Structure-activity relationships by mass spectrometry: Identification of novel MMP-3 inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **12**, 37–44 (2004).

61. Hofstadler, S. A. & Sannes-Lowery, K. A. Applications of ESI-MS in drug discovery: Interrogation of noncovalent complexes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 585–595 (2006).

62. Neumann, T., Junker, H., Schmidt, K. & Sekul, R. SPR-based Fragment Screening: Advantages and Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 1630–1642 (2007).

63. Navratilova, I. & Hopkins, A. L. Fragment screening by surface plasmon resonance. *ACS Med. Chem. Lett.* **1**, 44–48 (2010).

64. Ladbury, J. E., Klebe, G. & Freire, E. Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 23–27 (2010).

65. Linke, P. *et al.* An Automated Microscale Thermophoresis Screening Approach for Fragment-Based Lead Discovery. *J. Biomol. Screen.* **21**, 414–421 (2016).

66. Schulz, M. N. *et al.* A crystallographic fragment screen identifies cinnamic acid derivatives as starting points for potent Pim-1 inhibitors. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 156–166 (2011).

67. Recht, M. I. *et al.* Fragment-based screening for inhibitors of PDE4A using enthalpy arrays and X-ray crystallography. *J. Biomol. Screen.* **17**, 469–480 (2012).

68. Hartshorn, M. J. *et al.* Fragment-based lead discovery using X-ray crystallography. *J. Med. Chem.* **48**, 403–413 (2005).

69. Glöckner, S., Heine, A. & Klebe, G. A proof-of-concept fragment screening of a hit-validated 96-compounds library against human carbonic anhydrase ii. *Biomolecules* **10**, 1–11 (2020).

70. Schiebel, J. *et al.* Six Biophysical Screening Methods Miss a Large Proportion of Crystallographically Discovered Fragment Hits: A Case Study. *ACS Chem. Biol.* **11**, 1693–1701 (2016).

71. Hassaan, E., Eriksson, P. O., Geschwindner, S., Heine, A. & Klebe, G. Fragments as Novel Starting Points for tRNA-Guanine Transglycosylase Inhibitors Found by Alternative Screening Strategies. *ChemMedChem* **15**, 324–337 (2020).

72. Bollag, G. *et al.* Vemurafenib: The first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 873–886 (2012).

73. Köster, H. *et al.* A Small Nonrule of 3 Compatible Fragment Library Provides High Hit Rate of Endothiapepsin Crystal Structures with Various Fragment Chemotypes. *J. Med. Chem.* **54**, 7784–7796 (2011).

74. Magari, F. The Power of Fragments: FBLD approach to investigate protein structures. (Philipps-Universität Marburg, 2020).

75. Frag Xtal Screen. Kann gefunden werden unter https://www.jenabioscience.com/crystallography-cryo-em/screening/fragment-screen/x-fs-101-frag-xtal-screen, zuletzt geprüft am 13.08.2021.

76. SeeSAR Version 10.1; BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin, Germany, 2019, www.biosolveit.de/SeeSAR

77. Böhm, H. J. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **8**, 243–256 (1994).

78. Klebe, G., Mietzner, T. & Weber, F. Different approaches toward an automatic structural alignment of drug molecules: Applications to sterol mimics, thrombin and thermolysin inhibitors. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **8**, 751–778 (1994).

79. Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T. & Klebe, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.* **261**, 470–489 (1996).

80. Reulecke, I., Lange, G., Albrecht, J., Klein, R. & Rarey, M. Towards an integrated description of hydrogen bonding and dehydration: Decreasing false positives in virtual screening with the HYDE scoring function. *ChemMedChem* **3**, 885–897 (2008).

81. Schneider, N., Lange, G., Hindle, S., Klein, R. & Rarey, M. A consistent description of HYdrogen bond and DEhydration energies in protein-ligand complexes: Methods behind the HYDE scoring function. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **27**, 15–29 (2013).

82. Schneider, N. *et al.* Substantial improvements in large-scale redocking and screening using the novel HYDE scoring function. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **26**, 701–723 (2012).

83. Gurard-Levin, Z. A., Kilian, K. A., Kim, J., Bähr, K. & Mrksich, M. Peptide arrays identify isoform-selective substrates for profiling endogenous lysine deacetylase activity. *ACS Chem. Biol.* **5**, 863–873 (2010).

84. Forsström, B. *et al.* Proteome-wide epitope mapping of antibodies using ultra-dense peptide arrays. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 1585–1597 (2014).

85. Katz, C. *et al.* Studying protein–protein interactions using peptide arrays. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2131–2145 (2011).

86. Frank, R., Heikens, W., Heisterberg-Moutsis, G. & Blöcker, H. A new general approach for the simultaneous chemical synthesis of large numbers of oligonucleotides: Segmental solid supports. *Nucleic Acids Res.* **11**, 4365–4377 (1983).

87. Szymczak, L. C., Kuo, H. Y. & Mrksich, M. Peptide Arrays: Development and Application. *Anal. Chem.* **90**, 266–282 (2018).

88. Deller, M. C., Kong, L. & Rupp, B. Protein stability: A crystallographer's perspective. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Commun.* **72**, 72–95 (2016).

89. Geders, T. W., Gustafson, K. & Finzel, B. C. Use of differential scanning fluorimetry to optimize the purification and crystallization of PLP-dependent enzymes. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **68**, 596–600 (2012).

90. Rupesh, K. R., Smith, A. & Boehmer, P. E. Ligand induced stabilization of the melting temperature of the HSV-1 single-strand DNA binding protein using the thermal shift assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **454**, 604–608 (2015).

91. Choudhary, D., Kumar, A., Magliery, T. J. & Sotomayor, M. Using thermal scanning assays to test protein-protein interactions of inner-ear cadherins. *PLoS One* **12**, 1–20 (2017).

92. Gao, K., Oerlemans, R. & Groves, M. R. Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery. *Biophys. Rev.* **12**, 85–104 (2020).

93. Grimm, C. Röntgenkristallographische Studien an Nukleotidkofaktor-bindenden Enzymen. (Philipps-Universität Marburg, 2001).

94. Kapust, R. B. & Waugh, D. S. Escherichia coli maltose-binding protein is effective in promoting solubility. *Protein Sci.* **8**, 1668–1674 (1999).

95. Mach, H., Middaugh, C. R. & Denslow, N. Determining the Identity and Purity of Recombinant Proteins by UV Absorption Spectroscopy. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **1**, 7.2.1-7.2.21 (1995).

96. Raran-Kurussi, S. & Waugh, D. S. The Ability to Enhance the Solubility of Its Fusion Partners Is an Intrinsic Property of Maltose-Binding Protein but Their Folding Is Either Spontaneous or Chaperone-Mediated. *PLoS One* **7**, 1–10 (2012).

97. Halff, E. F., Versteeg, M., Brondijk, T. H. C. & Huizinga, E. G. When less becomes more: Optimization of protein expression in HEK293-EBNA1 cells using plasmid titration - A case study for NLRs. *Protein Expr. Purif.* **99**, 27–34 (2014).

98. Kintaka, R., Makanae, K. & Moriya, H. Cellular growth defects triggered by an overload of protein localization processes. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).

99. Jones, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**, 195–202 (1999).

100. Lorenzini, E. *et al.* Structure and Protein-Protein Interaction Studies on Chlamydia trachomatis Protein CT670 (YscO Homolog). *J. Bacteriol.* **192**, 2746–2756 (2010).

101. Romo-Castillo, M. *et al.* EscO, a Functional and Structural Analog of the Flagellar FliJ Protein, Is a Positive Regulator of EscN ATPase Activity of the Enteropathogenic Escherichia coli Injectisome. *J. Bacteriol.* **196**, 2227–2241 (2014).

102. Hasewinkel, C. Klonierung und Expression von Shigella-Pathogenitätsgenen sowie Interaktionsstudien mit ihren Produkten. (Philipps-Universität Marburg, 2013).

103. Lunelli, M. *et al.* Cryo-EM structure of the Shigella type III needle complex. *PLoS Pathog.* **16**, 1–31 (2020).

104. Langer, G. G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S. & Perrakis, A. Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat. Protoc.* **3**, 1171–1179 (2008).

105. Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V. S. Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 458–463 (1999).

106. Job, V., Matteï, P. J., Lemaire, D., Attree, I. & Dessen, A. Structural basis of chaperone recognition of type III secretion system minor translocator proteins. *J. Biol. Chem.* **285**, 23224–23232 (2010).

107. Discola, K. F. *et al.* Membrane and Chaperone Recognition by the Major Translocator Protein PopB of the Type III Secretion System of Pseudomonas aeruginosa. *J. Biol. Chem.* **289**, 3591–3601 (2014).

108. Ballone, A., Lau, R. A., Zweipfenning, F. P. A. & Ottmann, C. A new soaking procedure for X-ray crystallographic structural determination of protein-peptide complexes. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **76**, 501–507 (2020).

109. Swietnicki, W. *et al.* Novel protein-protein interactions of the Yersinia pestis type III secretion system elucidated with a matrix analysis by surface plasmon resonance and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **279**, 38693–38700 (2004).

110. Gógl, G., Töro, I. & Reményi, A. Protein-peptide complex crystallization: A case study on the ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 486–489 (2013).

111. Price, S. R. & Nagai, K. Protein engineering as a tool for crystallography. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 425–430 (1995).

112. Lawson, D. M. *et al.* Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts. *Nature* **349**, 541–544 (1991).

113. Barta, M. L., Zhang, L., Picking, W. L. & Geisbrecht, B. V. Evidence for alternative quaternary structure in a bacterial Type III secretion system chaperone. *BMC Struct. Biol.* **10**, 1– 10 (2010).

114. Goldschmidt, L., Cooper, D. R., Derewenda, Z. S. & Eisenberg, D. Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants. *Protein Sci.* **16**, 1569–1576 (2007).

115. Bijelic, A. & Rompel, A. Ten Good Reasons for the Use of the Tellurium-Centered Anderson-Evans Polyoxotungstate in Protein Crystallography. *Acc. Chem. Res.* **50**, 1441–1448 (2017).

116. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).

117. Liebschner, D. *et al.* Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: Recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **75**, 861–877 (2019).

118. Jüngel, J. Rekombinante Produktion, Aufreinigung und Kristallisation der Shigella Pathogenitätsfaktoren Spa15, IpgC und OspD1. (Philipps-Universität Marburg, 2016).

119. Matthews, B. W. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497 (1968).

120. Derewenda, Z. S. & Vekilov, P. G. Entropy and surface engineering in protein crystallization. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **62**, 116–124 (2006).

121. Rodríguez-Fernández, L., López-Jaramillo, F. J., Bacher, A., Fischer, M. & Weinkauf, S. Improvement of the quality of lumazine synthase crystals by protein engineering. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **64**, 625–628 (2008).

122. Zhang, F. *et al.* Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* **387**, 206–209 (1997).

123. Derewenda, Z. S. The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. *Methods* **34**, 354–363 (2004).

124. Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797 (2007).

125. Acuner Ozbabacan, S. E., Engin, H. B., Gursoy, A. & Keskin, O. Transient protein-protein interactions. *Protein Eng. Des. Sel.* **24**, 635–648 (2011).

126. Sheriff, S., Hendrickson, W. A. & Smith, J. L. Structure of Myohemerythrin in the Azidomet State at 1.7/1.3 A˚ Resolution. *J. Mol. Biol.* **197**, 273–296 (1987).

127. Sheriff, S. Some Methods for Examining the Interactions between Two Molecules. *Immunomethods* **3**, 191–196 (1993).

128. Büttner, C. R., Sorg, I., Cornelis, G. R., Heinz, D. W. & Niemann, H. H. Structure of the Yersinia enterocolitica Type III Secretion Translocator Chaperone SycD. *J. Mol. Biol.* **375**, 997–1012 (2008).

129. Hol, W. I. M. G. J. Effects of the a-Helix Dipole upon the Functioning and Structure of Proteins and Peptides. **19**, 133–165 (1985).

130. Carugo, O. Buried chloride stereochemistry in the protein data bank. *BMC Struct. Biol.* **14**, 1–7 (2014).

131. ProFit. Kann gefunden werden unter http://www.bioinf.org.uk/servers/profit/, zuletzt geprüft am 13.08.2021.

132. Lima, G. M. A. *et al.* FragMAXapp: Crystallographic fragment-screening data-analysis and project-management system. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **77**, 799–808 (2021).

133. Rosenfeld, R. J. *et al.* Conformational changes in nitric oxide synthases induced by chlorzoxazone and nitroindazoles: Crystallographic and computational analyses of inhibitor potency. *Biochemistry* **41**, 13915–13925 (2002).

134. Adam, P. R. *et al.* Binding affects the tertiary and quaternary structures of the Shigella translocator protein IpaB and its chaperone IpgC. *Biochemistry* **51**, 4062–4071 (2012).

135. Ferrari, M. L., Charova, S. N., Sansonetti, P. J., Mylonas, E. & Gazi, A. D. Structural Insights of Shigella Translocator IpaB and Its Chaperone IpgC in Solution. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 1–11 (2021).

136. Darwin, K. H. & Miller, V. L. Type III secretion chaperone-dependent regulation: Activation of virulence genes by SicA and InvF in Salmonella typhimurium. *EMBO J.* **20**, 1850–1862 (2001).

137. Wienen-Schmidt, B., Oebbeke, M., Ngo, K., Heine, A. & Klebe, G. Two Methods, One Goal: Structural Differences between Cocrystallization and Crystal Soaking to Discover Ligand Binding Poses. *ChemMedChem* **16**, 292–300 (2021).

138. Andreotti, G., Monticelli, M. & Cubellis, M. V. Looking for protein stabilizing drugs with thermal shift assay. *Drug Test. Anal.* **7**, 831–834 (2015).

139. Zhuang, Y., Zhou, X. & Wang, S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Plant Syst. Evol.* **298**, 3389–3402 (2012).

140. SERp Server. Kann gefunden werden unter http://services.mbi.ucla.edu/SER/intro.php, zuletzt geprüft am 13.08.2021.

141. Dauter, Z. Data-collection strategies. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **55**, 1703–1717 (1999).

142. Sparta, K. M., Krug, M., Heinemann, U., Mueller, U. & Weiss, M. S. Xdsapp2.0. *J. Appl. Crystallogr.* **49**, 1085–1092 (2016).

143. McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 (2007).

144. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).

145. Winn, M. D., Murshudov, G. N. & Papiz, M. Z. Macromolecular TLS Refinement in REFMAC at Moderate Resolutions. *Methods Enzymol.* **374**, 300–321 (2003).

146. Yang, H. *et al.* Automated and accurate deposition of structures solved by X-ray diffraction to the Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 1833–1839 (2004).

147. Grade Web Server. Kann gefunden werden unter http://grade.globalphasing.org/cgi-bin/grade/server.cgi, zuletzt geprüft am 13.08.2021.

148. Moriarty, N. W., Grosse-Kunstleve, R. W. & Adams, P. D. Electronic ligand builder and optimization workbench (eLBOW): A tool for ligand coordinate and restraint generation. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **65**, 1074–1080 (2009).

149. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291 (1993).

150. Kleywegt, G. J., Zou, J.-Y., Kjeldgaard, M. & Jones, T. A. MOLEMAN. in *International Tables for Crystallography* (ed. Rossmann, M. G., Arnold, E.) 353– 356 (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2001).

151. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3. Schrödinger, L. L. C.

152. Gelin, B. R. & Karplus, M. Side-Chain Torsional Potentials: Effect of Dipeptide, Protein, and Solvent Environment. *Biochemistry* **18**, 1256–1268 (1979).

153. Bondi, A. van der Waals Volumes and Radii. *J. Phys. Chem.* **68**, 441–451 (1964).

154. Kantardjieff, K. A. & Rupp, B. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci.* **12**, 1865–1871 (2003).

155. Weichenberger, C. X. & Rupp, B. Ten years of probabilistic estimates of biocrystal solvent content: New insights via nonparametric kernel density estimate. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **70**, 1579–1588 (2014).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1-1: Shigellenruhr-Pandemien. ... 1

Abbildung 1.1-2: Epithelzellinvasion der Shigellen. ... 3

Abbildung 1.1-3: Schematische Darstellung des T3SS von *Shigella*. ... 4

Abbildung 1.1-4: IpgC in der Funktion als Co-Aktivator für die Transkription der Gene weiterer Effektoren. ... 5

Abbildung 1.2-1: Dreidimensionale Struktur des IpgC-Monomers. ... 9

Abbildung 1.2-2: Komplexstruktur von IpgC mit der CBD 1 von IpaB. ... 10

Abbildung 1.3-1: Der Weg vom Proteinkristall zur dreidimensionalen Struktur. ... 13

Abbildung 1.4-1: Fragment-basiertes Wirkstoffdesign. ... 15

Abbildung 1.5-1: Vom Fragment-*Hit* zum hochaffinen Liganden. ... 19

Abbildung 1.6-1: Schematischer Ablauf eines Peptid-*Microarrays*. ... 22

Abbildung 1.7-1: Schmelzkurve eines typischen TSA-Experiments. ... 24

Abbildung 3.1-1: Schematische Darstellung der Klonierung von *spa13* unter Verwendung des Expressionsvektors pGEX-6P-mod. ... 28

Abbildung 3.1-2: Schematische Darstellung der Klonierung von *spa13* unter Verwendung des Expressionsvektors pMAL-c5X. ... 29

Abbildung 3.1-3: SDS-PAGE mit Proben der ersten Reinigung von Spa13. ... 30

Abbildung 3.1-4: SDS-PAGE mit Proben einer Aufreinigung von Spa13 unter Verwendung einer Kationenaustauschersäule. ... 31

Abbildung 3.1-5: Chromatogramm der präparativen SEC-75-Säule. ... 32

Abbildung 3.1-6: SDS-PAGE mit Proben der Aufreinigung von Spa13 unter Verwendung einer SEC-Säule. ... 33

Abbildung 3.1-7: Chromatogramm der Anionenaustauschersäule. ... 34

Abbildung 3.1-8: SDS-PAGE mit Proben der Aufreinigung von Spa13 unter Verwendung einer Anionenaustauschersäule. ... 35

Abbildung 3.1-9: Schematische Darstellung der Klonierung von *spa13* unter Verwendung des Expressionsvektors pETDuet-1. ... 36

Abbildung 3.1-10: SDS-PAGE mit Proben der Aufreinigung von His-Spa13 und GST-IpgC0,-4S nach Koproduktion. ... 37

Abbildung 3.2-1: Sekundärstrukturvorhersage von Spa13 mit *PSIPRED*[99]. ... 40

Abbildung 3.2-2: Dreidimensionale Struktur des Spa13-orthologen Proteins CdsO aus *Chlamydia trachomatis* (PDB-Code: 3k29). ... 41

Abbildung 3.3-1: SDS-PAGE mit Proben einer Aufreinigung des Fusionsproteins GST-IpgC0,-4S. ... 43

Abbildung 3.3-2: Detektion des Fusionsproteins mittels SDS-PAGE (links) und Western Blot (rechts). ... 44

Abbildung 3.3-3: Ergebnis des Peptid-*Microarrays*. ... 44

Abbildung 3.4-1: SDS-PAGE mit Proben einer Aufreinigung des IpgC-Volllängenproteins. ... 47

Abbildung 3.5-1: Kristalle durch Kokristallisation von IpgC-9,-4S mit dem Peptid IpaB10 unter Verwendung der von LUNELLI *et al.*[37] publizierten Bedingung. ... 50

Abbildung 3.5-2: Kristalle von IpgC-9,-4S im Komplex mit dem Peptid IpaB10 nach erfolgreicher Optimierung der Bedingung von LUNELLI *et al.*[37]. ... 51

Abbildung 3.5-3: Kristalle aus dem MARXTAL-*Screen* mit IpgC-9,-4S und MxiE10S. 53
Abbildung 3.5-4: Kristalle nach erfolgreicher Reproduktion von **Morpheus I A6** mit IpgC-9,-4S und MxiE10S. 54
Abbildung 3.5-5: Kristalle nach erfolgreicher Optimierung von **Morpheus I A6** mit IpgC-9,-4S und MxiE10S. 54
Abbildung 3.5-6: Kristalle der Bedingung **MBC I B4** aus dem MARXTAL-*Screen* mit dem IpgC-Volllängenprotein und MxiE10S. 56
Abbildung 3.5-7: Kristalle durch Kokristallisation von IpgC-9,-4S mit IpaC11. 58
Abbildung 3.6-1: Kristalle der Bedingung **Core IV E8** aus dem MARXTAL-*Screen* mit IpgC0,-4S. 62
Abbildung 3.6-2: IpgC0,-4S-Kristalle nach erfolgreicher Reproduktion von **Core IV E8** im eigenen Labor. 62
Abbildung 3.6-3: Durch *Seeding* gewachsene IpgC0,-4S-Kristalle der Bedingung **Core IV E8**. 63
Abbildung 3.6-4: IpgC0,-4S-Kristalle der Bedingung **Core IV E8** nach Optimierung im eigenen Labor. 64
Abbildung 3.6-5: Darstellung der Ergebnisse des *SERp Servers*. 66
Abbildung 3.6-6: Position der drei vorgeschlagenen Cluster im Protein. 66
Abbildung 3.6-7: Chromatogramm der GSH-Säule der Reinigung von IpgC-9,-4S-K122A-K124A-E125A. 67
Abbildung 3.6-8: Chromatogramm der DEAE-Säule der Reinigung von IpgC-9,-4S-K122A-K124A-E125A. 68
Abbildung 3.6-9: 2D-Kugel-Stab-Modell des Additivs *X-TEW* $[TeW_6O_{24}]^{6-}$. 69
Abbildung 3.6-10: MARXTAL-*Hits* mit IpgC-9,-4S und *X-TEW*. 70
Abbildung 3.6-11: IpgC-9,-4S-Kristalle der Bedingung **Morpheus I B5**. 72
Abbildung 3.6-12: MARXTAL-*Hits* mit IpgC-9,-4S ohne den Zusatz von *X-TEW*. 72
Abbildung 3.7-1: IpgC-9,-4S-Kristalle durch Reproduktion und Optimierung von **Classics H4**. 74
Abbildung 3.7-2: Diffraktionsbilder eines IpgC-9,-4S-Kristalls. 75
Abbildung 3.7-3: IpgC-9,-4S-Kristalle. 77
Abbildung 3.7-4: IpgC-9,-4S-Kristalle mit unterschiedlicher Morphologie. 77
Abbildung 3.7-5: Abhängigkeit der Auflösung von der DMSO-Konzentration. 79
Abbildung 3.8-1: Neuartige Konformation des flexiblen Proteinbereichs. 84
Abbildung 3.8-2: Zwei mögliche IpgC-Dimere. 85
Abbildung 3.8-3: Ausgebildete H-Brücken und Salzbrücken im *Interface* der Dimere. 86
Abbildung 3.8-4: VdW-Wechselwirkungen im *Interface* der Dimere. 87
Abbildung 3.8-5: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Dimere mit bereits bekannten Dimer-Anordnungen von IpgC bzw. dessen Orthologen. 90
Abbildung 3.8-6: Zwei hexahydratisierte Mg-Ionen. 92
Abbildung 3.8-7: Zwei Chlorid-Ionen am N-Terminus einer α-Helix. 93
Abbildung 3.9-1: Röntgenkristallographisch identifizierte Fragment-*Hits*. 94
Abbildung 3.9-2: *Interface*-Tasche 1. 96
Abbildung 3.9-3: Bindungsmodus und F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **J20** (PDB-Code: 7axy). 97
Abbildung 3.9-4: Bindungsmodus und F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **J2** (PDB-Code: 7ayw). 99
Abbildung 3.9-5: Bindungsmodus und F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **J2-2** (PDB-Code: 7ayw). 99
Abbildung 3.9-6: Bindungsmodus einer möglichen zweiten Orientierung von **J2-2**. 100
Abbildung 3.9-7: Bindungsmodus und F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **J1** (PDB-Code: 7nl8). 101

Abbildung 3.9-8: F_o-F_o-Differenzelektronendichte und 2F_o-F_c-Elektronendichte der zwei *Loop*-Konformationen. 102

Abbildung 3.9-9: Bindungsmodus und F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **J45** (PDB-Code: 7nrg). 103

Abbildung 3.9-10: Zusätzliche F_o-F_o-Differenzelektronendichte an Position des C_α-Atoms von LysA101 der geschlossenen Konformation. 104

Abbildung 3.9-11: Bindungsmodus und F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **J66** (PDB-Code: 7nhw). 106

Abbildung 3.9-12: Bindungsmodus und F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **J6** (PDB-Code: 7o6s). 107

Abbildung 3.9-13: Bindungsmodus und F_o-F_c-Differenzelektronendichte von **J52** (PDB-Code: 7pe0). 108

Abbildung 3.9-14: Überlagerung der Schleifenkonformationen und F_o-F_c-Differenzelektronendichte in *Interface*-Tasche 1. 110

Abbildung 3.9-15: Bindungsmodus und F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **J36** (PDB-Code: 7o04). 111

Abbildung 3.9-16: Bindungsmodus und F_o-F_c-Differenzelektronendichte eines in *Interface*-Tasche 1 gebundenen DMSO-Moleküls (PDB-Code: 7pef). 112

Abbildung 3.9-17: Zusätzliche Differenzelektronendichte einiger Fragment-*Hits* und Überlagerung mit dem in der *Blank*-Struktur vorhandenen DMSO-Molekül. 113

Abbildung 3.9-18: *Interface*-Tasche 2. 114

Abbildung 3.9-19: Bindungsmodus und F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **J11** (PDB-Code: 7b1u). 116

Abbildung 3.9-20: Bindungsmodus und F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **J33** (PDB-Code: 7azv). 117

Abbildung 3.9-21: Bindungsmodus und F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **J33-2** (PDB-Code: 7azv). 118

Abbildung 3.9-22: Darstellung der Oberflächenzugänglichkeit im Proteinkristallverbund. 121

Abbildung 3.9-23: Eingeschränkte Zugänglichkeit der IpaB-Bindestelle durch ein angrenzendes Symmetrieäquivalent (PDB-Code: 7nrg). 123

Abbildung 3.10-1: Schmelzkurve von IpgC-9,-4S. 128

Abbildung 3.10-2: Signifikante Schmelzpunkterniedrigung durch 26 Fragmente. 129

Abbildung 3.10-3: Zusätzliche F_o-F_c-Differenzelektronendichte für die Seitenkette von LysA101 der Konformation B (PDB-Code: 7nl8). 130

Abbildung 3.10-4: Fehlordnung der Seitenketten von LysB101 und GluA125 (PDB-Code: 7b1u). 131

Abbildung 3.10-5: Strukturformeln der Fragmente **J35**, **J49** und **J75**. 132

Abbildung 3.10-6: Überlappende *Hit*-Raten aus Proteinkristallographie und TSA. 134

Abbildung 3.11-1: Darstellung eines *gedockten* Moleküls in *SeeSAR*. 137

Abbildung 3.11-2: Strukturformeln der ausgewählten *Follow-up*-Verbindungen ausgehend von Fragment-*Hit* **J20**. 138

Abbildung 3.11-3: *Docking*-Pose von Molekül **11** und Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie. 139

Abbildung 3.11-4: *Docking*-Pose von Molekül **16** und Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie. 140

Abbildung 3.11-5: *Docking*-Pose von Molekül **3** und Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie. 142

Abbildung 3.11-6: *Docking*-Posen der Moleküle **12**, **13**, **14** und **17**. 143

Abbildung 3.11-7: Strukturformeln der ausgewählten *Follow-up*-Verbindungen ausgehend von Fragment-*Hit* **J2**. 144

Abbildung 3.11-8: *Docking*-Pose von Molekül **8** und Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie. 145

Abbildung 3.11-9: *Docking*-Posen der Moleküle **2**, **9**, **10** und **15**..... 147

Abbildung 3.11-10: Strukturformeln der ausgewählten *Follow-up*-Verbindungen ausgehend von Fragment-*Hit* **J45**. 148

Abbildung 3.11-11: *Docking*-Pose von Molekül **7** und Darstellung der Beiträge einzelner Atome zur Bindungsenergie. 149

Abbildung 3.11-12: *Docking*-Posen der Moleküle **1**, **4**, **5** und **6**..... 151

Abbildung 3.12-1: Strukturformeln der *Follow-up-Hits* **U08**, **U09** und **U11**. 152

Abbildung 3.12-2: Bindungsmodus und F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **U11** (PDB-Code: 7owm)..... 153

Abbildung 3.12-3: Überlagerung der Struktur von **U11** (PDB-Code: 7owm) mit den Strukturen von **J20** (PDB-Code: 7axy) und **J45** (PDB-Code: 7nrg) und mit der *Docking*-Pose der entsprechenden Verbindung..... 155

Abbildung 3.12-4: Bindestelle von **U09** auf der konkaven Seite der von Kette B ausgebildeten Superhelix (PDB-Code: 7p42). 156

Abbildung 3.12-5: Bindungsmodus und F_o-F_c-*Omit*-Elektronendichte von **U09** (PDB-Code: 7p42)..... 157

Abbildung 3.12-6: Überlagerung der IpgC-Struktur im Komplex mit **U09** (PDB-Code: 7p42) und der Komplexstruktur von IpgC mit dem Bindungsepitop von IpaB (PDB-Code: 3gz1). 158

Abbildung 3.12-7: Darstellung der in *Interface*-Tasche 1 von Struktur „mlu32“ vorhandenen Elektronendichte (nicht deponiert) und Vergleich mit der in der *Blank*-Struktur vorhandenen Elektronendichte (PDB-Code: 7pef). 161

Abbildung 3.12-8: Potentieller Bindungsmodus von **U08** und Vergleich mit entsprechender *Docking*-Pose und Bindungsposition von **J2** (PDB-Code: 7ayw). 163

Abbildung 3.12-9: Darstellung des Volumens von *Interface*-Tasche 1 mit **U11** und **J20** aus zwei verschiedenen Blickrichtungen. 164

Abbildung 3.12-10: *Docking*-Pose eines für das *Docking* verwendeten Moleküls (MolPort-ID: 019-657-211). 170

Abbildung 5.3-1: SDS-PAGE mit Proben einer Reinigung von IpgC0,-4S. 198

Abbildung 5.3-2: SDS-PAGE mit gereinigtem IpgC-9,-4S, IpgC und IpgC0,-4S..... 198

Abbildung 5.3-3: Versuchsaufbau eines Western Blots. 201

Abbildung 5.4-1: Peptidanordnung auf der Membran. 202

Abbildung 5.8-1: Strukturformeln des Fragment-*Hits* **J20** (links) und des verwendeten Templats **J20**_1 (rechts). 214

Abbildung 5.8-2: Strukturformel des Fragment-*Hits* **J2**, welcher ebenfalls als Templat verwendet wurde. 216

Abbildung 5.8-3: Strukturformel des Fragment-*Hits* **J45**, welcher ebenfalls als Templat verwendet wurde. 217

Abbildung 6.1-1: Aminosäure-Sequenzen der Zielproteine IpgC und Spa13. 219

Abbildung 6.2-1: Schmelzkurven der Fragmente, die den Schmelzpunkt des Proteins im TSA signifikant absenkten. 221

Abbildung 6.4-1: *HYDE-Coloring* für weitere *Follow-up*-Verbindungen..... 229

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.5-1: IpgC-Bindungsepitope der Proteine IpaB, IpaC und MxiE und bekannte Affinitäten. 49

Tabelle 3.5-2: Bekannte Kristallisationsbedingungen für IpgC und das Bindungsepitop von IpaB. 50

Tabelle 3.5-3: Zusammensetzung der bei MARXTAL-*Screen* Nr. 2 ermittelten *Hits*. 53

Tabelle 3.6-1: Bekannte IpgC-Kristallisationsbedingungen für das *Apo*-Protein. 61

Tabelle 3.6-2: Zusammensetzung der mit *X-TEW* erhaltenen *Hits*. 70

Tabelle 3.6-3: Zusammensetzung der beim MARXTAL-*Screen* ohne *X-TEW* ermittelten *Hits*. 73

Tabelle 3.8-1: Übersicht über die im *Interface* ausgebildeten H-Brücken und Salzbrücken. 86

Tabelle 3.8-2: Interaktionen in den *Interfaces* beider Dimere, ermittelt mit *Contacsym*. 87

Tabelle 3.9-1: JENA-IDs und Strukturformeln der identifizierten Fragment-*Hits*..... 95

Tabelle 3.9-2: Übersicht über die Wechselwirkungen zwischen Protein und Fragmenten. 119

Tabelle 3.9-3: Vergleich der Anzahl an direkten und indirekten polaren Interaktionen der hier ermittelten Fragment-*Hits* mit den in der eigenen Arbeitsgruppe verwendeten *Targets*. 126

Tabelle 3.12-1: Wechselwirkungen zwischen Protein und **J20** bzw. **U11** (ermittelt mit *Contacsym*[126,127]). 165

Tabelle 5.1-1: Verwendete Laborgeräte. 177

Tabelle 5.1-2: Verwendete Chemikalien. 178

Tabelle 5.1-3: Verwendete Puffer und Lösungen. 179

Tabelle 5.1-4: Verwendete Medien. 182

Tabelle 5.1-5: Verbrauchsmaterial sortiert nach Einsatzgebiet. 182

Tabelle 5.1-6: Verwendete Primer. 183

Tabelle 5.1-7: Verwendete Kits. 183

Tabelle 5.1-8: Verwendete Enzyme, Proteine, Molekular-Standards & Co. 183

Tabelle 5.1-9: Verwendete Bakterienstämme. 184

Tabelle 5.1-10: Verwendete Vektoren. 184

Tabelle 5.1-11: Verwendete Säulen. 184

Tabelle 5.1-12: Verwendete Antikörper. 184

Tabelle 5.1-13: Im Zusammenhang mit dieser Arbeit synthetisierte Peptide. 185

Tabelle 5.1-14: *Follow-up*-Verbindungen. 186

Tabelle 5.2-1: Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes. 187

Tabelle 5.2-2: Temperaturprogramm für eine PCR. 187

Tabelle 5.2-3: Typischer Ansatz eines enzymatischen Verdaus. 188

Tabelle 5.2-4: Typischer Ansatz einer Ligation. 189

Tabelle 5.3-1: Zusammensetzung der SDS-Gele mit 15 % Acrylamid im Trenngel. 200

Tabelle 5.4-1: Anordnung der verschiedenen Peptide auf der Membran. 202

Tabelle 5.7-1: MARXTAL-Kristallisations-*Screens*. 206

Tabelle 5.7-2: *Soaking*-Methode für die 17 *Follow-up*-Verbindungen. 209

Tabelle 5.7-3: Geschätzte VdW-Radien. 211

Tabelle 5.8-1: Durchgeführte *Sessions* ausgehend von Fragment-*Hit* **J20**. 215

Tabelle 5.8-2: Durchgeführte *Sessions* ausgehend von Fragment-*Hit* **J2**..... 216

Tabelle 5.8-3: Durchgeführte *Sessions* ausgehend von Fragment-*Hit* **J45**..... 218

Tabelle 6.2-1: Ermittelte Schmelzpunkte für IpgC-9,-4S und die 96er Fragment-Bibliothek..... 220

Tabelle 6.3-1: Kristallographische Tabelle für die Strukturen mit den PDB-Codes 6scb, 7azv und 7axy..... 224

Tabelle 6.3-2: Kristallographische Tabelle für die Strukturen mit den PDB-Codes 7b1u, 7nl8 und 7o6s..... 225

Tabelle 6.3-3: Kristallographische Tabelle für die Strukturen mit den PDB-Codes 7ayw, 7o04 und 7nrg..... 226

Tabelle 6.3-4: Kristallographische Tabelle für die Strukturen mit den PDB-Codes 7nhw, 7pe0 und 7pef. ... 227

Tabelle 6.3-5: Kristallographische Tabelle für die Strukturen mit den PDB-Codes 7owv und 7p42 und der Struktur-ID „mlu32“..... 228

Tabelle 6.5-1: *B*-Werte und Besetzung der Atome von **U08** und weiterer Atome nach der Verfeinerung... 230

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. **Gerhard Klebe**, der es mir zunächst einmal ermöglichte, in seiner Arbeitsgruppe meine Masterarbeit zu absolvieren. Besonders danke ich ihm, dass er sich so kurz vor seinem Ruhestand für das DRUID-Projekt stark gemacht und damit die Finanzierung meiner Doktorarbeit gesichert hat. Zudem bin ich sehr froh, an einem solch spannenden und interessanten Projekt gearbeitet haben zu dürfen. Prof. Dr. Gerhard Klebe hat mir sehr viel Vertrauen entgegengebracht, auch dafür bin ich ihm sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. **Andreas Heine** möchte ich besonders danken. Er hat nicht nur die Aufgabe des Zweitgutachters übernommen, sondern er hat mein Projekt, wo immer er nur konnte, unterstützt und Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe nach seinem Ruhestand mehr als würdig vertreten. Ich konnte mich jederzeit mit Fragen an ihn wenden. Er hat sich immer ausreichend Zeit genommen. Zudem hat er mich kristallographisch ausgebildet. Für all das bin ich ihm sehr dankbar!

Frau Prof. Dr. **Maike Petersen** und Herrn Prof. Dr. **Cornelius Krasel** möchte ich für die Bereitschaft danken, meine Prüfungskommission zu vervollständigen. Herrn Prof. Dr. **Cornelius Krasel** danke ich zudem für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Prof. Dr. **Klaus Reuter** danke ich für das Einbringen seiner Expertise auf dem Gebiet der Shigellenruhr und für sein aufrichtiges Interesse an meiner Arbeit.

Lydia Hartleben und **Anja Moser** möchte ich für die administrative Unterstützung danken, **Stefanie Dörr** für ihre Hilfe im S1-Labor und **Christian Sohn** für seine Unterstützung bei technischen Problemen und für die Instandhaltung des Röntgengerätes. **Hans-Dieter Gerber** danke ich besonders für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung & Auswertung von NMR-Experimenten.

Besonders möchte ich auch denen danken, die mit mir in den vergangenen Jahren sehr viel Zeit im Büro verbracht und meine Zeit in Marburg zu etwas ganz Besonderem gemacht haben. Ohne sie hätte die Arbeit nur halb so viel Freude bereitet. Zu nennen sind hier in besonderem Maße: **Lea-Sophie Hubert**, **Stefanie Dörr**, Dr. **Matthias Oebbeke** und **Maurice Sebastiani**.

Dr. **Matthias Oebbeke** möchte ich zusätzlich für seine Hilfe bei PC-Problemen danken. In diesem Zusammenhang danke ich ebenso **Frank Balzer** und **Victor Lim** (AG Kolb). **Maurice Sebastiani** danke ich für all die Gespräche über „Wir haben schon kein leichtes Thema!!!“ und für seine aufmunternde ironische Art, damit umzugehen. Ganz besonders möchte ich meiner Arbeitskollegin, Trauzeugin und guten Freundin **Lea-Sophie Hubert** danken. Dass sie mit mir zur selben Zeit am selben Ort war, betrachte ich als ein Geschenk. Ich hoffe sehr, dass der Kontakt über die Zeit in Marburg hinaus anhält. Sie hat mit ihrer direkten, ehrlichen und liebevollen Art mein Leben enorm bereichert.

Danken möchte ich auch denjenigen, die für eine positive Arbeitsatmosphäre im Labor gesorgt haben. Zu nennen sind hier besonders: **Simon Huber** (AG Steinmetzer), **Lea-Sophie Hubert**, Dr. **Aline Keils** (AG Steinmetzer), Dr. **Francesca Magari**, Dr. **Janis Müller**, Dr. **Matthias Oebbeke**, **Żaneta Piórek**, **Anna Sandner**, **Maurice Sebastiani** und **Johanna Wallbaum**.

An dieser Stelle möchte ich dem gesamten **Arbeitskreis Klebe** danken. Als letzte Klebe-Doktorandin musste ich leider über die Jahre mit ansehen, wie die Arbeitsgruppe immer kleiner wurde. Ich bin daher umso dankbarer, dass ich in der Anfangsphase noch mit so vielen Arbeitskollegen zusammenarbeiten durfte. Ich bin froh und dankbar, ein Teil dieser Arbeitsgruppe gewesen sein zu dürfen.

Auch der **Arbeitsgruppe Kolb** und dem **Arbeitskreis Hilger** möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Meinen zahlreichen Vertiefungsstudenten (**Lea-Sophie**, **Simon**, **Sven**, **Niniane** und **Johanna**), meinen Pharmazie-Praktikanten (**Christian** und **Erika**) und meinen Masterstudentinnen (**Elisa** und **Johanna**) möchte ich für ihre Unterstützung im Labor herzlich danken.

Dr. **Jan Wollenhaupt** vom Helmholtz-Zentrum Berlin danke ich für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit bezüglich des *SeeSAR*-Projekts. **Ralf Pöschke** gilt ein herzliches Dankeschön für die Durchführung der zahlreichen Kristallisationsscreens. Dr. **Thuy Van Lam van** möchte ich für die umfangreiche Peptidsynthese danken.

Dem **Assistenten-Team des 2. Semester-Praktikums** gilt ein herzliches Dankeschön für die zuletzt angenehme Zeit während der Praktika. Dr. **Armin Reichenberg** danke ich für die Organisation des Praktikums und all die abwechslungsreichen Gespräche über musikalische Themen.

Meinen DRUID-PhD-Mitstreiterinnen **Anke-Dorothee Werner** (AG Stephan Becker) und Dr. **Wiebke Obermann** (AG Hartmann) möchte ich für die schöne Zeit während zahlreicher Symposien und für die Hilfe bei der ein oder anderen Labortätigkeit danken. Dr. **Wiebke Obermann** danke ich zudem herzlich für die Bereitschaft, während meiner Prüfung Protokoll zu führen.

An dieser Stelle möchte ich auch dem **LOEWE-Zentrum DRUID** für die Finanzierung meines Projekts danken, aber auch für die vielen Gelegenheiten, meine Ergebnisse vor einem qualifizierten Fachpublikum präsentieren zu können, außerdem für die Durchführung von *Soft-Skill*-Kursen, *Summer Schools* und ähnlichem.

Meiner Vermieterin **Frau Gabriele Kadel** gilt ein herzliches Dankeschön dafür, dass sie mich vor sieben Jahren so herzlich bei sich aufgenommen hat. Ich habe mich letztlich auch dank ihr und ihrem Mann sehr schnell sehr wohl in Marburg gefühlt.

Was wäre die Arbeit ohne den entsprechenden Ausgleich. Der **Kirchenmusikalischen Fortbildungsstätte in Schlüchtern** und all denen, die ich dort kennenlernen durfte, möchte ich danken für die tollen Intensivkurse voller Begeisterung und Freude an der Musik.

Ein großer Dank gilt meiner **Familie**, die mich unterstützt hat und auf die ich mich immer verlassen konnte. Meiner **Mutter** möchte ich danken, dass sie immer an mich geglaubt hat und mit ihrer positiven Lebenseinstellung mein Leben bereichert. Meinen **Schwiegereltern** danke ich, dass sie mich so herzlich in ihre Familie aufgenommen haben.

Zuletzt möchte ich meiner besseren Hälfte – meinem **Ehemann Daniel** – danken. Ich bin sehr froh, dass wir uns begegnet sind. Vielen Dank für Dein Interesse an meinem Beruf! Vielen Dank für Deine Unterstützung während der Promotion, aber auch sonst! Vielen Dank, dass Du mir den Rücken freigehalten hast! Ich freue mich sehr auf die gemeinsame Zukunft mit Dir!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Leitstruktursuche mithilfe eines kristallographischen Fragment-*Screenings* zur Inhibierung des Klasse-II-Chaperons IpgC aus *Shigella flexneri*“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den _____ _____

(Marina Gárdonyi)