

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DEPARTMENT CHEMIE

LEHRSTUHL FÜR BIOCHEMIE

# Biochemische und strukturelle Charakterisierung von Proteasen und ihren Liganden

Anja List

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Aymelt Itzen

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Michael Groll

2. Univ.-Prof. Dr. Thomas Kiefhaber

Die Dissertation wurde am 26.6.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 19.7.2012 angenommen.



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2009 bis Juli 2012 unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Groll am Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Insights into Structural Network Responsible for Oligomerization and Activity of Bacterial Virulence Regulator Caseinolytic Protease P (ClpP) Protein

M. Gersch\*, A. List\*, M. Groll, SA. Sieber, *Journal of Biological Chemistry* **2012**, 16, 287 (12), 9484-94.

Crystal structure of methylornithine synthase (PylB): insights into the pyrrolysine biosynthesis

F. Quitterer, A. List, W. Eisenreich, A. Bacher, M. Groll, *Angew Chem Int Ed Engl.* **2012** 6; 51 (6): 1339-42.

Biosynthesis of the 22nd genetically encoded amino acid, pyrrolysine. Structure and reaction mechanism of PylC at 1.5 Å resolution

F. Quitterer, A. List, P. Beck, A. Bacher, M. Groll, zur Publikation eingereicht

Vibrallactone - insights into the proteasome binding-mechanism

A. List\*, E. Zeiler\*, N. Gallastegui, M. Rusch, C. Hedberg, S. Sieber, M. Groll, zur Publikation eingereicht

Potent Proteasome Inhibitors Derived from the Unnatural Cis-Cyclopropane-Type Analoga of Belactosine A as a Prototype

S. Kawamura, Y. Unno, A. List, M. Groll, A. Mizuno, A. Asai, M. Tanaka, T. Sasaki, M. Arisawa, S. Shuto, zur Publikation eingereicht

\* Autoren haben gleichermaßen beigetragen



*MEINER FAMILIE UND FREUNDEN*



*Mein besonderer Dank gilt:*

Prof. Dr. Michael Groll für die Aufnahme an seinem Lehrstuhl, die interessanten Themenstellungen, sein Interesse an meiner Arbeit, sein riesiger Enthusiasmus, seine produktive Unterstützung und seine wertvollen Anregungen.

Prof. Dr. Stephan Sieber für das große Interesse an meiner Arbeit und die fruchtbare Kooperation. Weiterhin möchte ich mich bei seinen Mitarbeitern Malte Gersch und Evelyn Zeiler bedanken für die angenehme Zusammenarbeit, den wissenschaftlichen Austausch und die fantastische und erfolgreiche Arbeit, die wir zusammen gemacht haben.

Prof. Dr. Satoshi Shuto für die Proteasominhibitoren, die in seiner Arbeitsgruppe synthetisiert wurden und die angenehme Kooperation. Außerdem möchte ich mich bei seinem Mitarbeiter Shuhei Kawamura bedanken für die gelungene Zusammenarbeit.

Dr. Christian Hedberg für die gute Zusammenarbeit und die erfolgreiche Arbeit.

Dr. Melissa Gräwert für das ständige offene Ohr, die Geduld und ihre Hilfe in allen Bereichen.

Dr. Sabine Schneider für die sehr hilfreichen Anregungen im Bereich Kristallographie und die erfolgreichen und entspannten SLS-Fahrten.

Meinen Kollegen am Lehrstuhl für Biochemie. Insbesondere möchte ich meinen Laborkollegen Nerea Gallastegui, Ingrid Span, Veronika Flügel und Astrid König, die mittlerweile zu Freunden geworden sind, für ihre tagtägliche Unterstützung in allen Bereichen, die wirklich schöne Zeit, die wir in den letzten Jahren zusammen verbracht haben, und die in guten und in schlechten Zeiten für mich da waren, danken. Natürlich nicht zu vergessen sind die weiteren Doktoranden, vor allem Andrea Kunfermann, deren Gesellschaft ich sehr geschätzt habe und die mich immer unterstützt haben. Dem technischen Personal Richard Feicht, Katrin Gärtner, Christine Schwarz, Birgit Keil, Christoph Grasberger und Fritz Wendling sowie unserer Sekretärin Ute Kashoa danke ich für die Unterstützung, die Organisation des Lehrstuhl und ihre tägliche Arbeit.

Meinen Studenten Andi, Jan R., Joka, Jan S., Steffi, Georg, Jan T., Jonathan, Katharina, Matthias und Ria, die im Rahmen eines Forschungspraktikums oder einer Bachelorarbeit einen wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Weiterhin möchte ich unserer ehemaligen Auszubildende Evi danken, die sowohl fachlich als auch menschlich eine Bereicherung für unser Labor waren.

Mein herzlichster Dank geht an meine Eltern, meinen Bruder Markus und all meine Freunde für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Motivation während meiner Promotion. Ohne sie wäre diese Arbeit in keinster Weise möglich gewesen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
1	Der Naturstoff Vibralacton .....	3
2	Ein Belactosin A Derivat.....	5
3	Die caseinolytische Protease P .....	6
<b>II</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
1	Material .....	11
2	Molekularbiologische Methoden.....	21
2.1	Polymerase Kettenreaktion.....	21
2.2	Restriktionsverdau .....	22
2.3	Ligation.....	23
2.4	Transformation .....	24
2.5	Plasmidisolierung .....	24
2.6	Sequenzierung .....	24
2.7	Punktmutation.....	25
3	Proteinchemische Methoden.....	26
3.1	Stammhaltung.....	26
3.2	Expressionstests.....	26
3.3	Anzucht von Expressionsklonen .....	27
3.4	Zellaufschluss von Bakterienzellen .....	27
3.5	Lyse von <i>S. cerevisiae</i> Zellen .....	27
3.6	Native 20S Proteasom Reinigung.....	28
3.7	Proteinreinigung von ClpP .....	29
3.8	Gelfiltration .....	29
4	Physikalische Methoden.....	30
4.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	30
4.2	SDS-PAGE.....	31
5	Kinetik-Messungen.....	32

5.1	ClpP Aktivitätsassay mit fluoreszierendem Substrat .....	32
5.2	Aktivitätsbasiertes Markierungsexperiment .....	32
5.3	<i>Thermal Shift</i> Assay .....	33
5.4	Protease-Aktivitätstest mit FITC-Casein .....	33
5.5	Punktmessung der 20S Proteasom-Aktivität.....	33
5.6	IC <sub>50</sub> Bestimmung der 20S Proteasom Aktivität .....	34
<b>6</b>	<b>Röntgenstrukturanalytische Methoden .....</b>	<b>35</b>
6.1	Probenpräparation vom 20S Proteasom.....	35
6.2	Probenpräparation von <i>SaClpP</i> .....	35
6.3	Kristallisation .....	35
6.4	Feinscreen-Ansätze für <i>SaClpP</i> .....	36
6.5	Soaking der Proteasom-Kristalle mit Inhibitor .....	36
6.6	Datensammlung und Auswertung.....	36
6.7	Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung .....	37
6.8	Einbau von Liganden .....	38
6.9	Graphische Darstellung.....	38
<b>III</b>	<b>Proteasom-Inhibitoren.....</b>	<b>39</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>41</b>
1.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System.....	41
1.2	Das 26S und 20S Proteasom .....	43
1.3	Funktion und Mechanismus des 20S Proteasoms .....	45
1.4	Biologische Auswirkungen der Inhibition des 20S Proteasoms .....	47
1.5	Ubiquitin-Proteasom-System Inhibitoren und deren Einsatz in der klinischen Forschung.....	49
1.6	β-Lactone als Proteasom-Inhibitoren .....	50
<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>54</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>55</b>
3.1	Vibrilacton.....	55
3.2	Ein Belactosin A-Derivat .....	66

<b>IV</b>	<b>ClpP</b> .....	<b>73</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>75</b>
1.1	Funktion und Vorkommen von ClpP .....	75
1.2	Aufbau des Protease-Komplexes.....	77
1.3	Chaperon-Protease-Wechselwirkung .....	78
1.4	ClpP-Kristallstrukturen.....	78
1.5	Funktionen der Handle-Region .....	81
1.6	ClpP aus <i>Staphylococcus aureus</i> .....	82
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>83</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>84</b>
3.1	<i>SaClpP</i> Kristallstruktur in aktiver Konformation.....	84
3.2	Das Salzbrücken Netzwerk von Asp <sup>170</sup> , Arg <sup>171</sup> und Gln <sup>132</sup> .....	92
3.3	Mutationsstudien in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Sieber.....	92
3.4	Konformationelle Änderung induziert durch Struktur-basierte Mutagenese .....	97
3.5	Physiologische Relevanz verschiedener Konformation von <i>SaClpP</i> .....	98
<b>V</b>	<b>Verzeichnisse</b> .....	<b>105</b>
<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>107</b>
<b>2</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>110</b>
<b>3</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>117</b>



---

# **I Zusammenfassung**



# 1 Der Naturstoff Vibralacton

Die Schlüsselkomponente des Ubiquitin-Proteasom Systems ist das 20S Proteasom, das die Protein-Homöostase der Zelle aufrecht erhält und an der Regulation von vielen zellulären Prozessen beteiligt ist. Dies geschieht über endoproteolytische Spaltung von intrazellulären Proteinen. Deshalb spielt das Proteasom eine große Rolle in der Behandlung von vielen Krankheiten, wie zum Beispiel Krebs und Arthritis. Proteasom-Ligand Komplexe sind bereits gut erforscht und stellen ein sehr wichtiges Werkzeug dar um Inhibitoren gegen diese Proteinabbau-Maschine und damit gegen Erkrankungen zu analysieren und zu verbessern. Trotzdem muss der molekulare Bindungsmechanismus der Proteasominhibitoren noch weiter untersucht werden um die Effektivität des sich auf dem Markt befindlichen Medikaments gegen Tumore zu verbessern. In dieser Arbeit wird die Kristallstruktur des Naturstoffes, Vibralacton, im Komplex mit dem Proteasom gezeigt. Vibralacton ist in der Elektronendichte der  $\beta 5$ -Untereinheit gut definiert, obwohl mit *in vitro* Aktivitätstest gezeigt werden konnte, dass Vibralacton keine der drei Spezifitätstaschen des Proteasoms inhibiert. Auch bei der Zugabe von 1 mM Vibralacton konnte noch volle Aktivität aller aktiven Zentren des 20S Proteasoms beobachtet werden. Obwohl es keinen inhibitorischen Effekt auf das 20S Proteasom ausübt, ist Vibralacton trotzdem gut definiert in der Elektronendichte des Chymotrypsin-ähnlichen aktiven Zentrums zu sehen. Durch diese einmalige Gelegenheit ein nicht-inhibierendes  $\beta$ -Lacton im Chymotrypsin-ähnlichen aktiven Zentrum zu sehen, konnten besondere Erkenntnisse aus der Struktur gewonnen werden. So konnte bewiesen werden, dass die gesamte Architektur des Inhibitors entscheidend für seine Selektivität für die  $\beta 5$ -Untereinheit ist und mehr als eine funktionelle  $\beta$ -Lacton Gruppe für seine Wirksamkeit als Proteasom-Inhibitor nötig ist. Jeder einzelnen funktionellen Gruppe des Inhibitors konnte zugeordnet werden, ob sie entscheidend oder unwichtig für die Bindung an das 20S Proteasom ist und wie genau der Bindungsmechanismus funktioniert. Anhand dieser Ergebnisse können  $\beta$ -Lacton Inhibitoren nun verbessert werden um optimierte Medikamente gegen Krebserkrankungen, wie das Multiple Myelom zu entwickeln.

Ähnliche Strukturen von  $\beta$ -Lacton-Naturstoffen, wie Vibralacton, Omuralid und Salinosporamid A, existieren entweder in Bakterien oder in Pilzen. Dort haben sie aber aufgrund ihres biologischen Hintergrunds verschiedene Target-Spezifitäten. In dieser Arbeit wird gezeigt, worauf diese Target-Spezifitäten begründet sind und warum es sie gibt.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann der Bindungsmechanismus der auf  $\beta$ -Lacton basierenden Inhibitoren an das eukaryotische 20S Proteasom besser verstanden werden.

Zusätzlich kann anhand der Proteasom-Vibralacton Kristallstruktur die Unreaktivität von Vibralacton gegenüber dem eukaryotischem 20S Proteasom erklärt werden und erläutert werden, was einen Proteasominhibitor auszeichnet. In Kooperation mit Evelyn Zeiler aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Sieber konnten durch *Activity based protein profiling* (ABPP) die Targets von Vibralacton in eukaryotischen Zellen identifiziert werden. Es stellte sich heraus, dass Vibralacton die Carboxypeptidase (SCPEP1), das *Abhydrolase domain containing protein 10* (ABHD10) und die Acyl-Protein Thiosterease 1 und 2 (APT1, APT2) inhibiert, wohingegen Omuralid nur die SCPEP und das 20S Proteasom hemmt. Die strukturell ähnlichen Verbindungen zeigen auch hier unterschiedliche Inhibitionsmuster. Die  $IC_{50}$ -Werte-Messung von Vibralacton gegen APT1 und APT2, die in Kooperation mit C. Hedberg durchgeführt wurden, bestätigen das Ergebnis des ABPPs und zeigen  $IC_{50}$ -Werte im nM-Bereich. Basierend auf der Vibralacton-Struktur können zukünftig Inhibitoren gegen Krebs entwickelt werden, da APT1/2 eine wichtige Rolle im Ras-Signalweg spielen.

Zusätzlich konnte in Zelltoxizitätsassays gezeigt werden, dass die Behandlung von HeLa Zellen mit Omuralid zum Tod führt, wohingegen bei Zugabe von Vibralacton 100% der metabolischen Aktivität beibehalten wird. Die Hitze-Denaturierung von rekombinanten APT1/2 zeigte keine Markierung für das modifizierte Vibralacton, was bedeutet, dass nur aktive Enzyme mit Vibralacton reagieren und was bestätigte, dass die Bindung von Vibralacton an APT1/2 vor allem im aktiven Zentrum geschieht.

Die Proteasominhibition ist noch immer ein Hauptziel in der Entwicklung von anti-Krebs-Medikamenten und eine gut-definierte Strukturanalyse des Bindungsmechanismus von  $\beta$ -Lactonen ist relevant für ein grundlegendes pharmakologisches Verständnis der Proteasominhibitoren und eröffnet neue Wege für die Behandlung des Multiplem Myeloms, von Leukämie, Lymphknotenerkrankung und anderen Tumoren.

## 2 Ein Belactosin A Derivat

Der Abbau von Zellzyklus regulatorischen Proteinen, wie Cycline und Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren, durch das Ubiquitin-Proteasom-System ist essentiell für das Zellwachstum und die Protein-Homöostase. Es spielt außerdem eine sehr wichtige Rolle in der Zellproliferation in Tumorzellen<sup>[1]</sup> und seine Inhibition führt zu der Ansammlung von fehlgefalteten Proteinen und dadurch zur Apoptose. Daher ist die Inhibition des Proteasoms ein attraktives therapeutisches Ziel in der Krebs-Chemotherapie.<sup>[1-2]</sup>

Belactosin A, ein natürlich vorkommendes Tripeptid aus L-Alanin, 3-(*trans*-2-aminocyclopropyl)-L-Alanin (*trans*-3,4-Methan-L-Ornithin) und einem chiralen Carboxyl- $\beta$ -Lacton, aus *Streptomyces sp.* wurde von Asai und Mitarbeitern als Proteasominhibitor identifiziert. Es verhindert das Ablaufen des Zellzyklus in menschlichen Tumorzellen im G2/M Stadium aufgrund der Proteasom-Inhibition und ist eine neue Leitstruktur für die Entwicklung von potenten Antikrebs-Medikamenten.<sup>[3]</sup> Aufgrund seiner starren strukturellen Eigenschaften schränkt das Cyclopropan in Belactosin A effektiv die Konformation des L-Alanins und des  $\beta$ -Lacton-Restes ein. Diese Reste bilden entscheidende Interaktionen mit dem Proteasom aus. Daher wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Shuto eine Reihe an Belactosin A Analoga mit unterschiedlicher Stereochemie synthetisiert, bei denen das zentrale Aminocyclopropyl-L-Alanin (Methano-L-Ornithin) durch eine korrespondierende stereo- oder regioisomerische Cyclopropan Aminosäure ersetzt wurde. Es zeigte sich, dass die Verbindung **3** ein sehr potenter Proteasom-Inhibitor ist, der 20-mal wirksamer als der ursprüngliche Naturstoff Belactosin A ist. Um den Bindemechanismus von **3** an das Chymotrypsin-ähnliche aktive Zentrum zu verstehen, wurde die Kristallstruktur des 20S Proteasom:**3**-Komplexes aufgeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass **3** aufgrund seiner starren Cyclopropangruppe und der begrenzten Größe der gestrichenen Seite in den  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Untereinheit selektiv für das Chymotrypsin-ähnliche aktive Zentrum ist. Außerdem konnte eine neue Bindungsweise von **3** an die gestrichene Seite der  $\beta$ 5-Untereinheit entdeckt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen können hoch potente Proteasom-Inhibitoren entwickelt werden, indem die Beziehung zwischen Struktur und Aktivität von dem Belactosin Analoga **3** mit seiner unnatürlichen *cis*-Cyclopropan Struktur untersucht wird.

Die Summe dieser Ergebnisse bereitet einen Überblick über 20S Proteasominhibition und liefert neue Erkenntnisse in diesem herausfordernden und wissenschaftlich anspruchsvollen Forschungsfeld.

### 3 Die caseinolytische Protease P

Die caseinolytische Protease P (ClpP) stellt einen wichtigen Regulator der Virulenz in multiresistenten *Staphylococcus aureus* Stämmen dar. Sie setzt sich aus zwei heptameren Ringen zusammen, die ein Homotetradecamer bilden und eine innere Kammer mit 14 aktiven Zentren besitzt. Erst kürzlich wurde die inaktive, abgeknickte Konformation von ClpP aus *S. aureus* veröffentlicht.<sup>[4]</sup> In dieser Arbeit wurde die Struktur von SaClpP in seiner geschlossenen, aktiven Struktur mit einer Auflösung von 2.3 Å, sowie die Struktur der Mutanten S98A mit einer Auflösung von 2.8 Å gelöst. Die erhaltene Wildtyp-Struktur ist aufschlussreich, da sie die vermutete, ausgestreckte Konformation der  $\alpha$ E-Helix zeigt. Somit ist das ClpP-Protein von *S. aureus* das erste Beispiel, für das zwei Konformationen der Handle-Region kristallisiert werden konnten. Der Strukturvergleich zeigt die unterschiedlichen Ausrichtungen der  $\alpha$ E Helix, wie auch des parallelen Faltblatts  $\beta$ 9. Bei ausgestreckter Helix verstärkt ein antiparalleles Faltblatt zwischen zwei Monomeren die Stabilität der heptameren Ringe. In der Konformation der nach innen abgeknickten Helix ändert sich ebenso die Anordnung der vorangehenden 15 Aminosäuren, die nun den inneren Rand des Heptamers bilden und weniger Interaktionen mit dem gegenüberliegenden Monomer eingehen. Zugleich wird durch diese Konformation die katalytische Triade verändert, die bei ausgestreckter Helix ein katalytisch aktives Zentrum bildet. Ob das Tetradecamer mit ausgestreckter Helix auch in Lösung vorliegt und ob die dadurch gebildeten seitlichen Poren groß genug sind, um ein Entweichen der durch Proteolyse entstehenden Polypeptide zu ermöglichen, muss experimentell gezeigt werden. Die erhaltene Struktur der Mutanten S98A gibt jedoch Aufschluss darüber, ob die aktive Konformation mit gestreckter Helix aufgrund der veränderten Position von Arg<sup>171</sup> oder Ser<sup>98</sup> im aktiven Zentrum entsteht. Die Wildtyp- und S98A-Mutanten-Strukturen zeigen keinen signifikanten Unterschied. Interessanterweise nimmt His<sup>123</sup> die gleiche Position in beiden Strukturen ein, was beweist, dass das Ausbilden des aktiven Zentrums unabhängig von der Position des Serins erfolgt und somit von der Konformation des Arg<sup>171</sup> abhängt.

Weiterhin konnten durch umfangreiche Mutationsanalyse der aktiven und inaktiven Konformation, die in Kooperation mit Malte Gersch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Sieber durchgeführt wurden, für die Proteolyse essentielle Aminosäure-Reste identifiziert werden. Diese sind sowohl an der katalytischen Konformationsveränderung als auch an der Heptamer-Heptamer-Interaktion beteiligt. Hierzu zählt das Wasserstoffbrücken-Netzwerk von Asp<sup>170</sup>, Arg<sup>171</sup> und Gln<sup>132</sup> am Innenringkontakt, das für die Tetradecamer-Bildung und

Aktivität notwendig ist. Zusätzlich formiert Gln<sup>132</sup> eine Wasserstoffbrücke mit Glu<sup>135</sup>, das an der Spitze der E-Helix lokalisiert ist. Leu<sup>144</sup> stabilisiert dagegen die abgeknickte Konformation und somit die heptamere Konformation durch eine Interaktion mit Glu<sup>137</sup>, weshalb seine Mutation meistens zur Dissoziation in inaktive Heptamere führt. Glu<sup>137</sup> steht zudem in Wechselwirkung mit Thr<sup>143</sup> und Ser<sup>70</sup>, wodurch die abgeknickte Konformation weiter stabilisiert wird.

Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung des Tetradecamers essentiell für die richtige und aktive Ausbildung des aktiven Zentrums ist. Die Auswertung der Strukturdaten weisen darauf hin, dass ein hoch konserviertes Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerk die Oligomerisierung und Aktivität reguliert. Der Vergleich von ClpP Strukturen aus verschiedenen Organismen vermittelt den Eindruck, dass es einen universellen Mechanismus gibt, der die ClpP Aktivität reguliert. Die Bindung von einer Untereinheit an die korrespondierende Untereinheit des anderen Rings wird für die funktionelle Anordnung des katalytischen Zentrums benötigt und damit auch für die Proteaseaktivität. Dieser Mechanismus sichert den kontrollierten Zugang zum aktiven Zentrum der unspezifischen Protease.



---

## **II Material und Methoden**



# 1 Material

## Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben von den kommerziellen Anbietern AppliChem (Darmstadt, DE), Biomol (Hamburg, DE), Fluka (Neu-Ulm, DE), Merck (Darmstadt, DE), Sigma-Aldrich (Steinheim, DE), Serva (Heidelberg, DE), Roth (Karlsruhe, DE) und VWR (Darmstadt, DE) bezogen und wie erhalten eingesetzt.

## Enzyme

Phusion DNA-Polymerase (inkl. Puffer)	Finnzymes (Vantaa, Finnland)
Restriktionsendonuklease (inkl. Puffer)	New England Biolabs (Ipswich, USA)
TEV-Protease	selber hergestellt
T4-DNA-Ligase	Invitrogen (Carlsbad, USA)
DNase I	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Gel Filtration LMW/HMW Calibration Kit	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, GB)

## Chromatographisches Material

HisTrap <sup>TM</sup> FF Ni-NTA Säule (1 mL, 5 mL)	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, GB)
HiLoad 26/60 Superdex 75/200 pg	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, GB)
HiLoad 26/60 Superose 6 pg	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, GB)
StrepTag-HP (5 mL)	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, GB)

## Medien

LB-Medium	10 g	Caseinhydrolysat
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
TB-Medium	12 g	Caseinhydrolysat
	24 g	Hefeextrakt
	12.5 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2.3 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	4 mL	Glycerin

SOC-Medium	20 g	Caseinhydrolysat
	5 g	Hefeextrakt
	20 mM	Glucose
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
	10 mM	NaCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	2.5 mM	KCl
Niedrigsalz-LB-Medium	10 g/L	Pepton
	5 g/L	Natriumchlorid
	5 g/L	Hefeextrakt pH 7.5

## Puffer und Lösungen

### *Agarose-Gelelektrophorese*

TAE-Puffer (50x)	2 M	Tris/Ac, pH 8.2
	100 mM	EDTA
Agarosegel (1%)	0.5 g	Agarose
	50 mL	TAE-Puffer (1x)
Ethidiumbromid-Lösung	1 mg/L	Ethidiumbromid
TE-Puffer (10x)	100 mM	Tris/HCl, pH 8.2
	10 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
Probenauftragspuffer	50% (V/V)	Glycerin
	0.25% (G/V)	Xylencyanol
	0.25% (G/V)	Bromphenolblau in TE-Puffer (1x)

### *SDS-Gelelektrophorese*

Acrylamid-Lösung	39% (G/V)	Acrylamid
	1.2% (G/V)	Bisacrylamid
Trenngelpuffer (15%)	1.5 M	Tris/HCl, pH 8.9
	0.4% (G/V)	Natriumdodecylsulfat (SDS)

Sammelgelpuffer (4%)	0.5 M	Tris/HCl, pH 6.9
	0.4% (G/V)	SDS
APS-Lösung	10%	Ammoniumperoxodisulfat
TEMED-Lösung	1%	Tetramethylethyldiamid
Probenauftragspuffer	30% (V/V)	Glycerin
	10% (G/V)	Saccharose
	5% (G/V)	SDS
	3% (V/V)	$\beta$ -Mercaptoethanol
	0.02% (G/V)	Bromphenolblau
	60 mM	Tris/HCl, pH 6.8
	25 mM	Tris/HCl, pH 8.3
Elektrophoresepuffer	192 mM	Glycerin
	0.1% (G/V)	SDS
	0.05% (G/V)	Coomassie Brilliantblau R250
Coomassie Färbelösung	25% (V/V)	Isopropanol
	10% (V/V)	Eisessig
	10% (V/V)	Eisessig

*Reinigungspuffer*

Puffer 1	100 mM	Tris, pH 8.0
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
Puffer 2	100 mM	NaCl
	200 mM	Tris/HCl, pH 7.0
Puffer 3	20 mM	Tris, pH 7.5
Puffer 4	200 mM	KCl
	100 mM	MES, pH 7.0
Puffer 5	20 mM	Kaliumphosphat, pH 7.5
	1 M	Ammoniumsulfat
Puffer 6	20 mM	Kaliumphosphat, pH 7.5

*Protease-Aktivitätstest mit FITC-Casein als Substrat*

Assaypuffer	500 mM	Tris, pH 8.5
Inkubationspuffer	20 mM	NaPhosphat, pH 7.6
	150 mM	NaCl
FITC-Casein	Product Code F 0554	FITC-Casein
Trypsin	0.5 µg/mL	Trypsin
TCA	0.6 M	TCA

**DNA- und Proteinmarker****Tabelle 1:** DNA-Marker, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Markerbanden [kBp]	Hersteller
10.0; 8.0; 6.0; 5.0; 4.0; 3.5; 3.0; 2.5; 2.0; 1.5; 1.2; 1.0; 0.9; 0.8; 0.7; 0.6; 0.5; 0.4; 0.3; 0.2; 0.1	Carl Roth, Deutschland

**Tabelle 2:** Protein-Marker, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Markerbanden [kDa]	Hersteller
200; 119; 66; 43; 29; 20; 14.3	Carl Roth, Deutschland

**Stämme****Tabelle 3:** In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme mit Genotyp und Referenz.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> BL21 DE3	$F^-$ <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Novagen/Merck (Darmstadt, DE)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1,</i> <i>hsdR17, supE44, relA1, lac, [F',</i> <i>proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10 (tet')</i> ]	Bullock <i>et al.</i> <sup>[5]</sup>

## Primer

**Tabelle 4:** Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Primer	Sequenz (5' → 3')
<i>Sa</i> -ClpP for.	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTTGAAGGAGATAG</u> <u>AACCATGAATTTAATTCCTACAGTTATTGAAAC</u>
<i>Sa</i> -ClpP rev.	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTATTTTTTCGAA</u> <u>CTGCGGGTGGCTCCATTTTGTTCAGGTACCATCACTTC</u>
Q35A-for	AGACCGTATTATTATGTTAGGTTCA <u>GCA</u> ATTGATGACAACG TAGCAAATTCA
Q35A-rev	TGAATTTGCTACGTTGTCATCAATT <u>GCT</u> GAACTAACATAA TAATACGGTCT
S98A-for	ATTTGTATCGGTATGGCTGC <u>AGCA</u> ATGGGATCATTCTTATT AG
S98A-rev	CTAATAAGAATGATCCCATT <u>GCT</u> GCAGCCATACCGATACAA AT
S98C-for	ACAATTTGTATCGGTATGGCTGCAT <u>GC</u> ATGGGATCATTCTT ATTAGC
S98C-rev	GCTAATAAGAATGATCCCATGCAT <u>GC</u> AGCCATACCGATAC AAATTGT
S98T-for	AATTTGTATCGGTATGGCTGCA <u>ACG</u> ATGGGATCATTCTTAT TAGCAG
S98T-rev	CTGCTAATAAGAATGATCCCAT <u>CGT</u> TGCAGCCATACCGATA CAAATT
G127AG128 AG131A-for	GTAATGATTCACCAACCATTAG <u>CTGCT</u> GCTCAAG <u>CACA</u> AG CAACTGAAATCGAAATTGCT
G127AG128 AG131A-rev	AGCAATTTTCGATTTTCAGTTGCTTGT <u>GCT</u> TGAGCAG <u>GCAG</u> GCTA ATGGTTGGTGAATCATTAC
Q130A-for	CACCAACCATTAGGTGGTGCT <u>GC</u> AGGACAAGCAACTG
Q130A-rev	CAGTTGCTTGTCT <u>GC</u> AGCACCACCTAATGGTTGGTG
Q132A-for	CCAACCATTAGGTGGTGCTCAAGGAG <u>GC</u> AGCAACTGAAATC G
Q132A-rev	CGATTTTCAGTTGCT <u>GCT</u> CTCCTTGAGCACCACCTAATGGTTGG
E135A-for	GCTCAAGGACAAGCAACTG <u>CA</u> ATCGAAATTGCTGCAAAT
E135A-rev	ATTTGCAGCAATTTTCGATT <u>GC</u> AGTTGCTTGTCTTGGAGC
E135R-for	GGTGCTCAAGGACAAGCAACT <u>AGA</u> ATCGAAATTGCTGCAA ATCA
E135R-rev	TGATTTGCAGCAATTTTCGATT <u>CT</u> AGTTGCTTGTCTTGGAGC ACC
E137A-for	CAAGGACAAGCAACTGAAATCG <u>CA</u> ATTGCTGCAAATCACA

---

	TTTTA
E137A-rev	TAAAATGTGATTTGCAGCAATT <u>G</u> CGATTCAGTTGCTTGCTC CTTG
L144E-for	CAACTGAAATCGAAATTGCTGCAAATCACATT <u>GAG</u> AAAAC ACGTGAAAAATTAACCGCATTTTATC
L144E-rev	GATAAAATGCGGTTTAATTTTTACGTGTTTTT <u>CT</u> CAATGTG ATTTGCAGCAATTTTCGATTTTCAGTTG
L144G-for	GAAATCGAAATTGCTGCAAATCACATT <u>GG</u> AAAACACGTG AAAAATTAACCGCAT
L144G-rev	ATGCGGTTTAATTTTTACGTGTTTTT <u>CC</u> AATGTGATTTGCA GCAATTTTCGATTTTC
L144M-for	GAAATCGAAATTGCTGCAAATCACATT <u>ATG</u> AAAACACGTG AAAAATTAACCGCATT
L144M-rev	AATGCGGTTTAATTTTTACGTGTTTTT <u>CA</u> TAAATGTGATTTGC AGCAATTTTCGATTTTC
L144R-for	GAAATCGAAATTGCTGCAAATCACATT <u>AG</u> AAAACACGTG AAAAATTAACCGCAT
L144R-rev	ATGCGGTTTAATTTTTACGTGTTTTT <u>CT</u> AATGTGATTTGCA GCAATTTTCGATTTTC
D170A-for	TGAAAAAATACAAAAAGACACAG <u>CT</u> CGTGATAACTTCTTA ACTGCAG
D170A-rev	CTGCAGTTAAGAAGTTATCACGAG <u>G</u> CTGTGTCTTTTTGTATTT TTTCA
R171A-for	GTATTGAAAAAATACAAAAAGACACAGAT <u>GCT</u> GATAACTT CTTAAGTGCAGAAGA
R171A-rev	TCTTCTGCAGTTAAGAAGTTATCAG <u>GC</u> ATCTGTGTCTTTTTGT ATTTTTCAATAC
R171K-for	CAAAGTATTGAAAAAATACAAAAAGACACAGATA <u>AA</u> GGATA ACTTCTTAAGTGCAGAAGAAGCTAAAGAA
R171K-rev	TTCTTTAGCTTCTTCTGCAGTTAAGAAGTTATC <u>CTT</u> ATCTGT GTCTTTTTGTATTTTTCAATACTTTG

---

## Plasmide

**Tabelle 5:** In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren sowie ihre Charakteristika und Referenzen beziehungsweise Hersteller.

Plasmid	Charakteristika	Referenz/Hersteller
pDONR 201	ccdB-Gen, kan <sup>r</sup>	Invitrogen
pDest 007	ccdB-Gen, amp <sup>r</sup> , N-terminaler Strep-Tag II	Carsten Piek, AK Carell, LMU München
pET301	amp <sup>r</sup>	In dieser Arbeit hergestellt
pDonr207	gen <sup>r</sup>	In dieser Arbeit hergestellt

## Geräte

### *Zentrifugen*

SIGMA1-14 (Rotor 12094)	SIGMA laboratory centrifuges (Osterode am Harz, DE)
SIGMA 3-30K (Rotor 12150-H/ 12154-H)	SIGMA laboratory centrifuges (Osterode am Harz, DE)
SIGMA 4K15 (Rotor 11150/ 13350)	SIGMA laboratory centrifuges (Osterode am Harz, DE)
SIGMA 6-16K (Rotor 12500)	SIGMA laboratory centrifuges (Osterode am Harz, DE)
SIGMA 8K (Rotor 11805/ 13850)	SIGMA laboratory centrifuges (Osterode am Harz, DE)

### *Autoklav*

Laboklav 25/195	SHP Steriltechnik (Magdeburg, DE)
-----------------	-----------------------------------

### *Chromatographie*

ÄKTA prime plus	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, GB)
ÄKTA purifier	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, GB)

*Elektrophorese*

Kammern und Gelträger für Agarosegele	Appligene (Watford, UK)
Glasplatten und Halterungen	BioRad (Hercules, USA)
Mini PROTEAN® Zelle	BioRad (Hercules, USA)
PowerPac Basic Stromquelle	BioRad (Hercules, USA)
G:Box für Gelphotographie	Syngene (Cambridge, UK)
Digitaler Graphikdrucker UP-D897	Sony (Minato, JP)

*Elektroporation*

2 mm-Elektroporationsküvette	PeqLab (Erlangen, DE)
Gene Pulser mit Pulse Controller	BioRad (Hercules, USA)

*Kristallographie*

MRC Sitting Drop 96-Well	SWISSCI (Neuheim, CH)
Crystal Clear Sealing Tape	Hampton (Aliso Viejo, USA)
X8 PROTEUM in-house beamline	Bruker (Karlsruhe, DE)
Zoom Stereomikroskop SZX10/KL1500LCD	Olympus (Tokio, JP)
Gekühlte Inkubatoren Serie 3000	RUMED® Rubarth Apparate (Laatzen, DE)
CryoLoop™	Hampton (Aliso Viejo, USA)
CrystalCap HT™ für CryoLoop™	Hampton (Aliso Viejo, USA)
CrystalCap HT™ Vial	Hampton (Aliso Viejo, USA)
CrystalWand Magnetic™	Hampton (Aliso Viejo, USA)
Magnetische Caps, Pins und Vials	Molecular Dimensions (Newmarket, UK)
Zange	Molecular Dimensions (Newmarket, UK)
Mikro-Werkzeugkiste	Molecular Dimensions (Newmarket, UK)
Schaumstoffdewar	Spearlab (San Francisco, USA)
Taylor-Wharton CX100/HC20	tec-lab (Idstein, DE)
Transportdewar	

*NMR-Spektrometer*

DRX 500	Bruker (Karlsruhe, DE)
AVANCE 500CR	Bruker (Karlsruhe, DE)

*pH-Meter*

inoLab <sup>®</sup> pH 720 pH-Meter	WTW (Weilheim, DE)
SenTix <sup>®</sup> 81 pH-Elektrode	WTW (Weilheim, DE)

*Photometer*

NanoPhotometer <sup>™</sup> Pearl	Implen (München, DE)
Ultraspec 2000 UV/Visible Spectrophotometer	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, DE)
Cary 50 Scan UV-Visible Spectrophotometer	Varian (Palo Alto, USA)

*Thermocycler*

MyCycler <sup>™</sup>	BioRad (Hercules, USA)
-----------------------	------------------------

*Waagen*

Präzisionswaage BP 3100 P	Sartorius (Göttingen, DE)
Analytische Waage TE 124S	Sartorius (Göttingen, DE)

*Zellaufschluss*

Branson Digital Sonifier 250	G. Heinemann (Schwäbisch Gmünd, DE)
Constant Cell Disruption System E1061	Constant Systems (Northants, UK)

**Software**

Adobe Acrobat 9 Pro	Adobe (San Jose, USA)
ARP/wARP	EMBL (Hamburg, DE) <sup>[6]</sup>
CCP4 Software Suite	<a href="http://www.ccp4.ac.uk">www.ccp4.ac.uk</a> <sup>[7]</sup>
ChemDraw	Perkin Elmer (Cambridge, USA)
CorelDRAW X5	Corel (Ottawa, KAN)
COOT	Emsley <sup>[8]</sup>
EndNote X4	Adept Scientific (Frankfurt, DE)
Gimp 2.0	<a href="http://www.gimp.org">www.gimp.org</a>
Microsoft Office 2007, 2010	Microsoft (Redmond, USA)
PHASER	<a href="http://www.ccp4.ac.uk">www.ccp4.ac.uk</a> <sup>[9]</sup>
PROCHECK	<a href="http://www.ccp4.ac.uk">www.ccp4.ac.uk</a> <sup>[10]</sup>
PyMOL Molecular Graphics System	Schrödinger, LLC <sup>[11]</sup>
REFMAC	<a href="http://www.ccp4.ac.uk">www.ccp4.ac.uk</a> <sup>[12]</sup>
SKETCHER	<a href="http://www.ccp4.ac.uk">www.ccp4.ac.uk</a> <sup>[13]</sup>
SYBYL	Tripos (St. Luis, USA)
XDS Program Package	MPI (Heidelberg, DE) <sup>[14]</sup>

## 2 Molekularbiologische Methoden

### 2.1 Polymerase Kettenreaktion

Die PCR-Methode nach Mullis et al.<sup>[15]</sup> ist eine Methode, die zur selektiven und schnellen Amplifizierung von Zielsequenzen innerhalb eines DNA-Moleküls verwendet wird.

Der Standard-Reaktionsansatz für eine PCR enthält in einem Gesamtvolumen von 100 µL:

- 20 µL Phusion HF-Puffer (5x)
- 2 µL dNTPs
- 1 µL Primer 1 (100 µmol/µL)
- 1 µL Primer 2 (100 µmol/µL)
- 0.5 µL genomische DNA bzw. 5 µL Plasmid-DNA
- 1 µL Phusion-DNA-Polymerase

Der PCR-Ansatz wird mit sterilem bidest. H<sub>2</sub>O auf 100 µL aufgefüllt. Die PCR wird im Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt:

Der Reaktionsansatz wird nach Zugabe der Polymerase in den Thermoblock gegeben und 4 min auf 95°C erhitzt, um alle vorhandenen DNA-Doppelstränge voneinander zu trennen und um die DNA-Polymerase zu aktivieren. Die PCR wird in mehreren aufeinanderfolgenden Thermo-Zyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestehen:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95°C für 30 sec
2. Hybridisierung (Annealing) der Primer an die DNA-Matrix bei 55°C für 30 sec
3. Synthese der DNA bei 72°C für 45 sec (Polymerase-Reaktion)

Die DNA-Polymerase verlängert die an den Matrizenstrang angelagerten Primer zu einem komplementären Strang mit Hilfe der in der Reaktionsmischung vorhandenen Desoxiribonukleosidtriphosphate (dNTPs). Der Zyklus wird 35mal durchlaufen um eine 2<sup>35</sup>-fache Vervielfältigung der DNA-Vorlage zu erreichen. Zur Vervollständigung der Syntheseprodukte wird der Ansatz schließlich für 7 min auf 72°C erhitzt. Abschließend wird der Reaktionsansatz auf 4°C herunter gekühlt und bei dieser Temperatur bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

**Tabelle 6:** Standard-PCR-Programm

Vorgang	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95°C	4 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	35
Annealing	55°C	30 sec	
Polymerisierung	72°C	45 sec	
Polymerisierung	72°C	7 min	1

Die PCR-Fragmente werden anschließend mit Hilfe des E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (PeqLab, Deutschland) gereinigt. Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, werden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 4.1 *Agarose-Gelelektrophorese*), aus dem die entsprechende Bande ausgeschnitten und mittels E.Z.N.A Gel Extraktion Kit (PeqLab, Deutschland) gereinigt wird. Die isolierten Fragmente werden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert

## 2.2 Restriktionsverdau

Der Verdau der DNA wird durchgeführt, um das Insert in der multiple cloning site (MCS) zu entfernen und die entsprechenden Überhänge für die anschließende Ligation zu erhalten. Die einzusetzende DNA-Menge ist von ihrer Konzentration abhängig. Die sequenzspezifische Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsenzymen wird unter Beachtung der vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen und optimalen Inkubationstemperaturen durchgeführt. Das Gesamtvolumen von 70 µL wird durch H<sub>2</sub>O-Zugabe erreicht. Der Verdau wird für 3 h bei 37°C inkubiert. Muss ein Restriktionsverdau mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt werden für die kein geeigneter gemeinsamer Reaktionspuffer existiert, wird die DNA hintereinander in zwei je 3 h lang dauernden Arbeitsschritten verdaut. Reaktionspuffer und Restriktionsenzym werden nach dem ersten Einzelverdau durch Aufreinigung der DNA mit dem „E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit“ (PeqLab, Deutschland) entfernt.

Der Ansatz für den DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen enthält 70  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen. Die folgende Auflistung beschreibt das Pipettierschema des Restriktionsverdau:

- 7  $\mu\text{L}$  10fach konzentrierter Enzympuffer
- 3  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Enzyme
- 40  $\mu\text{L}$  DNA
- 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

Im Anschluss wird die DNA mit dem „E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit“ (PeqLab, Deutschland) gereinigt.

### 2.3 Ligation

Um Restriktionsfragmente in einen Vektor zu klonieren, wird eine Ligation durchgeführt. Hierbei werden Inserts, die durch den Verdau die komplementären, überlappenden Enden zum Plasmid haben, in das Plasmid eingebaut. Das Insert muss hierfür in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:3 eingesetzt werden. Dabei sind die Längen der DNA-Fragmente ausschlaggebend. Sind Vektor und Insert in etwa gleichgroß, so wird ein Verhältnis von 1:1 verwendet. Es wird die T4-DNA-Ligase benutzt, die unter ATP-Verbrauch die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe inter- oder intramolekular katalysiert.

Für die Ligation wird eine Reaktionslösung mit einem Volumen von 7.5  $\mu\text{L}$  angesetzt:

- 3.5  $\mu\text{L}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$
- 3.0  $\mu\text{L}$  Insert-DNA (verdaut)
- 1.0  $\mu\text{L}$  Vektor-DNA (verdaut)

Der Reaktionsansatz wird 10 min bei einer Temperatur von 55°C inkubiert und 5 min auf 0°C abgekühlt. Die Hitzebehandlung dient dem Decoiling der DNA. Danach werden 2.0  $\mu\text{L}$  T4-Ligationspuffer und 0.5  $\mu\text{L}$  T4-Ligase zugegeben und der Ligationsansatz 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in kompetente Zellen transformiert und auf Agarplatten mit der jeweils entsprechenden Resistenz ausplattiert. Die Agarplatten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.4 Transformation

Die Transformation von Vektoren in elektrokompetente Zellen wird mittels Elektroporation nach Dower et al. durchgeführt<sup>[16]</sup>. Dabei erhalten die Zellen einen starken elektrischen Puls, wodurch eine kurzzeitige Bildung von Poren in der Zellmembran auftritt. Die DNA beschreibt eine beschleunigte Bewegung in Richtung Pluspol. Treffen beide Ereignisse zusammen, bildet sich eine mit Vektor transformierte Zelle.

Für die Transformation werden 40 µL elektrokompetente BL21(DE3)-Zellen und 1 µL Vektor in 2 mm-Elektroporations-Küvetten (PeqLab, Deutschland) vorgelegt und einem starken elektrischen Puls ausgesetzt. Anschließend werden die Zellen in 1 mL SOC-Medium aufgenommen und in ein steriles 1.5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Der Transformationsansatz wird über Nacht bei 37°C auf LB-Platten, mit für die Selektion geeignetem Antibiotikum, ausgestrichen oder in 50 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert

## 2.5 Plasmidisolierung

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wird der E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab, Erlangen) verwendet. Zuerst werden 5 mL der Bakterienkultur abzentrifugiert und das Sediment resuspendiert. Hierauf folgt eine alkalische Lyse der Bakterienzellen. Anschließend wird die Bakterienlösung mittels eines entsprechenden Puffers neutralisiert. Das Plasmid kann somit auf einem Trägermaterial (Silicagel) immobilisiert werden. Nach mehreren Waschschritten wird die DNA vom Trägermaterial eluiert. Die erhaltene Plasmid-DNA wird bei -20°C gelagert.

## 2.6 Sequenzierung

Die im Rahmen der Arbeit hergestellten rekombinanten Plasmide werden sequenziert, um eventuelle Mutationen auszuschließen. Dazu wird der Sequenzier-Service nach der Methode von Sanger et al. im Didesoxy-Verfahren<sup>[17]</sup> der Firma GATC Biotech AG, Deutschland in Anspruch genommen. Bei diesem Verfahren werden die DNA-Proben auf vier Reaktionsansätze für Sequenzierungs-PCRs mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden aufgeteilt. In jedem der Ansätze ist ein anderes 3'-Desoxynukleotid durch das entsprechende 2',3'-

Didesoxynukleotid ersetzt. Da der Einbau eines Didesoxynukleotids zum PCR-Abbruch führt, entstehen in jedem Reaktionsansatz unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die mit dem gleichen Nukleotid enden. Durch anschließende, hochauflösende Gelelektrophorese kann die Sequenz des Ursprungsfragments ermittelt werden.

## 2.7 Punktmutation

*S. aureus* ClpP-Proteine mit Punktmutation wurden mit dem QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eingeführt und von Malte Gersch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Sieber durchgeführt. Die dazu nötigen Primer wurden unter Angabe der Gensequenz sowie der gewünschten Aminosäureänderung aus dem Quick-Change Primer Design Programm unter <http://stratagene.com> erhalten. Für eine solche Vollplasmid-PCR wurde der pDONR 201-Vektor mit einkloniertem ClpP als Templat (1  $\mu$ L, 25 ng/ $\mu$ L) verwendet.

Ferner enthielt ein PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ L:

- 34  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O
- 5  $\mu$ L 10x-Puffer
- 4  $\mu$ L 50 mM MgSO<sub>4</sub>
- 2  $\mu$ L forward-Primer-Lösung (1:10 verdünnt, 10 ng/ $\mu$ L)
- 2  $\mu$ L reverse-Primer-Lösung (1:10 verdünnt, 10 ng/ $\mu$ L)
- 1  $\mu$ L 10 mM dNTP-Lösung
- 1  $\mu$ L Pfu Ultra HF Polymerase

Die PCR-Reaktion bestand aus einem initialen Lyseschritt bei 95°C für 2 min, gefolgt von 30 dreischrittigen Zyklen bestehend aus 95°C für 30 sec, 70°C für 1 min und 72°C für 3 min und einem finalen Elongationsschritt bei 72°C für 10 min. Die PCR wurde durch ein analytisches DNA-Gel überprüft und danach das methylierte Original-Plasmid mit DpnI verdaut. Dazu wurden 15  $\mu$ L eines PCR-Ansatzes mit 1  $\mu$ L DpnI für 1 h bei 37°C inkubiert. 5  $\mu$ L dieser Lösung wurden in chemisch kompetente XL1-Blue-Zellen transformiert.

## 3 Proteinchemische Methoden

### 3.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung dient der Kultivierung von Mikroorganismen über kurzfristige bzw. längerfristige Zeiträume. Stämme von *Escherichia coli* werden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C über Nacht inkubiert und bei Bedarf überimpft. Nach der Überprüfung eines Klons wird dieser als Dauerkultur gelagert. Hierfür werden 1 mL Übernachtkultur durch einminütige Zentrifugation bei 7000 Umdrehungen pro Minute (U/min) pelletiert und in 500 µL 30%igem LB-Glycerin-Medium resuspendiert. In diesem Medium werden die Zellen in Cryo Tubes in flüssigen Stickstoff eingefroren.

### 3.2 Expressionstests

Nach der Klonierung wurde zunächst die Expression der hergestellten Klone überprüft um den Klon mit dem höchsten Anteil an löslichem Zielprotein zu ermitteln sowie um die Parameter für die Proteinanzucht zu optimieren. Es wurden 20 mL Medium, welches die entsprechenden Antibiotika enthielt, mit einer Dauerkultur oder einer Zellkolonie von der Agarplatte überimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei ausreichendem Wachstum wurde diese Kultur in 50 mL Medium im Verhältnis 1:50 eingepflegt und über Nacht bei 30°C kultiviert. Anschließend wird die Zellsuspension 30 min bei 5000 U/min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wird in 1 mL Puffer aus 50 mM Tris, 20 mM Imidazol und 500 mM Natriumchlorid resuspendiert. Hiervon werden 900 µL mittels Ultraschall bei einer Amplitude von 20% und einer Gesamtpulsdauer von zweimal 20 sec aufgeschlossen. Nach zehnmütiger Zentrifugation des Zellysats bei 13.000 U/min wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, während das Pellet verworfen wird. Der Rohextrakt und die verbleibenden 100 µL Zellsuspension werden mittels SDS-PAGE analysiert. Durch Vergleich der entsprechenden Proteinbanden in den ganzen Zellen und im Rohextrakt kann der Anteil der löslich exprimierten Proteine ermittelt werden.

### 3.3 Anzucht von Expressionsklonen

Für die Vorkulturen werden 10  $\mu$ L *E. coli* Zellen aus einer Stickstoffkultur in 50 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotika überführt und über Nacht im Schüttelinkubator bei 150 rpm und 37°C kultiviert. Um eine Hauptkultur anzusetzen erfolgte eine 1:50 (V/V)-Verdünnung der Übernacht-Kultur in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika. Die Anzucht der Hauptkultur erfolgte in 1 L-Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator bei 37°C bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 erreicht ist. Anschließend wird mit 0.5 mmol IPTG Endkonzentration induziert. Die Expression des Proteins erfolgt weiterhin für 4 h bei 37°C unter Schütteln. Nach der Anzucht werden die Zellen mittels Zentrifugation (5000 U/min, 30 min, bei 4°C) geerntet und im entsprechenden Puffer resuspendiert.

### 3.4 Zellaufschluss von Bakterienzellen

Der Zellaufschluss erfolgte entweder in einer French Press (Constant Systems LTD, GB) oder mit einem Ultraschall-Sonifier (Branson Ultrasonics LTD, Shanghai). Hierfür werden die im Puffer resuspendierten Zellen mit je einer Spatelspitze Pefabloc und DNase I versetzt. Die Zellen werden dann in der French Press durch großen Druck (1.8 kbar) oder im Sonifier durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Proteinsuspension wird durch Zentrifugation (13000 rpm, 15 min bei 4°C) von den Zellrückständen abgetrennt.

### 3.5 Lyse von *S. cerevisiae* Zellen

120 g Hefe wurde in 150 mL Puffer aus 50 mM Kaliumphosphat pH 7.5 gelöst. DNase I wurde hinzugefügt und für 5 min gerührt. Die Hefezellen wurden mit einer French Press (Constant Systems LTD, GB) bei 2.5 kbar aufgeschlossen. Die Proteinsuspension wird durch Zentrifugation (13000 rpm, 30 min bei 4°C) von den Zellrückständen abgetrennt. Zu dem Überstand wurde 30% gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung unter ständigem Rühren gegeben. Die Mischung wurde anschließend gefiltert um die Fettsäure- und Lipid-Kontaminationen zu entfernen.

### 3.6 Native 20S Proteasom Reinigung

Die native 20S Proteasom-Reinigung wurde zusammen mit Richard Feicht durchgeführt. Als erstes wurde das *S. cerevisiae* Lysat auf eine Hand-gepackte Phenyl-Sepharose Säule (100 mL, Durchmesser 4 cm, Höhe 10-15 cm) gegeben, die zuvor mit Puffer 5 (20 mM Kaliumphosphat, pH 7.5, 1 M Ammoniumsulfat) mit einer Flussrate von 5 mL/min equilibriert wurde. Für die Proteinelution wurde ein linearer Gradient von 1 M auf 0 M Ammoniumsulfat in einem Volumen von 4 Säulenvolumen verwendet. Das 20S Proteasom wird in etwa bei 0.8 – 0.5 M Ammoniumsulfat eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden auf Proteasomaktivität mithilfe des fluorogenen Assays getestet. Hierfür wurden 30 µL von jeder Fraktion in eine 96 Well Platte pipettiert und 1 µL von 10 mM Y-Substrat LLVY-AMC zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT für 1 h inkubiert und anschließend die Fluoreszenz bei  $\lambda_{exc} = 360$  nm,  $\lambda_{em} = 460$  nm gemessen. Die Fraktionen, die das 20S Proteasom enthalten, werden vereint und auf eine Hand-gepackte Hydroxyapatit Säule (Volumen 6 mL, Durchmesser 3 cm, Höhe 2-3 cm) gegeben. Die Hydroxyapatit-Säule wurde zuvor mit Puffer 6 (20 mM Kaliumphosphat, pH 7.5) bei einer Flussrate von 4 mL/min equilibriert. Für die Proteinelution wurde ein linearer Gradient von 20 mM auf 500 mM Kaliumphosphat in einem Volumen von 20 Säulenvolumen verwendet. Das 20S Proteasom eluiert in etwa bei 130 mM Kaliumphosphat. Fraktionen wurden analog zur Phenyl-Sepharose-Säule gesammelt, auf Aktivität getestet und vereint. Als nächstes wurde eine Resource Q Säule (6 mL Säulenvolumen, Durchmesser 1.6 cm, Höhe 3 cm) mit 20 mM Tris/HCl, pH 7.5 bei einer Flussrate von 2 mL/min equilibriert. Die positiv getesteten Fraktionen wurden aufgetragen. Für die Proteinelution wurde ein linearer Gradient von 0 mM auf 500 mM NaCl in einem Volumen von 10 Säulenvolumen verwendet. Das 20S Proteasom eluiert in etwa bei 500 mM NaCl. Fraktionen wurden analog zur Phenyl-Sepharose-Säule gesammelt, auf Aktivität getestet und vereint. Danach wurde eine HiPrep<sup>TM</sup> 26/10 Entsalzungssäule (Säulenvolumen 50 mL, Durchmesser 2.6 cm, Höhe 10 cm) mit 20 mM Tris/HCl, pH 7.5 bei einer Flussrate von 2 mL/min equilibriert. Die durch die Resource Q Säule ausgewählten Fraktionen wurden aufgetragen. Das Eluat wurde aufgefangen und die Fraktionen analog zur Phenyl-Sepharose-Säule auf Aktivität getestet.

Eine SDS-Gel-Analyse, wie unter 4.2 SDS-PAGE beschrieben, wurde nach jeder Säule für die positiv getesteten Fraktionen durchgeführt,

### 3.7 Proteinreinigung von ClpP

Die Proteinreinigung von *SaClpP* wurde zusammen mit Malte Gersch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Sieber durchgeführt. Die aufgeschlossene Kultur wird bei 13.000 rpm, 15 min abzentrifugiert und auf eine StrepTrap-Säule, die als Medium StrepTactin Sepharose besitzt und sich zur Aufreinigung von Proteinen mit einem Streptavidin-Tag (Strep-Tag) eignet, aufgetragen. Der Strep-Tag ist ein synthetisches Peptid, das aus acht Aminosäuren besteht (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) und an StrepTactin bindet. Für 9 L-Ansätze wurden hierzu StrepTrap-HP 5 mL-Säulen, an einem ÄKTA Purifier-System mit UV-Detektor verwendet. Die Säule wurde zunächst mit 50 mL Puffer 1 (100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) bei 5 mL/min gespült, woraufhin das Lysat mit 4 mL/min aufgetragen wurde. Der Abfall des UV-Signals wurde während des Waschens mit mindestens 50 mL bei einer Flussrate von 4 mL/min verfolgt. Wurde das Basislevel erreicht, wurde mit 4 mL/min Flussrate Elutionspuffer (Puffer 1 + 2.5 mM Desthiobiotin) auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde in 2.5 mL-Fractionen aufgefangen, entsprechend des UV-Peaks vereinigt und per Gelelektrophorese auf die Reinheit überprüft. Die Säule wurde nach Benutzung mit jeweils 5 mL/min mit 10 mL Wasser, 10 mL 0.5 M NaOH und 0 mL Wasser gewaschen und mit 25 mL 20% Ethanol gespült.

### 3.8 Gelfiltration

Zur Kalibrierung der Gelfiltrations-Säule wurde ein Set aus Standardproteinen verwendet: Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin (54 kDa), Carbonanhydrase (29 kDa), Ribonuclease A (13.7 kDa) und Aprotinin (6.5 kDa). Die Gelfiltrationssäule wurde mit Puffer 2 equilibriert und anschließend das Protein aufgetragen. Die Proteinmassen wurden anhand ihrer Retentionszeit durch lineare Regression, die durch die Anleitung des Herstellers gegeben war, berechnet. Durch eine Gelfiltration kann herausgefunden werden, welchen Oligomerisierungszustand das Protein einnimmt. Bei ClpP kann zwischen einem Heptamer und Tetradecamer unterschieden werden.

## 4 Physikalische Methoden

### 4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe wird die Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid eingesetzt. Ethidiumbromid, ein Phenanthridin-Farbstoff, besitzt starke Absorption bei 210, 316 und 480 nm. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen den Basen der DNA, wodurch sich ihr Anregungsspektrum stark verändert und die Fluoreszenz bei Anregung durch UV-Licht verstärkt wird. Mit dieser Methode können DNA-Banden sichtbar gemacht werden.

Zur Herstellung des 1%igen Gels wird in Gegenwart des DNA-Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid 0.5 g Agarose mit 50 mL 1 x TAE-Puffer verwendet. Nach dem Erhitzen wird das Gel in eine Gelkammer gegossen und gewartet bis das Gel erstarrt ist. Die Proben mit einem Gesamtvolumen von 10 µL sind aus 2 µL DNA-Auftragspuffer (6x), der entsprechenden DNA und bidest. H<sub>2</sub>O zusammengesetzt. Das Volumen der DNA sowie des H<sub>2</sub>O werden der DNA-Konzentration angepasst und in die Geltaschen gegeben. Die durchschnittliche Laufzeit bei einer Gleichspannung von 100 bis 150 V beträgt ca. 45 min. Die Stromstärke liegt abhängig von der Ionenstärke des Laufpuffers bei 60 bis 200 mA. Durch die Porengröße der Agarosematrix werden größere DNA-Moleküle stärker zurückgehalten als kleine. Diese Tatsache beruht zum einen auf dem Ogston-Siebeffekt, nach dem DNA eine globuläre Form annimmt und von Poren geringerer Größe zurückgehalten wird, zum anderen auf der Reputations-theorie.<sup>[18]</sup> Die Größe der aufgetragenen DNA wird mittels eines Längenmarkers abgeschätzt.

Für die Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird das Gel Extraktion Kit (PeqLab, Deutschland) verwendet. Das Prinzip der Aufreinigung besteht darin, dass die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung an eine Silika-Membran bindet und nach einem Waschschrift wieder von der Säule eluiert werden kann. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

## 4.2 SDS-PAGE

Um eine Aussage über die Größe eines denaturierten, monomeren Proteins treffen zu können, wird eine SDS-PAGE nach Laemmli et al. durchgeführt.<sup>[19]</sup> Die zu untersuchende Probe wird 10 min bei 100°C mit SDS-haltigem Probenauftragspuffer gekocht. Dadurch wird die native Konformation der Proteine aufgehoben. Das Natriumdodecylsulfat bindet als anionisches Detergenz an die Proteinoberfläche und überdeckt deren Eigenladung, so dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Das im Auftragspuffer vorhandene  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken. Die mit SDS beladenen Proteine bewegen sich im elektrischen Feld zur Anode und werden dabei abhängig von ihrer Größe von der Polyacrylamid-Matrix zurückgehalten.

Es wird ein diskontinuierliches System aus Sammelgel und Trenngel verwendet. Gereinigte Proteinfraktionen und andere Proteinlösungen werden mit Auftragspuffer geeignet verdünnt. Maximal 15  $\mu$ L finden in den Geltaschen Platz. Die Elektrophorese wird für 1 h mit 25 mA pro Gel betrieben. Zum Färben der Proteinbanden wird das Gel eine 30 min mit Coomassie-Brillantblau gefärbt. Anschließend wird es in der Entfärbelösung entwickelt. Ein Proteinstandard diente zur Bestimmung der Größe der Probenbanden.

## 5 Kinetik-Messungen

### 5.1 ClpP Aktivitätsassay mit fluoreszierendem Substrat

Der Aktivitätsassay mit fluoreszierendem Substrat wurde zusammen mit Malte Gersch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Sieber durchgeführt. Die Bestimmung der Aktivität von ClpP erfolgte über einen Kinetik-Assay, in dem ein fluorogenes Substrat (Z-LY-AMC) umgesetzt und die Fluoreszenz des entstehenden Aminocoumarins gemessen wird (Anregung: 340 nm, Emission: 450 nm). Hierfür wurden 25  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Puffers, 7  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 3  $\mu\text{L}$  ClpP-Lösung (1 mg/mL) und 15  $\mu\text{L}$  verdünnte AMC-Lösung (100 mM Lösung in DMSO 1:150 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt) in einem Well einer schwarzen Microtiterplatte zusammengegeben. Jede Bedingung wurde dreimal überprüft, als Kontrolle wurde eine Lösung ohne ClpP verwendet. Die finale Konzentration des ClpP-Monomers betrug 2.66  $\mu\text{M}$ , die Konzentration des fluorogenen Substrats 667  $\mu\text{M}$ . Nach der Temperierung der Platte (Standard: 30°C) wurde die Fluoreszenz in jedem Well über 30 min jede Minute durch 20 Integrationen gemessen. Die Steigung wurde durch lineare Regressionsrechnung im Programm Micrcal Origin 6.0 erhalten und durch die negative Steigung einer Kontrolllösung korrigiert. Damit wurde auch das Bleichen des freien Aminocoumarins einbezogen. Der damit erhaltene Wert diente als relative Angabe der Aktivität der ClpP-Probe. Sofern nicht anders erwähnt, wurde Puffer 4 (200 mM KCl, 100 mM MES pH 7.0) verwendet.

### 5.2 Aktivitätsbasiertes Markierungsexperiment

Das Aktivitätsbasierte Markierungsexperiment wurde zusammen mit Malte Gersch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Sieber durchgeführt. Die Proteinproben wurden auf 0.25 mg/mL mit Puffer 2 (100 mM NaCl, 200 mM Tris/HCl pH 7.) auf ein Volumen von 43  $\mu\text{L}$  verdünnt und 1  $\mu\text{L}$  von dem ClpP spezifischen Lacton D3-Ligand wurde hinzugefügt (5 mM in Dimethyl-Sulfoxid, 10  $\mu\text{M}$  Endkonzentration). Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde 1  $\mu\text{L}$  5 mM Rhodaminazid (100  $\mu\text{M}$  Endkonzentration), gefolgt von 1  $\mu\text{L}$  50 mM TCEP in ddH<sub>2</sub>O (1 mM Endkonzentration) und 3  $\mu\text{L}$  TBTA (1.67 mM in Dimethylsulfoxid, 100  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) zugegeben. Die Proben wurden vermischt und die Cycloaddition durch die Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  (1  $\mu\text{L}$ , 50 mM in ddH<sub>2</sub>O, 1 mM Endkonzentration) initiiert. Die Reaktion wurde für 1 h bei RT inkubiert. Für das SDS-Gel wurden 50  $\mu\text{L}$  des 2fach SDS Ladepuffers zugegeben und 50  $\mu\text{L}$  von der resultierenden Lösung auf das Gel aufgetragen. Die Fluoreszenz wurde mittels eines Fujifilm Las-4000

lumineszent Bild-Analyzers, einer Fujinon VRF43LMD3 Linse und einem 575DF20 Filters beobachtet.

### **5.3 Thermal Shift Assay**

Der *Thermal Shift Assay* wurde zusammen mit Malte Gersch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Sieber durchgeführt. 5  $\mu\text{L}$  von 45  $\times$  SYPRO Orange, 15  $\mu\text{L}$  Puffer 2 und 5  $\mu\text{L}$  Proteinprobe (0.25 mg/mL) wurden auf Eis in einer weißen 96 Well PCR-Platte gemischt. Die Fluoreszenz wurde von 20°C bis 80°C in 0.5°C Schritten durchgeführt (Anregung 450-490 nm, Detektion 560-580 nm). Alle Messungen wurden dreifach überprüft. Die Auswertung und Schmelzpunkt Bestimmung wurde mit Bio-Rad CFX Manager Software gemacht.

### **5.4 Protease-Aktivitätstest mit FITC-Casein**

In jeden Ansatz werden 20  $\mu\text{L}$  Inkubationspuffer, 20  $\mu\text{L}$  FITC-Casein und 10  $\mu\text{L}$  der zu testenden Probe pipettiert. Als Positivkontrolle wird derselbe Ansatz mit 10  $\mu\text{L}$  Trypsin angesetzt. Als Blank wird Wasser anstatt der Probe verwendet. Die Probe wird gemischt und anschließend bei 37°C im Dunkeln für 24 h inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion werden 150  $\mu\text{L}$  einer 0.6 M TCA-Lösung zugegeben und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 10.000 rpm werden 2  $\mu\text{L}$  des Ansatzes mit 200  $\mu\text{L}$  Assaypuffer in eine weiße 96 Well Mikrotiterplatte pipettiert und die Fluoreszenz gemessen (Extinktion = 485 nm, Emission = 535 nm).

### **5.5 Punktmessung der 20S Proteasom-Aktivität**

Um eine anfängliche Tendenz für die Inhibitor-Bindung an das 20S Proteasom zu erlangen, wurden Endpunktbestimmungen aller drei Aktivität durchgeführt. Unterschiedliche Konzentrationen des 20S Proteasoms wurden abhängig von der zu untersuchenden Aktivität verwendet. Für die Chymotrypsin- und Caspase-ähnliche Aktivitätsbestimmung wurden 0.01 mg/mL und für die Trypsin-ähnlich 0.075 mg/mL verwendet. Die Trypsin-ähnliche Aktivität nimmt bei Lagerung schnell ab und wurde daher nur mit frischem Proteasom bestimmt. Die Inhibition der Enzymaktivität wurde durch die Hydrolyse von fluorogenen Substraten ermittelt. Für die Bestimmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität wurde Suc-

LLVY-AMC, für die Trypsin-ähnliche Z-LLR-AMC und für die Caspase-artige das Z-LLE-AMC als Substrat unter folgenden Pufferbedingungen 20 mM Tris, pH 7.5, 0.01 % (w/v) SDS verwendet. Die Inhibitoren wurden mit einer Endkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  mit dem 20S Proteasom aus *S. cerevisiae* für 15 min inkubiert bevor das Substrat mit einer Endkonzentration von 250  $\mu\text{M}$  zugegeben wurde. Die Reaktion wurde bei RT für 1 h inkubiert und anschließend die Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$  gemessen. Der Prozentteil der Restaktivität wurde berechnet, indem eine Kontrolllösung ohne Inhibitor als 100% Aktivität eingesetzt wurde. Alle Inhibitoren waren in DMSO gelöst und wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Aufgrund der Aktivitätsabnahme des 20S Proteasoms durch Zugabe von DMSO, wurde immer eine gleiche Menge an DMSO in allen Fraktionen benutzt.

## 5.6 $\text{IC}_{50}$ Bestimmung der 20S Proteasom Aktivität

Um den  $\text{IC}_{50}$ -Wert zu bestimmen wurde die Methode von 5.5 *Punktmessung der 20S Proteasom-Aktivität* verwendet, wobei eine Reihe an verschiedenen Inhibitorkonzentrationen eingesetzt wurde. Die unterschiedliche Prozentzahl an verbleibender Aktivität wurde gegen die log Konzentration des entsprechenden Inhibitors aufgetragen. Die Werte wurden durch die Analyse der Inhibitionsprozent gegen die Verbindungskonzentration erhalten und die experimentellen Daten wurden anhand des Vergleichs  $\% \text{Inhibition} = [\text{I}]_0 / (\text{IC}_{50} + [\text{I}]_0)$  angepasst.

## 6 Röntgenstrukturanalytische Methoden

### 6.1 Probenpräparation vom 20S Proteasom

Die Fraktionen, die nach der HiPrep™ 26/10 Entsalzungssäule erhalten wurden, befinden sich in 20 mM Tris/HCl, pH 7.5. Zum Aufkonzentrieren auf 40 mg/mL wurden Amicon Ultrazentrifugal-Filter mit einem Mass-cut-off von 100 kDa verwendet. Vor jedem Kristallisationsansatz wurde die Reinheit des Proteins mit einem Coomassie-Gel überprüft und die Aktivität sichergestellt.

### 6.2 Probenpräparation von SaClpP

Zum Umpuffern in Puffer 3 (20 mM Tris pH 7.5) und Aufkonzentrieren auf 13 mg/mL (5.8 µM/mL Monomer) wurden Amicon 15 Ultrazentrifugal-Filter mit einem Mass-cut-off von 10 kDa verwendet. Vor jedem Kristallisationsansatz wurde die Reinheit des Proteinstocks mit einem Coomassie-Gel überprüft und die Aktivität mit einem Kinetik-Assay sichergestellt.

### 6.3 Kristallisation

Kristallisationsansätze der gereinigten Proteine werden bei 20°C mit der Dampfdiffusionsmethode durchgeführt.<sup>[20]</sup> Bei dieser Methode wird die Proteinlösung mit dem Puffer im gewünschten Verhältnis gemischt und entweder als hängender (*hanging drop*) oder als sitzender Tropfen (*sitting drop*) oberhalb eines Reservoirs aus reinem Kristallisationspuffer angebracht. Voraussetzung für den Vorgang der Dampfdiffusion im Kristallisationsansatz ist, dass es sich dabei um ein geschlossenes System handelt. Der Konzentrationsunterschied in den beiden Lösungen führt dazu, dass Wasser durch Diffusion aus dem Proteinlösungstropfen durch die Gasphase hindurch in das höher konzentrierte Reservoir übertritt, so dass schließlich die Proteinkonzentration im Tropfen langsam zunimmt bis die Kristallisation eintritt.

Sitting-drop Platten mit 96 Reservoirs werden mit verschiedenen Puffersystemen mit einem Gesamtvolumen von 40 µL befüllt. Für die Kristallisationsansätze werden Proteinkonzentrationen von 10 mg/mL eingesetzt. Es werden je 0.2 µL oder 0.1 µL der Proteine in die Kristallisationsschälchen gegeben und mit 0.2 µL oder 0.1 µL der Reservoirlösung verdünnt. Die Kristallisationsansätze werden bei 20°C oder 4°C gelagert. Das Kristallwachstum wird täglich überprüft. Bei beobachteter Kristallisationstendenz wird

ein Feinscreen mit den vielversprechenden Pufferbedingungen durchgeführt um das Kristallwachstum und deren Ordnung zu optimieren.

#### 6.4 Feinscreen-Ansätze für SaClpP

Feinscreens wurden mit der Hanging-Drop-Vapor-Diffusions-Methode angesetzt. Hierzu wurden die entsprechenden Kristallisationspuffer in die Wells einer 24-Well-Platte pipettiert. Auf einem runden Glasplättchen wurden 1  $\mu\text{L}$  der Protein-Lösung sowie 1  $\mu\text{L}$  des Reservoirs vermischt, auf das Well gesetzt und luftdicht verschlossen. Die Kristallisation erfolgte bei 20°C unter temperierten Bedingungen. Bei erhaltenen Kristallen wurden diese auf Polarisation geprüft und gegebenenfalls kryokonserviert, wozu der Kristall in 5  $\mu\text{L}$  Protektivum gegeben wurde.

#### 6.5 Soaking der Proteasom-Kristalle mit Inhibitor

Kristalle des 20S Proteasoms von *S. cerevisiae* wuchsen in *Hanging Drops* bei 20°C.<sup>[21]</sup> Die Proteinkonzentration war 40 mg/mL in 10 mM Tris/HCl (pH 7.5) und 1 mM EDTA bei der Kristallisation. Die Tropfen bestanden aus 3  $\mu\text{L}$  Protein und 2  $\mu\text{L}$  Reservoirlösung (30 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 100 mM MES (pH 7.2), 12% 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD)). Die Kristalle entstanden innerhalb von zwei Tagen und hatten eine finale Größe von ca. 50×200×500  $\mu\text{m}^3$ . Es wurden 5  $\mu\text{L}$  Reservoirlösung auf den Tropfen gegeben, bevor 0.5  $\mu\text{L}$  des Inhibitors (20 mM - 100 mM anfängliche Konzentration) zugegeben und für mindestens 24 h mit den Inhibitoren bei 20°C inkubiert wurde. Danach wurde zu den Kristallen Kryoprotektant-Puffer (30% MPD, 20 mM MgOAc, 100 mM MES, pH 6.9) gegeben und die Kristalle in flüssigen Stickstoff bei 100 K gelagert.

#### 6.6 Datensammlung und Auswertung

Datensätze von Proteinen wurden sowohl an dem Generator des Lehrstuhls als auch an zwei verschiedenen Synchrotrons aufgenommen. Tabelle 7 gibt einen Überblick über den experimentellen Aufbau der verschiedenen Messstationen an denen die Datensammlung stattfand. Alle Messungen erfolgten unter einem Flüssigstickstoffstrom bei einer Temperatur von 100 K.

**Tabelle 7:** Übersicht über die Institute und den experimentellen Aufbau an denen die Datensätze aufgenommen wurden.

Institut	Röntgenstrahlen- quelle	Art der Strahlen- quelle	Detektor
Lehrstuhl für Biochemie, TUM	X8 PROTEUM Generator	Cu-K $\alpha$ -Drehanode	PLATINUM CCD
Swiss Light Source (SLS), Paul-Scherer- Institut	Beamline PXI	Synchrotron	Pilatus 6M
SLS	Beamline PXIII	Synchrotron	MAR CCD
European Synchrotron Radiation Facility	Beamline ID29	Synchrotron	Pilatus 6M

Die am eigenen Generator gemessenen Datensätze wurden bei einer Wellenlänge von 1.5418 Å gemessen, entsprechend der Emission der Cu-K $\alpha$ -Drehanode. Für die Datensätze wurde dabei eine 360°-Messung mit Winkelinkrementen von 2.5° und einer Belichtungsdauer von 30 s durchgeführt. Die Messstationen am Synchrotron sind mit Area-Detektoren ausgestattet, wodurch sich die Parameter für die Messung veränderten. Nativen Datensätze wurden bei einer Wellenlänge von 1.0 Å gemessen. Die Datensammlung erfolgte mit Winkelinkrementen von 0.5° bzw. 0.25° und Belichtungszeiten von 0.5 s bzw. 0.25 s. Der insgesamt gemessene Winkel für einen kompletten Datensatz umfasste generell 180°.

## 6.7 Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung

Die Reflexintensitäten und Datenreduktion wurden mit dem XDS Programmpaket ausgeübt.<sup>[14]</sup> Das Phasenproblem wurde mit Hilfe des Molekularen Ersatzes gelöst, wobei hierfür zunächst die Koordinaten von bereits gelösten Strukturen als Ausgangsmodell (PDB 1RYP für das 20S Proteasom<sup>[22]</sup>, PDB 3QWD für SaClpP) benutzt wurden. Alle Phasierungen erfolgten mit dem Programm PHASER<sup>[9]</sup> mittels der Maximum-Likelihood-Methode und die Verfeinerungen der Atomkoordinaten wurden mit REFMAC<sup>[12]</sup> oder mit dem CNS Programm<sup>[23]</sup> durchgeführt. Um ein chemisch korrektes Modell zu erhalten wurden bereits bekannte Parameter (Bindungslängen, -winkel, Geometrien, Planarität, Chiralität) in die

Verfeinerung einbezogen. Bei der Verfeinerung der Daten wurden systematische Fehler in dem Modell ausgeschlossen, indem besondere Sorgfalt auf den freien R-Faktor ( $R_{\text{free}}$ ), der frei von jeglichem Bias ist, gelegt. Hierfür wurden 5% der Reflexe willkürlich ausgewählt und als Testsatz von der Verfeinerung ausgeschlossen.<sup>[24]</sup> Die Betrachtung des freien R-Faktors im Vergleich zu dem kristallographischen R-Faktors ( $R_{\text{work}}$ ) gibt einen Hinweis für die Überanpassung der Daten. Wenn nach einem Verfeinerungsschritt beide Werte,  $R_{\text{free}}$  und  $R_{\text{work}}$ , sinken wurde das Modell weiter verbessert. Steigt  $R_{\text{free}}$  im Gegensatz zu  $R_{\text{work}}$  wurde ein Bias in das Modell eingeführt, indem beispielsweise zu viele Wassermoleküle in das Hintergrundrauschen der Elektronendichte eingepasst wurden.<sup>[25]</sup> Für ClpP und das Proteasom wurde die Elektronendichte entsprechend der nicht-kristallographischen zyklischen Mittelung und Rücktransformation der Reflexe verbessert, wofür das Programm MAIN benutzt wurde.<sup>[26]</sup> Der Einbau der Wassermoleküle in das Atommodell erfolgte mit dem Programm ARP/wAPR<sup>[6]</sup> und die anschließende Validierung mit COOT.<sup>[27]</sup> Die Berechnung des Ramachandran-Plots wurde mit dem Programm PROCHECK<sup>[10]</sup> durchgeführt.

## 6.8 Einbau von Liganden

Topologie- und Parameter-Files für den Liganden für die Komplexstrukturen wurden durch Powell-Minimierung des erhaltenen pdb-Files mit dem Programm SYBYL<sup>[28]</sup> erhalten und die notwendigen Bibliotheken mit den geometrischen Informationen mit SKETCHER<sup>[29]</sup> erstellt. Der Einbau und die Optimierung der Ligandenkoordinaten in das atomare Modell wurden mit dem Programm COOT durchgeführt.<sup>[27]</sup> Die TLS-Verfeinerung wurde mit dem Programm REFMAC5 des CCP4 Pakets bzw. eine Bulk-Solvens-Korrektur mit CNS durchgeführt.<sup>[12, 30]</sup>

## 6.9 Graphische Darstellung

Die graphische Darstellung von Molekülmodellen erfolgte mit dem Programm PyMOL<sup>[11]</sup>, BOBSCRIPT<sup>[31]</sup> oder MOLSCRIPT<sup>[32]</sup>. Wenn Elektronendichten gezeigt sind wurde eine  $2F_{\text{O}}-F_{\text{C}}$ -Karte mit einer Konturierung von  $1 \sigma$  verwendet. Die beschrifteten Abbildungen der Kristallstrukturen wurden mit CorelDRAW erstellt.

---

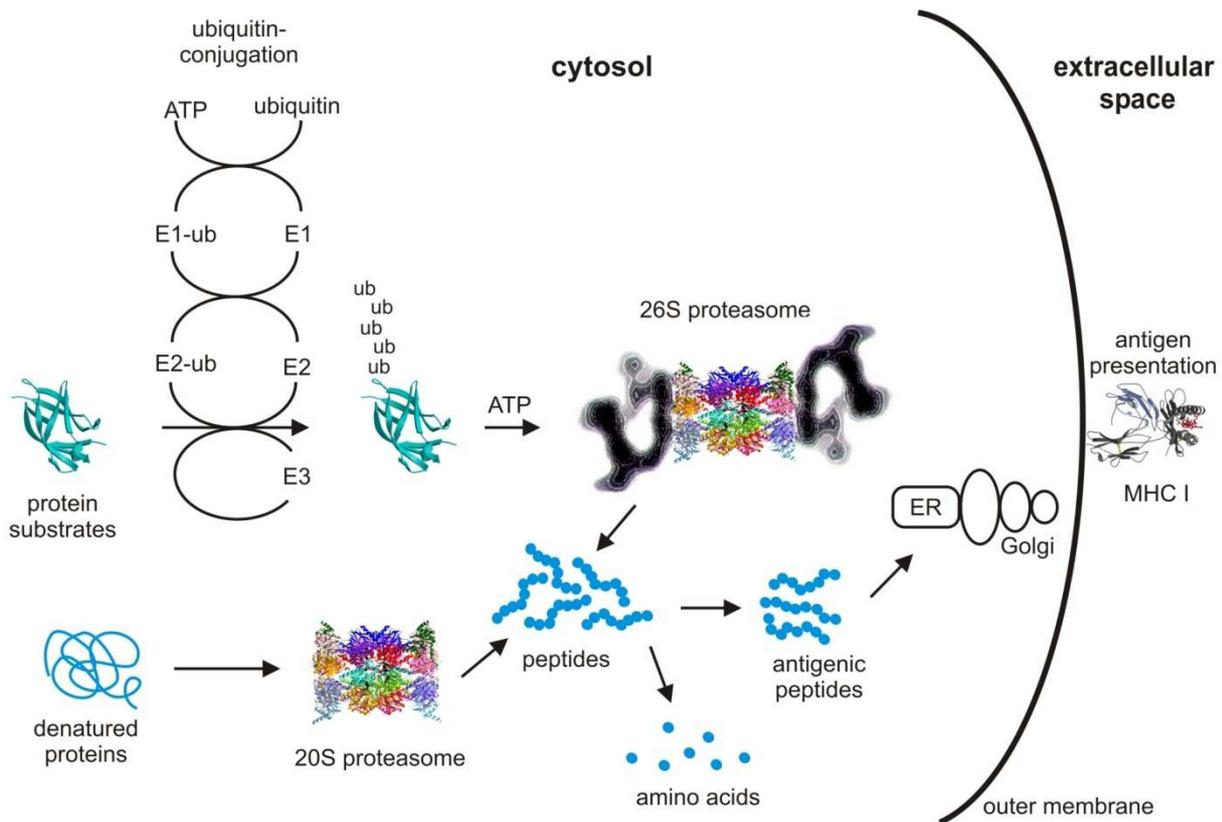
### **III Proteasom-Inhibitoren**



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist das zentrale, nicht-lysosomale Proteinabbau-System der Zelle.<sup>[33]</sup> Es ist sowohl für den Abbau funktionsloser oder fehlgefalteter Proteine im Sinne einer Qualitätskontrolle, als auch für die kontrollierte Degradation regulatorischer Proteine verantwortlich. Somit muss dieser Stoffwechselweg während des Zellzyklus streng kontrolliert werden. Alle zum Abbau vorgesehenen Proteine werden posttranslational mit einer Polyubiquitin-Kette markiert und anschließend durch das Proteasom in Peptide mit einer Länge von 8-25 Aminosäuren abgebaut.<sup>[34]</sup> Ubiquitin ist in alle Eukaryoten konserviert. Diese Polyubiquitin-Markierung wird von den drei Enzymen E1, E2 und E3 katalysiert<sup>[35]</sup>. Im ersten enzymatischen Schritt der Ubiquitinierung wird das Ubiquitin-Monomer durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 unter ATP-Verbrauch aktiviert.<sup>[36]</sup> Die Selektivität kommt dadurch zustande, dass es für jedes Protein genau ein E1-Enzym gibt, das spezifisch für dessen Aktivierung ist. Es entsteht ein Ubiquitinadenylat (Ub-AMP), das mit seiner C-terminalen Carboxylgruppe über eine kovalente Thioesterbindung an ein Cystein des E1 gebunden ist.<sup>[37]</sup> Im nächsten Schritt wird Ubiquitin auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 übertragen. Es entsteht wiederum eine Thioesterbindung zwischen dem Cystein des E2 und dem Ubiquitin. Schließlich überträgt die E3-Ligase das Ubiquitin aus dieser zweiten Thioesterbindung auf das Substratprotein.<sup>[38]</sup> Hierbei entsteht eine Isopeptidbindung zwischen der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins im Zielprotein und dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins.<sup>[39]</sup> Die Energie für die Bildung dieser Isopeptidbindung kommt aus der Hydrolyse von ATP. Nachfolgend werden weitere Ubiquitin-Monomere an die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysinrestes eines bereits gebundenen Ubiquitins angehängt, bevorzugt an Lys48, um eine Ubiquitin-Kette zu bilden. Die Polyubiquitin-Kette am Substrat wird vom 26S-Proteasom, der Hauptkomponenten dieses Proteinabbauweges, erkannt, wenn sie aus mindestens vier Ubiquitin-Monomeren besteht. Das eukaryotische 26S-Proteasom besteht aus dem 20S Proteasom und zwei 19S-Untereinheiten, die ihrerseits aus mehreren Proteinen zusammengesetzt sind. Dem prokaryotischem 26S-Proteasom fehlen die 19S-Untereinheiten. Die beim Abbau durch das Proteasom entstehenden Oligo-Peptide werden durch weitere Peptidasen zerkleinert oder von der Zelle für andere zelluläre Prozesse, wie z.B. der Antigen-Präsentation verwendet (siehe Abbildung 1).<sup>[38]</sup>



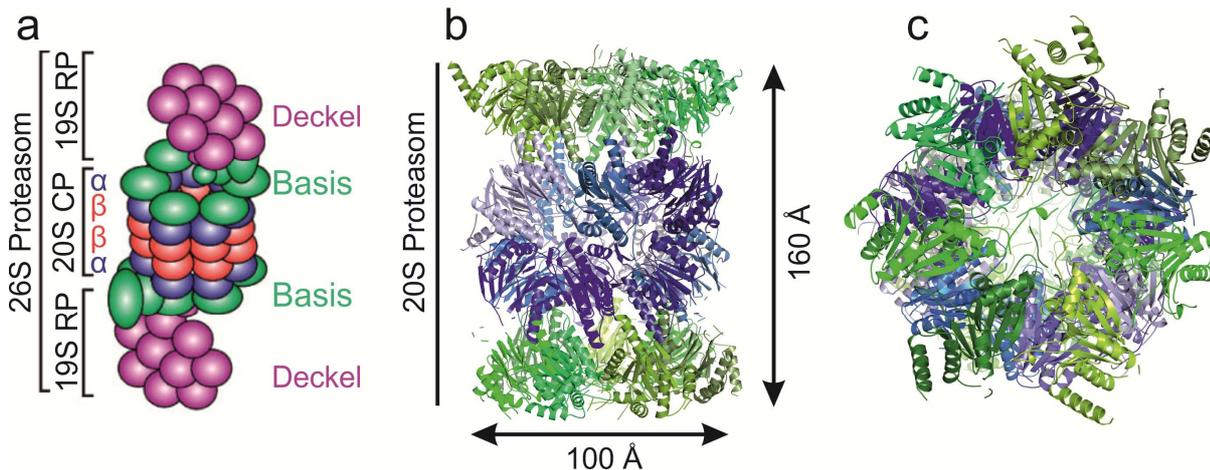
**Abbildung 1:** Proteasomaler Abbau von Polyubiquitin-markierten Proteinsubstraten. Ubiquitin wird unter ATP-Verbrauch aktiviert und an das abzubauenende Protein über eine Kaskade von E1-E3 Enzymen angehängt. Das 26S Proteasom erkennt die ubiquitinierten Proteine, entfaltet diese und zerschneidet sie in Peptide, die für andere Zellfunktionen genutzt werden können oder generell durch weitere Proteasen in Aminosäuren abgebaut werden.<sup>[40]</sup>

Die Bindung von Ubiquitin an Proteine erfolgt reversibel. Deubiquitinierende Enzyme zerschneiden spezifisch die Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins und des konjugierten Proteins, sobald die Ubiquitinkette vom 19S Cap des 26S Proteasoms erkannt wurde. Die einzelnen Ubiquitin-Moleküle werden dann wiederverwendet.<sup>[33, 38]</sup>

## 1.2 Das 26S und 20S Proteasom

Das Proteasom-System (siehe Abbildung 2) ist die wichtigste Komponente des Ubiquitin-Proteasom-Systems zum Abbau von Proteinen in der Zelle, die sowohl bei Eukaryoten als auch bei Prokaryoten vorkommt. Es besitzt eine Reihe von Aufgaben, zu denen die Proteinqualitätskontrolle, Antigen-Prozessierung, Signaltransduktion, Zellzykluskontrolle, Zelldifferenzierung und Apoptose zählen.<sup>[41]</sup> Eine Fehlfunktion des proteasomalen Protein-Abbaus hat gravierende Auswirkungen auf die Zelle, wie zum Beispiel eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine und steht in engem Zusammenhang mit der Entstehung von Krankheiten wie Alzheimer, Asthma, Krebs und Diabetes Typ I<sup>[42]</sup>.

Das eukaryotische Proteasom ist ein 26S-Proteasom-Komplex mit einem Molekulargewicht von 2.5 MDa, das aus einer 20S- und einer 19S-Untereinheit besteht<sup>[22, 43]</sup>. Die 19S-Untereinheit ist für die Erkennung, Bindung und Entfaltung Ubiquitin markierter Proteine verantwortlich.<sup>[44]</sup> Die 19S Untereinheit ist ein Komplex aus mehreren Untereinheiten, der in zwei Hauptstrukturen eingeteilt werden kann: Basis und Deckel.<sup>[45]</sup> Die Basis besteht aus sechs verschiedenen AAA-ATPase Untereinheiten, die als RPT1-6 (*Regulatory Particle ATPase proteins*) bekannt sind, und aus drei nicht ATPase Untereinheiten, den RPN1-2 (*Regulatory Particle Non-ATPase proteins*) und RPN13.<sup>[46]</sup> Der Deckel besteht aus neun Untereinheiten RPN3, RPN5-9, RPN11-12 und RPN15. Basis und Deckel sind über den Linker RPN10 miteinander verbunden.<sup>[47]</sup> Die genaue Organisation und die Rolle der 19S Untereinheit im gesamten 26S Komplex sind bisher kaum verstanden. Dagegen konnten die Kristallstrukturen sowohl des prokaryotischen als auch des eukaryotischen 20S Proteasoms bis auf atomare Auflösung gelöst werden.<sup>[22, 43a, 48]</sup>

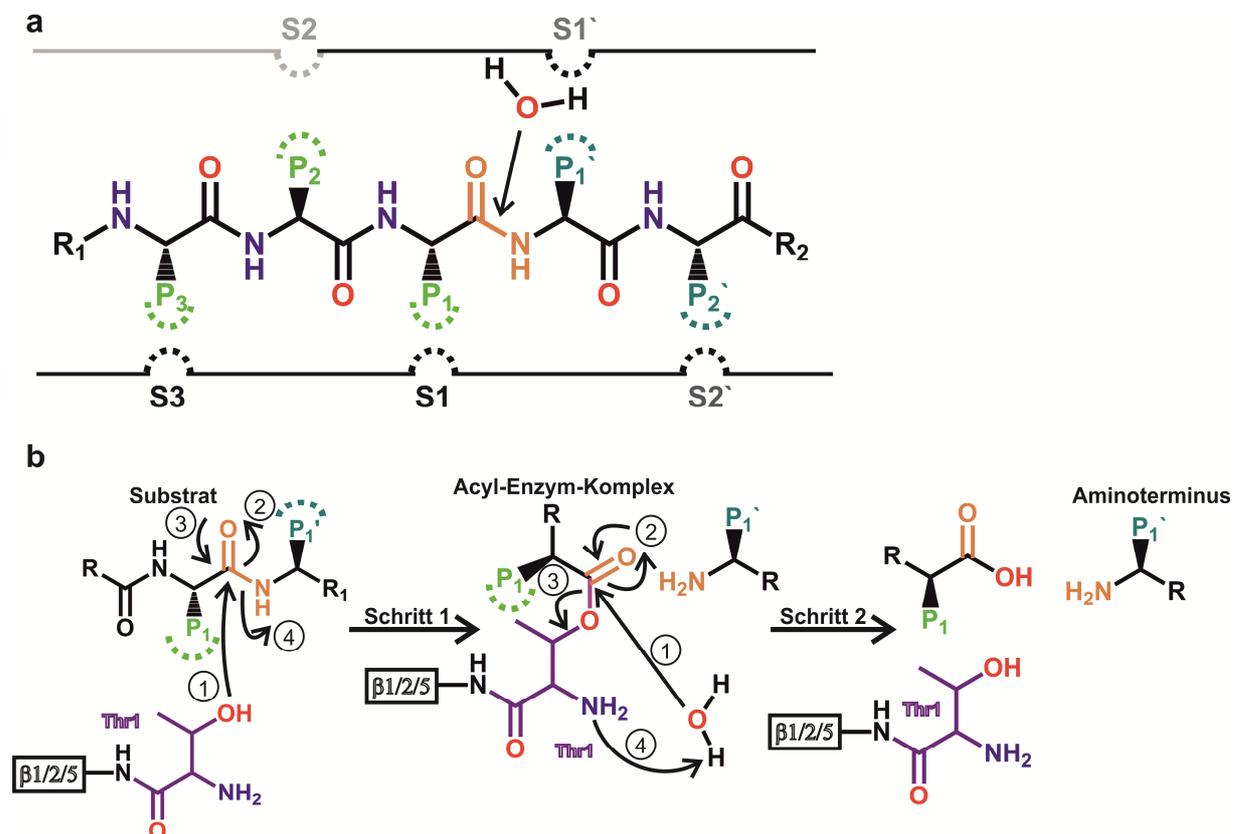


**Abbildung 2:** a) Cartoon-Darstellung des 26S Proteasoms. b) Seitenansicht des 20S Proteasoms aus *S. cerevisiae* und c) Draufsicht.<sup>[22, 49]</sup>

Die 20S-Untereinheit ist zylinderförmig und enthält die katalytisch aktiven Zentren. Sie besteht aus vier Ringen, die ihrerseits wiederum aus jeweils sieben Untereinheiten zusammengesetzt sind ( $\alpha 1$  bis  $\alpha 7$ , bzw.  $\beta 1$  bis  $\beta 7$ ). Die beiden inneren Ringe bestehen aus  $\beta$ -Untereinheiten, die beiden äußeren aus  $\alpha$ -Untereinheiten. Einfachere Organismen, wie Archaeabakterien haben sieben identische  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten. Wohingegen komplexere Organismen, wie z.B. Eukaryoten, sieben verschiedene  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten haben (siehe Abbildung 2).<sup>[22, 50]</sup> An der Innenwand der  $\beta$ -Ringe ist die proteolytische Aktivität lokalisiert: Nur die Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  zeigen im eukaryotischen Proteasom Proteaseaktivität, die übrigen nicht. Entfaltete Proteine können in das Lumen der 20S- Untereinheit transloziert werden und in kleine Fragmente abgebaut werden<sup>[51]</sup>. Die erzeugten Oligopeptide werden durch weitere zelluläre Peptidasen zu einzelnen Aminosäuren abgebaut. Es können fünf verschiedene Spaltungspräferenzen unterschieden werden: Chymotrypsin (CT-), Trypsin (T-), Caspaseähnliche (C-), *branched chain amino acid preferring* (BrAAP) und *small neutral amino acid preferring* (SNAAP) Aktivität.<sup>[52]</sup> Die  $\beta 1$ -Untereinheit des Proteasoms zeigt Caspase-artige und teilweise auch eine BrAAP Spaltungsaktivität, die  $\beta 2$  eine Trypsin-ähnliche und  $\beta 5$  eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität und teilweise auch eine BrAAP und SNAAP Spaltungsaktivität. Bei dem Proteasom handelt es sich um eine Threoninprotease. Alle aktiven Zentren tragen ein N-terminales Threonin, das als Nukleophil dient. Beim Spaltungsmechanismus wird das N-terminale Threonin als katalytischer Rest verwendet. Dabei greift die Hydroxylgruppe des Threonins die Carbonyl-Gruppe der Peptidbindung an.<sup>[42a, 53]</sup>

### 1.3 Funktion und Mechanismus des 20S Proteasoms

Das N-terminale Threonin der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms hydrolysiert die Peptidbindung der zu spaltenden Proteine<sup>[54]</sup>. Durch die Kristallstruktur des 20S Proteasoms und die Charakterisierung von mehreren Mutanten konnte der proteolytische Mechanismus aufgeklärt werden (siehe Abbildung 3).<sup>[55]</sup>



**Abbildung 3:** a) Schematische Darstellung der nicht-gestrichenen Substratbindungstaschen S1, S2,...Sn (schwarz, im 20S Proteasom fehlende Position S2 (grau)) und der gestrichenen Seiten S1', S2',...Sn'; die Benennung ist abhängig von der Position zur Peptidbindung. Proteasom-spezifische Ligandenseitenketten P1, P2,...Pn und P1', P2',...Pn'. b) Spaltungsmechanismus der Peptidbindung durch Thr1 der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms.<sup>[56]</sup>

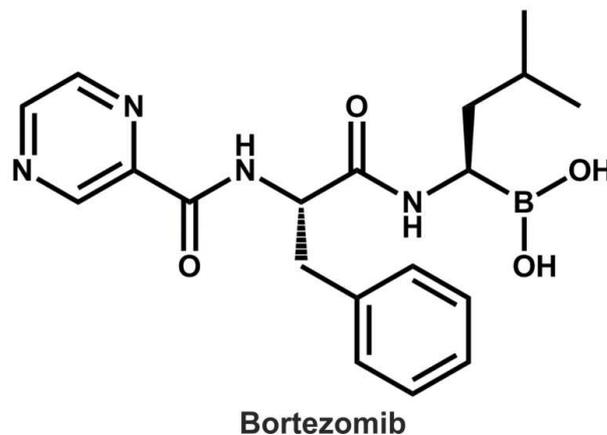
Zuerst bildet das Thr1O<sup>y</sup> mit der Carbonylgruppe der Peptidbindung des Substrats ein Acylester-Intermediat.<sup>[42a]</sup> Das Thr1N Atom fungiert dabei als Protonenakzeptor, wodurch die Spaltung des Intermediats begünstigt wird. Während dieser Katalyse befindet sich ein nukleophiles Wassermolekül (NUK) in der Nähe des Thr1, was dem Protonen-Shuttle zwischen ThrO<sup>y</sup> und ThrN dient und in der Spaltung des Acyl-Esters Intermediats involviert ist.<sup>[22, 57]</sup> Neben dem katalytischen Zentrum befinden sich verschiedene Substratbindekanäle,

die nicht-gestrichenen S1, S2, S3 ...Sn oder gestrichenen S1`, S2`, S3`... Sn` Spezifitätstaschen, die abhängig von ihrer Position zur hydrolysierenden Peptidbindung ihren Namen erhalten. Dem 20S Proteasom fehlt aber im Gegensatz zu anderen Proteasen eine definierte S2 Spezifitätstasche. Angepasst an die Spezifitätstaschen des Proteasoms werden die Seitenketten des Liganden P1, P2, P3... Pn oder P1`, P2`, P3`... Pn` genannt (siehe Abbildung 3a).<sup>[22]</sup>

Interessanterweise besitzen die meisten Archaen nur eine Art an  $\beta$ -Untereinheiten, so dass 14 gleich aktive Zentren entstehen.<sup>[51]</sup> Bei eukaryotischen 20S Proteasomen sind dagegen nur drei der sieben verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten proteolytisch aktiv. Daher besitzt das eukaryotische 20S Proteasom verschiedene Substratspezifitäten, die durch die Anordnung der inaktiven und aktiven  $\beta$ -Untereinheiten entstehen, und wodurch drei einzigartige Substrat-Bindungskanäle entstehen.<sup>[58]</sup> Aufgrund von Hydrolyse-Experimenten mit chromophoren Substraten wurden diese verschiedenen Spaltungspräferenzen, wie oben bereits erwähnt, Caspase-, Chymotrypsin- und Trypsin-ähnliche Aktivitäten genannt, wobei das aktive Thr1 in den Untereinheiten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 lokalisiert ist.<sup>[52]</sup> Strukturelle und Mutations-Analysen zeigten, dass die Spaltungspräferenz vor allem durch die S1 Tasche und den Rest 45 festgelegt wird.<sup>[50a]</sup> Hierbei ist der Aminosäurerest 45 in der  $\beta$ 1-Untereinheit ein Arg, in  $\beta$ 2 ein Gly und in  $\beta$ 5 ein Met, was den entsprechenden aktiven Untereinheiten eine saure, basische bzw. hydrophobe Eigenschaft verleiht.<sup>[52]</sup> Außerdem verursacht die Aminosäure 45 abhängig von ihrer Orientierung entweder eine große oder eine verengte S1 Tasche, wodurch verzweigte (BrAAP, *branched chain amino acid*) oder kleine, neutrale Aminosäuren (SnAPP, *small neutral amino acid*) als Substrate bevorzugt werden.<sup>[59]</sup> Im Gegensatz zu den P1 Seitenketten des Substrats und des Inhibitors, die an das Trypsin- und Caspase-ähnliche aktive Zentrum binden, kann die Bindung an das  $\beta$ 5 aktive Zentrum eine konzertierte strukturelle Umlagerung der Aminosäurereste in  $\beta$ 5 des Proteasoms induzieren um die unterschiedlichen Anforderung der Substrate zu erfüllen. Dieser hohe Grad an Verformbarkeit des Proteasom-Bindungskanals kann nur in der  $\beta$ 5-Untereinheit beobachtet werden. Außerdem besitzen höhere Organismen, wie Säugetiere, zusätzliche Isoformen des 20S Proteasoms, die Immuno-, konstitutives und Thymo-Proteasom genannt werden, sich strukturell in ihren aktiven Zentren unterscheiden und andere spezifische Funktionen in der Zelle übernehmen.<sup>[43b, 50a, 60]</sup>

## 1.4 Biologische Auswirkungen der Inhibition des 20S Proteasoms

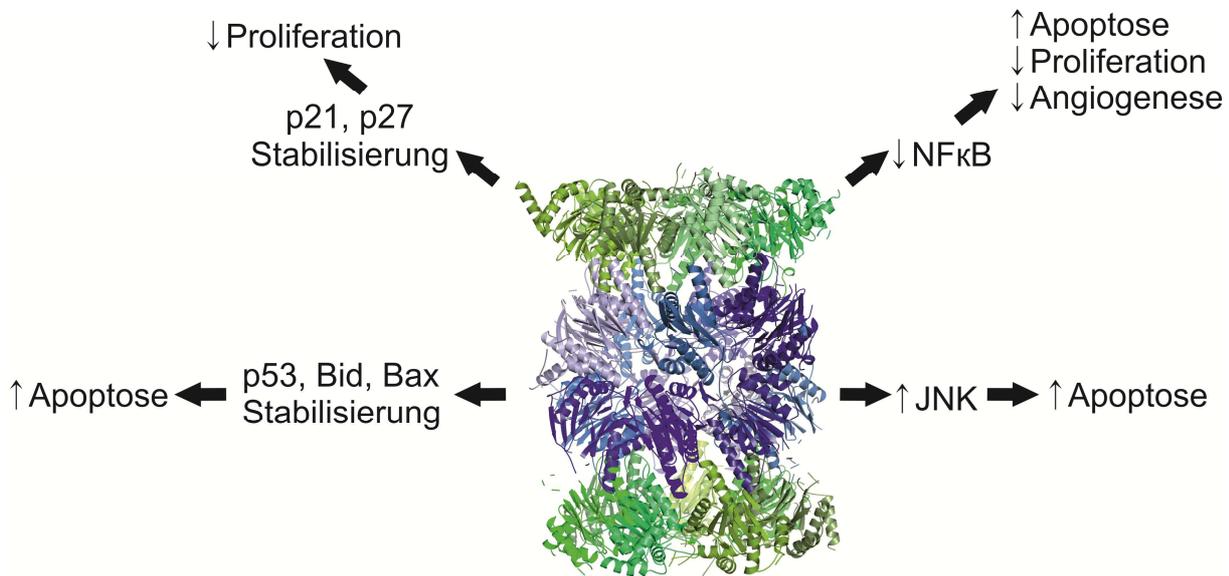
Die Kristallstruktur des 20S Proteasoms aus *T. acidophilum* im Komplex mit dem Aldehyd Calpain Inhibitor I (Acetyl-Leu-Leu-Norleucin) in Kombination mit Mutationsanalysen zeigten, dass das N-terminale Thr1 der  $\beta$ -Untereinheiten als proteolytisch aktives Zentrum dient.<sup>[43a, 61]</sup> Dieser Inhibitor bewies außerdem die unterschiedliche Spezifität der Taschen in eukaryotischen Proteasomen.<sup>[62]</sup> Proteasominhibitoren wurden zum einen als Werkzeuge für die Untersuchung der Regulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems genutzt. Zum anderen dienen sie als Ausgangsstrukturen bessere Proteasom-Inhibitoren zu entwickeln, die dann zur Medikamentenentwicklung optimiert werden können.<sup>[63]</sup> Damit konnten viele biologische Effekte der Proteasominhibition in verschiedenen Krebsarten entdeckt und untersucht werden. Auch wenn bisher nicht alle Auswirkungen verstanden sind, konnten trotzdem gewollte zelluläre Antworten, wie die Apoptosezunahme oder Verringerung der Proliferation in bestimmten Zelllinien, gefunden werden. Die *in-vivo* Experimente und klinische Erprobung des Inhibitors Bortezomib (siehe Abbildung 4) demonstrierte anfänglich, dass die Proteasominhibition diese zellulären Antworten über die Veränderung des NF- $\kappa$ B Stoffwechselwegs auslöst.<sup>[64]</sup>



**Abbildung 4:** Bortezomib, ein bekannter Proteasom-Inhibitor.

Der Transkriptionsfaktor, der in mehreren Tumoren überexprimiert ist, reguliert die Genexpression, welche die Zellapoptose und Proliferation steuert. Normalerweise ist NF- $\kappa$ B im Cytosol an  $I\kappa\beta$  gebunden und somit inaktiv. Die  $I\kappa\beta$  Phosphorylierung leitet jedoch die Ubiquitinierung und den darauffolgenden proteasomalen Abbau ein. NF- $\kappa$ B wird in den Zellkern transportiert, wo es die Zellproliferation und Angiogenese hoch reguliert. Es wurde erst kürzlich gezeigt, dass einige Proteine, wie der Tumorsuppressor p53 und die proapoptotischen Proteine Bid und Bax, die in der Apoptose und Zellproliferation involviert

sind, auch die Proteasominhibition stark beeinflussen. Ebenso wird die c-Jun-NH<sub>2</sub> Kinase, die bei Stress den Zelltod auslöst, bei Proteasominhibition hoch reguliert und löst Apoptose aus (siehe Abbildung 5).<sup>[65]</sup>



**Abbildung 5:** Auswirkungen der 20S Proteasom Inhibition durch Proteasominhibitoren auf verschiedene zelluläre Stoffwechselwege in Krebszellen.

Seit Entstehung der ersten Proteasominhibitoren, wurde eine Vielzahl von verschiedenen Naturstoffen und synthetischen chemischen Verbindungen identifiziert, die alle unterschiedliche proteolytische Proteasom-Aktivitäten und Bindungsweisen am Thr1 besitzen.<sup>[66]</sup> Von diesen Inhibitoren wurde bislang ausschließlich Bortezomib für den Markt zugelassen, das eine *in vivo* Aktivität in hämatologischen Patienten-Tumorzellen<sup>[67]</sup> und eine vielversprechende anti-Tumor Aktivität *in vivo* im Mausmodell zeigt. Auch im Heterotransplantat-Modell des Multiplem Myeloms demonstrierte Bortezomib eine signifikante Inhibition des Tumor-Wachstums, eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit, sowie eine Abnahme der Tumor-Angiogenese.<sup>[65]</sup> Dies führte zu einer Zulassung von Bortezomib für Patienten mit einem schweren Multiplem Myelom oder mit einem Rückfall, wobei bei 28% der Patienten eine komplette oder zumindest fast vollständige Verbesserung beobachtet wurde und bei 35% der Patienten eine kleine heilende Reaktion erfasst wurde. Diese Ergebnisse führten dazu, dass Bortezomib in die klinische Phase I, II und III angenommen wurde und letztendlich von der FDA (*U. S. Food and Drug Administration*) im Jahr 2003 zugelassen wurde.<sup>[68]</sup> Trotz seines klinischen Erfolgs stellen die toxischen Auswirkungen, wie schmerzhafte Neuropathie, und Resistenzbildungen weiterhin ein großes

Problem in der Therapie dar.<sup>[69]</sup> Diese Nebeneffekte verdeutlichen die Notwendigkeit von Inhibitoren mit neuen Strukturen und Bindungsmechanismen, sowie einer zweiten Generation von 20S Proteasom Inhibitoren.<sup>[70]</sup>

## 1.5 Ubiquitin-Proteasom-System Inhibitoren und deren Einsatz in der klinischen Forschung

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist in eine Reihe von zellulären Prozessen involviert, wie der Zellzyklus-Regulation, der Reparatur der DNA, der Signaltransduktion, der Transkription, der Apoptose und der Entwicklung des Nervensystems. Verschiedene Proteine, die an diesen Prozessen beteiligt sind, wie zum Beispiel p53, E2f, c-myc, c-junc und NFκ-B, werden durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Diese Proteine spielen eine große Rolle bei verschiedenen menschlichen Krankheiten. Daher ist eine Veränderung der Proteinkonzentration durch Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems von großem Interesse, weil dadurch in viele biologische Funktionen eingegriffen werden kann. Inhibitoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems induzieren Apoptose von Zellen und sind somit interessant für die Behandlung von Krebs, Kardiomyopathie und Nervensystem-Erkrankungen, wie Alzheimer oder Parkinson. Außerdem spielt das Ubiquitin-Proteasom-System auch bei der Immunantwort eine wichtige Rolle.<sup>[71]</sup> Beim Immunoproteasom sind die aktiven β1, β2, und β5 Untereinheiten gegen sogenannte β1i, β2i, und β5i Untereinheiten ausgetauscht.<sup>[50a]</sup> Dieser Austausch wird über das Interferon-γ, ein von T-Lymphozyten sekretiertes Zytokin initiiert und hat den Vorteil, dass Peptidfragmente, die zum Beispiel von einem intrazellulären Erreger abstammen, effizienter erzeugt werden.<sup>[72]</sup> Diese werden dann auf MHC-I Molekülen präsentiert. MHC-I Moleküle werden von cytotoxischen T-Zellen erkannt und eine infizierte Zelle kann somit eliminiert werden.<sup>[42a]</sup>

Wie oben ausgeführt, gibt es bisher nur einen von der FDA zugelassenen Proteasominhibitor als Medikament zur Therapie des Multiplen Myeloms, das Bortezomib (Velcade®). Es wurde von *Millenium Pharmaceuticals* entwickelt und brachte im Jahr 2009 1000 Millionen \$ ein.<sup>[73]</sup> Die Kristallstruktur des 20S Proteasoms im Komplex mit Bortezomib enthüllte die Spezifität und die Bindungsweise von Bortezomib an die verschiedenen katalytisch aktiven Zentren des Proteasoms, wobei die Boronsäure-Kopfgruppe von Bortezomib kovalent an das ThrO<sup>γ</sup> bindet.<sup>[42a, 64]</sup> Trotzdem hat dieser Inhibitor starke Nebenwirkungen, weil er als Inhaltsstoff die extrem toxische Boronsäure besitzt und auch andere Proteasen inhibiert. Dieses

Medikament beweist, dass sich die Inhibierung des Proteasom-Systems zur Behandlung des Multiplen Myeloms und anderen Krebsarten eignet.<sup>[74]</sup>

Das Proteasom ist aufgrund seiner gut definierten aktiven Zentren und seiner starren inneren Kernstruktur ein vielversprechendes Enzym das Ubiquitin-Proteasom-System gezielt zu beeinflussen und es gibt bereits mehrere Klassen von Proteasominhibitoren.<sup>[75]</sup> Die Klassifizierung von Proteasominhibitoren beruht auf der Art und der Spezifität der Bindung an das Proteasom. Als erste Inhibitoren des 20S-Proteasoms wurden Aldehyde identifiziert.<sup>[76]</sup> Weitere Klassen sind Vinyl-Sulfone und Peptid-Boronate. Zu den natürlichen Proteasominhibitoren gehören Epoxyketone,  $\beta$ -Lactone und TMC-95.<sup>[56]</sup> Es besteht großes Interesse daran, die Kristallstruktur vom Proteasom im Komplex mit seinen Inhibitoren zu verstehen, um den Wirkmechanismus der Liganden aufzuklären. Das Verständnis des Bindungsmechanismus von Inhibitoren an das Proteasom ermöglicht es, effizientere Verbindungen zu entwickeln um diese als Medikamente gegen zum Beispiel Krebs einzusetzen<sup>[42a]</sup>. Die Wirkung von Proteasominhibitoren hängt von unterschiedlichen Faktoren, wie Zelltyp und Proliferationsstatus, ab und viele Proteasominhibitoren wirken nicht selektiv und hemmen somit auch andere zelluläre Proteasen, die einen ähnlichen Substratspaltungsmechanismus aufweisen.

## 1.6 $\beta$ -Lactone als Proteasom-Inhibitoren

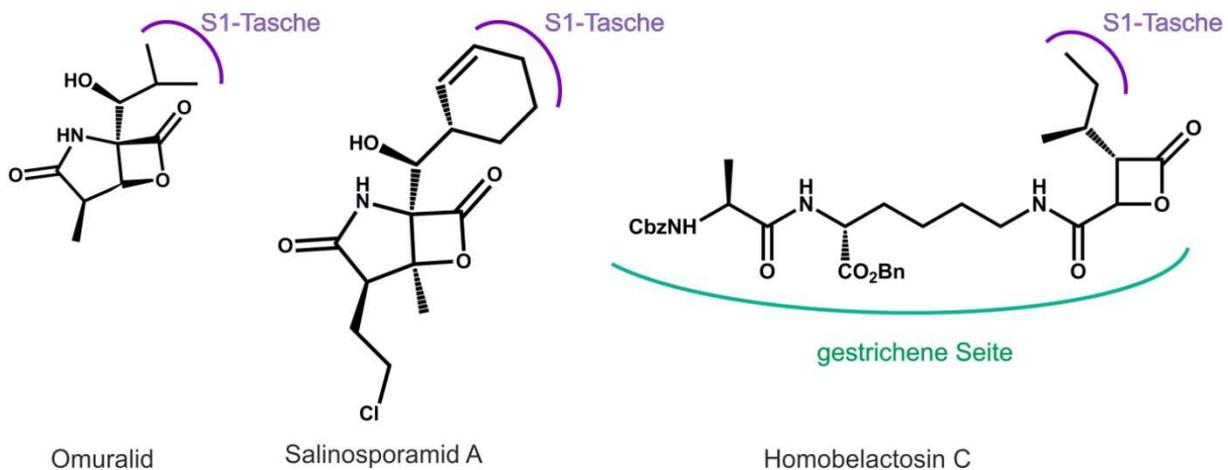
Seitdem die strukturelle und biologische Signifikanz des 20S Proteasoms bekannt ist, wurde in der Literatur eine Vielzahl an verschiedenen Inhibitoren beschrieben, die bereits optimiert und durch Röntgenkristallographie analysiert wurden. Sie unterscheiden sich in ihrer Bindungsweise und Effektivität gegenüber dem 20S Proteasom.

Eine Gruppe von Proteasom-Inhibitoren zeichnet sich durch ein  $\beta$ -Lacton als funktionelle Gruppe aus. Diese Inhibitoren reagieren mit dem Thr1O<sup>y</sup> und bilden eine kovalente Acylester-Bindung.<sup>[22, 77]</sup> Omuralid (clasto-Lactacystin- $\beta$ -lacton) war der erste natürliche  $\beta$ -Lacton-Proteasominhibitor gegen das 20S Proteasom, der in der Literatur beschrieben wurde.<sup>[66]</sup> Es ist ein *Streptomyces sp. OM-6519* Metabolit, der *in vivo* hauptsächlich an die  $\beta$ 5 Untereinheit selektiv, spezifisch und irreversibel bindet und somit die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität inhibiert (siehe Abbildung 6).<sup>[78]</sup> Die Kristallstruktur des Omuralid-Proteasom-Komplexes zeigte, dass dieses  $\beta$ -Lacton spezifisch und kovalent an das aktive Zentrum der  $\beta$ 5-Untereinheit bindet. Die freie Hydroxylgruppe des N-terminalen Thr1 greift nukleophil die Carbonylgruppe des  $\beta$ -Lactons an, wodurch der gespannte  $\beta$ -Lactonring geöffnet wird. Dies

resultiert in einer Acylester-Bindung zwischen Inhibitor und Thr1.<sup>[77]</sup> Die Komplexstruktur zeigte zusätzlich, dass das nukleophile Wassermolekül (NUK), das normalerweise das Acylester-Intermediat hydrolysiert und für die Freisetzung des Peptidprodukts verantwortlich ist, an einer anderen Stelle positioniert ist, was die Freisetzung des Liganden verhindert.<sup>[22, 66]</sup> Bei der Inhibitor-Bindung wird die Position des NUKs von der nach der Spaltung des  $\beta$ -Lactons neu generierten Hydroxylgruppe eingenommen, was die Freisetzung des Inhibitors verhindert. Diese C3-OH Hydroxylgruppe ist daher für die Proteasominhibition essentiell. Sie kann ihre Position aufgrund der freien Rotationsbeschränkung um die C-3/C-4 Bindung nicht verändern. Die Rotationsbeschränkung ist durch den Lactamring gegeben, der durch Wasserstoffbrückenbindungen im Substratkanal stabilisiert ist. Neben der kovalenten Bindung von Omuralid an Thr1, werden zusätzlich Omuralid viele Wasserstoffbrücken und hydrophobe Interaktionen mit der S1 Tasche ausgebildet, was die Inhibitor-Bindung zusätzlich stabilisiert und die Untereinheiten-Spezifität erklärt.<sup>[79]</sup>

Zwei weitere Naturstoffe, das Belactosin A und C aus *Streptomyces sp.*, zeigen ebenfalls, die Wirkung gegen Tumore, wie z.B. Krebs.<sup>[80]</sup> Diese Naturstoffe inhibieren spezifisch die  $\beta 5$  Untereinheit und besitzen ein  $\beta$ -Lacton als funktionelle Gruppe. Davon konnten zwei starke Proteasom-Inhibitoren abgeleitet werden, das Homobelactosin A und C (Abbildung 6). Die Kristallstruktur von Dibenzyl-geschütztem Homobelactosin C im Komplex mit dem 20S Proteasom zeigte analog zum Omuralid eine identische Bindung an das ThrO<sup>y</sup> und erklärt die Spezifität für die  $\beta 5$ -Untereinheit.<sup>[22]</sup> Die 3-Aminocarbonyl-Seitenkette passt perfekt in die S1-Spezifitäts-Tasche der  $\beta 5$  Untereinheit, wohingegen es sterisch und von der Polarität her zu eingeschränkt für die  $\beta 1$  und  $\beta 2$  Untereinheit ist.<sup>[81]</sup> Bei Omuralid verhindert der  $\gamma$ -Lactam-Ring die freie Rotation um die C3/C4-Bindung und die neu gebildete Hydroxylgruppe am C4-Atom formiert eine Wasserstoffbrückenbindung zu der Aminogruppe von Thr1. Im Gegensatz dazu zeigt die neu gebildete Hydroxylgruppe am C4-Atom des Dibenzyl-geschütztem Homobelactosin Cs in genau die andere Richtung und erzeugt eine Wasserstoffbrücke zu Arg190. Eine ähnliche Rolle übernimmt im Omuralid das C8-OH. Die Position von C4-OH im Omuralid wird im Dibenzyl-geschütztem Homobelactosin C von dem Stickstoff (NH-6) der 4-Aminocarbonyl-Seitenkette eingenommen. Einmalig ist, dass die restliche Seitenkette in die gestrichene Seite des Proteasoms bindet.<sup>[66]</sup> Auch wenn beide Inhibitoren identisch an Thr1 binden, unterscheidet sie sich stark, wie der Spaltungsmechanismus der neu gebildeten Esterbindung verhindert wird. Bei Omuralid nimmt die neu entstandene Hydroxylgruppe am C4-Atom die Position des NUK, das im Proteasom ohne Ligand gebunden ist, ein, womit der

Angriff der Thr10<sup>γ</sup>-CO-Esterbindung verhindert ist.<sup>[64]</sup> Im Dibenzyl-geschütztem Homobelactosin C wird diese Rolle von der 4-Aminocarbonyl-Seitenkette übernommen.<sup>[81]</sup> Zum ersten Mal bekam man strukturelle Einblicke in die Bindungsweise von Homobelactosin C an die gestrichene Seite des Proteasoms.<sup>[81]</sup> Durch diese Informationen entstanden neue Erkenntnisse über die gestrichenen und nicht-gestrichenen Taschen des aktiven Zentrums in der β5 Untereinheit und außerdem ein nützliches Modell um Proteasom-Inhibitoren zu entwickeln.



**Abbildung 6:** Strukturformeln der β-Lactone Omuralid, Salinosporamid A und Homobelactosin C.

Bei dem Gärvorgang der Bakterien *Salinispora tropica*, die in Meeresablagerung auf den Bahamas vorkommen, entsteht das Naturprodukt Salinosporamid A (NPI-0052) (Abbildung 6). Überraschenderweise besitzt dieses Naturprodukt mit strukturellen Ähnlichkeiten zu Omuralid eine inhibitorische Wirkung auf das Proteasom mit neuen und einzigartigen Eigenschaften: obwohl der Cyclohexenring von Salinosporamid A die gleiche Position wie die P1-Isopropylgruppe von Omuralid einnimmt, findet an der Chlorethyl-Seitenkette in der S2-Seite eine Folgereaktion statt.<sup>[66]</sup> So wird die Wirksamkeit von Salinosporamid A *in vitro* und *in vivo* signifikant erhöht und die Substrat-Spezifität verändert. Salinosporamid A bindet an alle aktiven Zentren des 20S Proteasoms irreversibel trotz ähnlicher Bindungsweise des funktionellen Lactonrings. Überraschenderweise zeigte Salinosporamid A aber ein anderes Inhibitionsprinzip als Omuralid, da die Chlorethyl-Seitenkette von Salinosporamid A ein zyklisches Tetrahydrofuran mit der C3-O Gruppe während der Lactonring-Öffnung bildet.<sup>[66]</sup> Salinosporamid A zeigt Wirkung gegen Bortezomib-resistente multiple Myelom Zellen und hat eine hohe Wirksamkeit in Tiermodellen gegen das Multiple Myelom, Dickdarm-, Pankreas- und Lungen-Krebs.<sup>[82]</sup> Salinosporamid A wird daher seit 2006 in klinischen Tests

als Einzel-Medikament oder in Kombination mit anderen therapeutischen Medikamenten eingesetzt. Mittlerweile befindet es sich in der klinischen Phase II. Für die naturwissenschaftliche Forschung, und vor allem für die klinische Therapie ist es vor allem aufgrund seines einzigartigem inhibitorischen Profils als Bortezomib für die Medikamentenentwicklung sehr interessant.<sup>[66]</sup>

## 2 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit war zum einen die Charakterisierung und Optimierung von reversiblen Proteasominhibitoren und zum anderen des Naturstoffs Vibralacton, das an das 20S Proteasom bindet. Hierfür wurden verschiedene Techniken am Lehrstuhl für Biochemie an der TU München etabliert und verwendet. Dazu gehören enzymatische *in-vitro* Aktivitätsassays und die Röntgenkristallographie für die Strukturaufklärung des 20S Proteasoms im Komplex mit verschiedenen Liganden. Die Röntgenkristallographie wurde zur Gewinnung von strukturellen Informationen über die Bindungsweise und den Bindungsmechanismus genutzt. So konnte der Bindungsmechanismus der Liganden detailliert verstanden werden und die entsprechenden Liganden für eine zielgerichtete Inhibition des 20S Proteasoms optimiert werden. Während der Doktorarbeit sollte der  $\beta$ -Lacton Naturstoff Vibralacton charakterisiert und eine Kristallstruktur von Vibralacton im Komplex mit dem 20S Proteasom aus *S. cerevisiae* erhalten werden. Dies soll einen wesentlichen Beitrag zum detaillierten und generellen Verständnis der Bindungsweise von  $\beta$ -Lacton Inhibitoren an das  $\beta 5$  aktive Zentrum des 20S Proteasoms leisten und neue Einblicke in strukturell wichtige funktionelle Gruppen der  $\beta$ -Lacton Inhibitoren ergeben. Hierbei stand im Fokus der Arbeit den Beitrag der Seitenketten der  $\beta$ -Lacton Inhibitoren für die Bindung an das 20S Proteasom zu charakterisieren um ein tieferes Verständnis für die Grundprinzipien der Proteasominhibition zu erlangen.

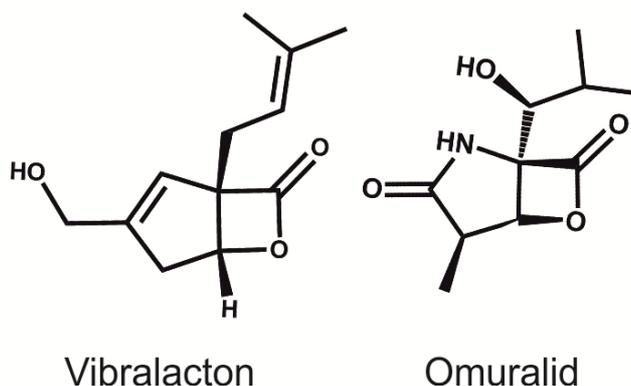
Des Weiteren sollte ein auf Bortezomib basierender 20S Proteasom Inhibitor optimiert werden. Ausrichtung der Forschungsexperimente war es einen für die  $\beta 5$  Untereinheit spezifischen Liganden zu entwickeln, der zudem einen signifikant besseren inhibitorischen Effekt als Bortezomib besitzt und eine einzigartige Bindung an die gestrichene Seite des Chymotrypsin-ähnlichem Zentrums aufweist. Hierfür sollte die Kristallstruktur dieses Inhibitors im Komplex mit dem 20S Proteasom gelöst werden um den Liganden besser zu charakterisieren und zu optimieren. Die Kristallstrukturanalyse soll die neue Bindungsweise an die gestrichene Seite der  $\beta 5$  Untereinheit atomar beschreiben um einen neuen Ausgangspunkt für weitere Proteasominhibitoren zu ermöglichen.

Zielsetzungen der Arbeit sind neue Einblicke in die 20S Proteasom Inhibition zu erhalten und einen Überblick in diesem anspruchsvollen Forschungsthema zu erlangen. Im speziellen sollen die Ergebnisse dieser Dissertation zusätzlich die Wichtigkeit der Kombination von Kristallographie und *in-vitro/ vivo* Techniken in der Medikamenten-Entwicklung demonstrieren. Dieser Schnittpunkt an verschiedenen Methoden soll während der gesamten Forschungszeit wiedergespiegelt werden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

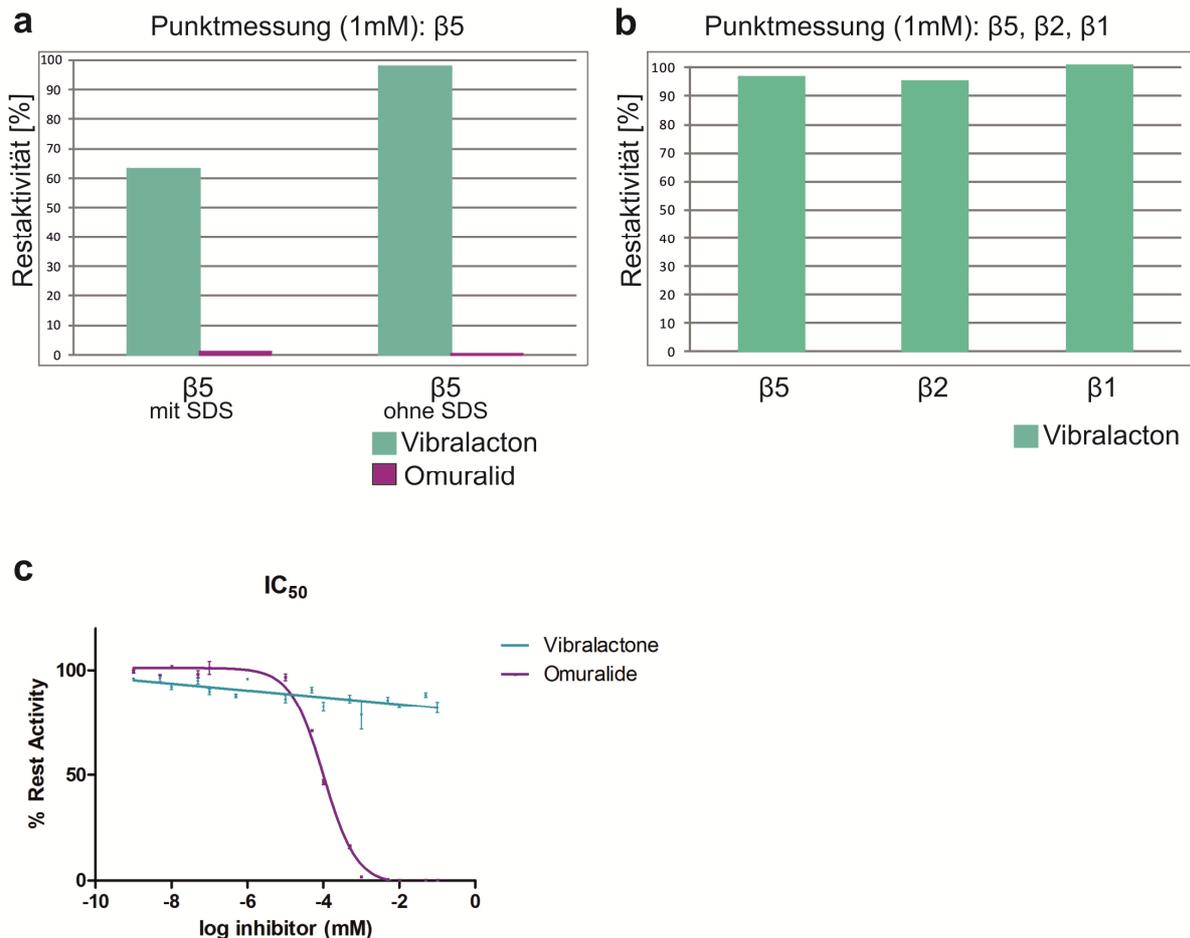
#### 3.1 Vibralacton

Das Naturprodukt Vibralacton (siehe Abbildung 7) wird von *Boreostereum vibrans* produziert und enthält ein  $\beta$ -Lacton als zentrales Strukturmotiv.



**Abbildung 7:** Chemische Strukturformel von Vibralacton und Omuralid.

Obwohl es eine ähnliche chemische Struktur wie Omuralid (siehe Abbildung 7) hat, zeigte es bei einem Einsatz von 1 mM Konzentration keine Inhibition in *in vitro* Aktivitätstests (siehe Abbildung 8). Bei den Aktivitätstests werden fluoreszierende Tetrapeptide, die spezifisch für eines der drei aktiven Zentren sind, als Substrat eingesetzt. Um die Aktivität der  $\beta$ 1-Untereinheit zu bestimmen wird Z-LLE-AMC als Substrat verwendet, für die  $\beta$ 2-Aktivitätsbestimmung Z-LLR-AMC und für  $\beta$ 5 Suc-LLVY-AMC.



**Abbildung 8:** Punktmessungen der Aktivität von Vibralacton (lila) und Omuralid (grün) gegen die aktiven Zentren des Proteasoms. **a)** Restaktivität in Prozent des Chymotrypsin-ähnlichen aktiven Zentrums nach Behandlung mit 1 mM Vibralacton bzw. Omuralid; unveränderte Aktivität für Vibralacton, vollständige Inhibition für Omuralid. **b)** keine Inhibition der Chymotrypsin-, Trypsin- oder Caspase-ähnlichen Aktivität für Vibralacton (1 mM). **c)** Omuralid zeigte eine starke *in vitro* Inhibition des 20S Proteasoms mit einem  $IC_{50}$  von 47  $\mu$ M, während Vibralacton keine Inhibition aufweist.

Aufgrund der ähnlichen Struktur der beiden Inhibitoren und der Anwesenheit eines  $\beta$ -Lactonrings wurden aufgrund der negativen Aktivitätsmessungen 20S Proteasom-Kristalle von *S. cerevisiae* mit einem Vibralacton-Überschuss gesoaked, um der molekularen Ursache dieses überraschenden Ergebnisses nachzugehen. Kristalle des 20S Proteasoms von *S. cerevisiae* wuchsen in *Hanging Drops* bei 20°C.<sup>[21]</sup> Die Proteinkonzentration war 40 mg/mL in 10 mM Tris/HCl (pH 7.5) und 1 mM EDTA bei der Kristallisation. Die Tropfen bestanden aus 3  $\mu$ l Protein und 2  $\mu$ l Reservoirlösung (30 mM MgOAc, 100 mM MES (pH 7.2), 10% 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD)). Die Kristalle entstanden innerhalb von zwei Tagen und hatten eine finale Größe von ca. 50×200×500  $\mu$ m<sup>3</sup>. Sie wurden mindestens 48 h mit Vibralacton inkubiert. Danach wurde zu den Kristallen Kryoprotektant-Puffer (30% MPD, 20 mM

Mg(OAc)<sub>2</sub>, 100 mM MES, pH 7.0) gegeben und die Kristalle in flüssigen Stickstoff bei 100 K gekühlt. Die Struktur wurde an der X06SA-Beamline am SLS/ Villigen/ Schweiz mit  $\lambda = 1.0$  gemessen und hatte eine Auflösung von 2.7 Å (siehe Tabelle 8).

Die Röntgenstrahlenintensität und die Datenreduktion wurden mit dem XDS Programm<sup>[14]</sup> durchgeführt und resultierte in der Raumgruppe P2<sub>1</sub> mit den Zell-Parametern  $a = 136$  Å,  $b = 299$  Å,  $c = 145$  Å und  $\beta = 113^\circ$ . Die Anisotropie der Strahlenbeugung wurde unter Berücksichtigung von beobachteten und berechneten Strukturamplituden mithilfe des Programms CNS<sup>[83]</sup> korrigiert. Die Elektronendichte wurde verbessert, indem der Mittelwert berechnet und die Reflexe zehnmal über die zweifache nicht-kristallographische Symmetrieachse mithilfe des Programms MAIN<sup>[26]</sup> rücktransformiert wurden. Konventionelle kristallographische *rigid body*, positionelle und Temperaturfaktor Verfeinerung wurden ebenfalls mit CNS durchgeführt. Hierfür wurden die Koordinaten der 20S Proteasom Struktur aus *S. cerevisiae* als Startmodell verwendet.<sup>[22]</sup> Für die Anfertigung des Strukturmodells wurde das Programm MAIN benutzt. Die Struktur wurde bis auf einen kristallographischen R-Faktor von 20.5 % (freier R-Faktor = 23.1 %) mit RMS Abweichung von 0.007 Å in den Bindungslängen und 1.33° in den Winkel verfeinert (siehe Tabelle 8).

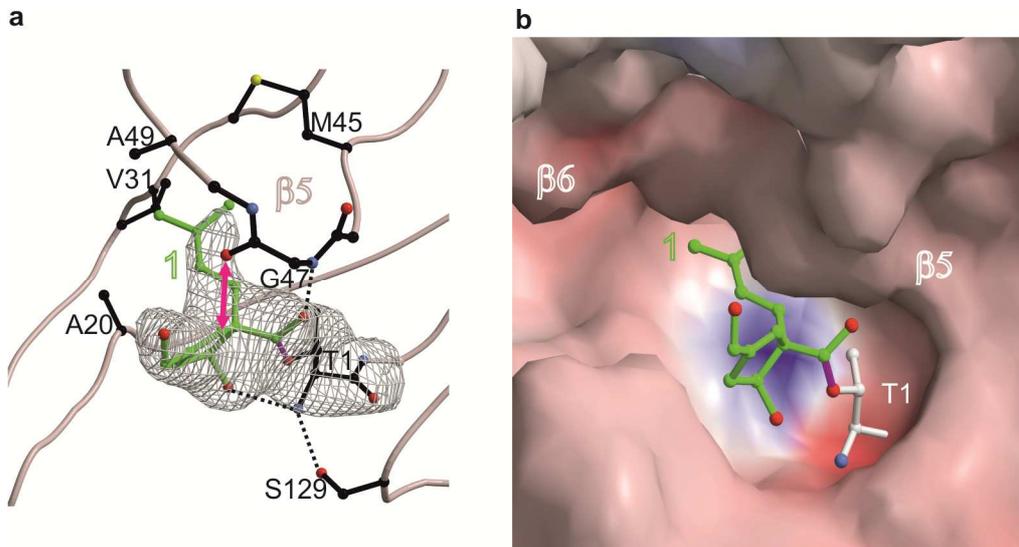
**Tabelle 8:** Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung der Komplexstruktur des Proteasoms mit Vibralacton

<i>Proteasom: Vibralacton</i>	
<u>Kristallparameter</u>	
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>
Zellparameter	a=136 Å, b=299 Å, c=145 Å, β=133°
Moleküle in AE <sup>a</sup>	1
<u>Datensammlung</u>	
Beamline	SLS, PX06SA
Wellenlänge (Å)	1.0
Auflösungsbereich (Å) <sup>b</sup>	40-2.7 (2.8-2.7)
Anzahl der beobachteten Reflexe	971498
Anzahl der Einzelreflexe <sup>c</sup>	289175
Vollständigkeit (%) <sup>b</sup>	99.4 (99.7)
Rmerge (%) <sup>b, d</sup>	11.3 (58.3)
I/σ (I) <sup>b</sup>	7.05 (1.52)
<u>Verfeinerung (CNS)</u>	
Auflösungsbereich (Å)	15-2.7
Anzahl der Reflexe des Arbeitssets	273228
Anzahl der Reflexe des Testsets	14276
Anzahl der nicht-Wasseratome	49608
Anzahl der Wasseratome	1334
Anzahl der Inhibitoratome	60
Rwork/ Rfree (%) <sup>e</sup>	0.205/ 0.231
RMS Abweichung der Bindungslänge/ Winkel (Å)/ (°) <sup>f</sup>	0.0067/ 1.33
Ramachandran Plot (%) <sup>g</sup>	95.7/ 3.7/ 0.6
<sup>a</sup> Asymmetrische Einheit.	
<sup>b</sup> Die Werte in Klammern bei Vollständigkeit, R <sub>merge</sub> und I/σ (I) entsprechen der letzten Auflösungsschale.	
<sup>c</sup> Friedel Paare wurden als identische Reflexe behandelt.	
<sup>d</sup> $R_{\text{merge}}(\text{I}) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j  I(\text{hkl})_j - I(\text{hkl}) }{[\sum_{\text{hkl}} I_{\text{hkl}}]}$ , wobei $I(\text{hkl})_j$ die j-ste Messung der Intensität der Reflexe hkl ist und $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ Durchschnittsintensität ist.	
<sup>e</sup> $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} ( F_{\text{obs}}  -  F_{\text{calc}} )}{\sum_{\text{hkl}}  F_{\text{obs}} }$ , wobei R <sub>free</sub> ohne Sigma Cutoff für zufällig ausgewählte 5 % der Reflexe, die nicht in die Struktur-Verfeinerung einbezogen wurden. R <sub>work</sub> wird von den verbleibenden Reflexen berechnet.	
<sup>f</sup> Abweichung von den idealen Bindungslängen und Bindungswinkeln.	
<sup>g</sup> Anzahl der Aminosäurereste in favorisierten Regionen/ erlaubten Regionen/ verbotenen Regionen	

Anhand der Kristallstruktur des 20S Proteasoms im Komplex mit Vibralacton soll erklärt werden, warum Vibralacton das Proteasom nicht inhibiert und welche funktionellen Gruppen nötig sind um das Proteasom zu hemmen.

Die 2F<sub>O</sub>-F<sub>C</sub>-Elektronendichte zeigt, trotz fehlenden inhibitorischen *in-vitro* Effekts, Vibralacton gut definiert in dem Chymotrypsin-ähnlichen aktiven Zentrum der β5-

Untereinheit (siehe Abbildung 9). Der Naturstoff ist kovalent als Acyl-Enzym mit dem N-terminalen nukleophilen Threonin des Proteasoms gebunden (siehe Abbildung 9a), analog der konventionellen  $\beta$ -Lacton Inhibitoren.

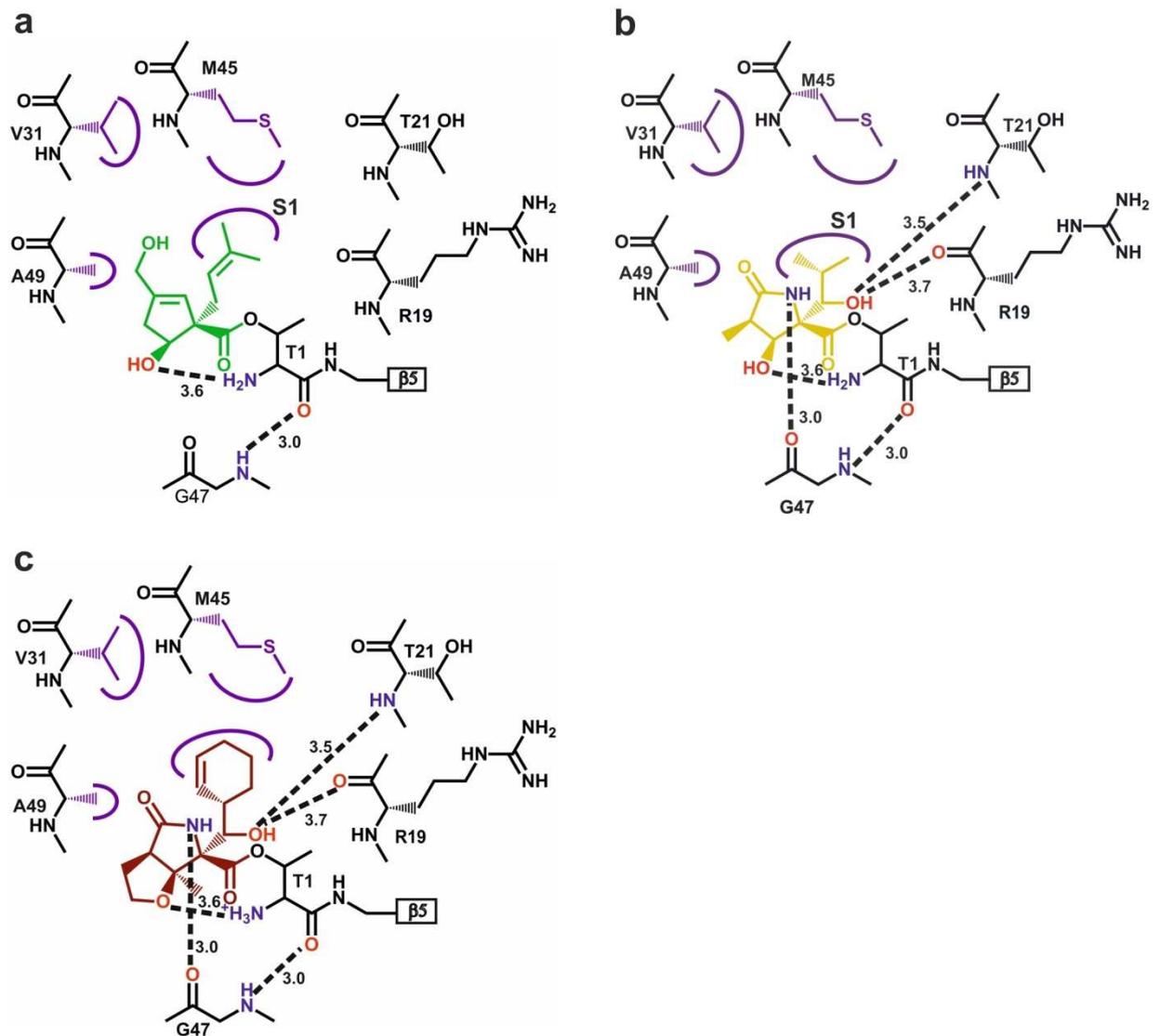


**Abbildung 9:** **a)** Kristallstruktur des Chymotrypsin-ähnlichen aktiven Zentrums des 20S Proteasoms im Komplex mit Vibralacton (grün); Rückgrat der proteasomalen  $\beta$ 5-Untereinheit (braun) und in *coil* Darstellung; Ligand in *ball-and-stick* Darstellung (grün); Elektronendichte-Umriss (grau) um Thr1 (schwarz); Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Vibralacton und den  $\beta$ 5 Hauptkettenatomen Gly47N, Thr1N und Ser129O sind als gestrichelte Linien eingezeichnet. **b)** Oberfläche des Chymotrypsin-ähnlichen aktiven Zentrums des 20S Proteasoms im Komplex mit Vibralacton (grün) ist als elektrostatisches Potential dargestellt.

Die Strukturanalyse des Vibralacton:20S Proteasom Komplexes bewies, dass das Vorhandensein einer elektrophilen Kopfgruppe kein hinreichendes Kriterium für die Proteasominhibition ist, sondern dass die gesamte Architektur des Inhibitors für die selektive Bindung der  $\beta$ -Lacton-Inhibitoren an das 20S Proteasom entscheidend ist. Mithilfe dieser Struktur konnte außerdem die Erklärung für die Unreaktivität von Vibralacton gegenüber dem 20S Proteasom gefunden werden.

Die Bindung an die verschiedenen aktiven Zentren des 20S Proteasoms geschieht zuerst durch die Positionierung der P1 Seitenkette des Inhibitors, dann durch seine Interaktion mit Thr1 und die übliche antiparallele  $\beta$ -Faltblatt Formierung zwischen dem Inhibitor und dem Protein-Rückgrat.<sup>[50a]</sup> Aufgrund des Fehlens dieses Peptid-Rückgrats in den  $\beta$ -Lacton Inhibitoren muss die Bindung in diesem Fall durch einen einzigartigen Bindungsmechanismus an die S1 Tasche und durch Wasserstoffbrücken zu Thr1 stattfinden.  $\beta$ -Lacton Inhibitoren reagieren somit über eine hoch optimierte Bindungsweise mit dem aktiven Zentrum, bei der es auf jede

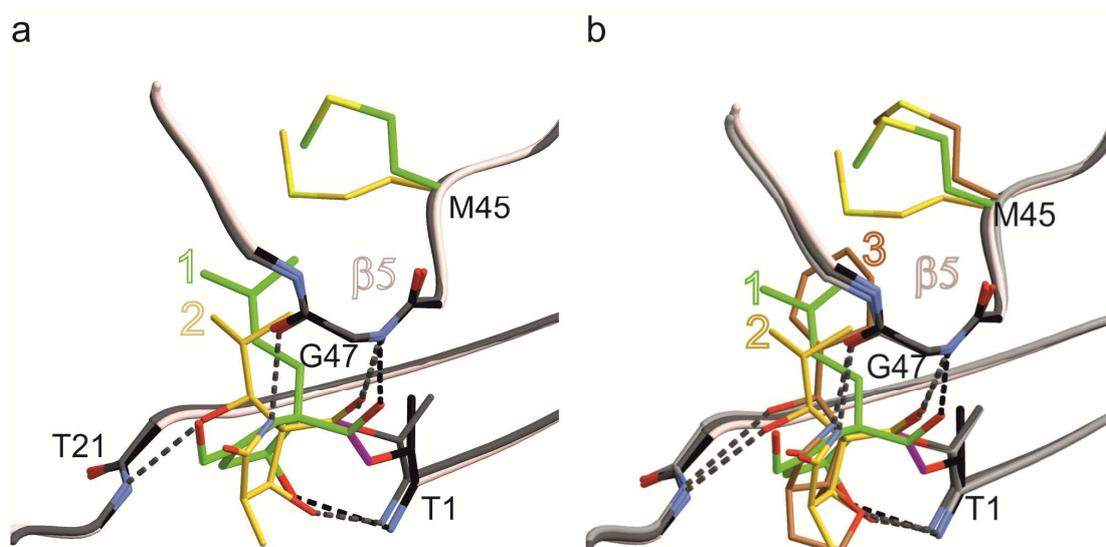
Wasserstoffbrücke im Unterschied zu konventionelle Peptid-Inhibitoren ankommt. Vergleicht man die Bindung von Vibralacton und Omuralid (siehe Abbildung 10), wird deutlich, dass das Amid NH des  $\gamma$ -Lactamrings, abwesend in Vibralacton wichtig für die Stabilisierung des Inhibitors ist und nicht, wie bisher geglaubt, überflüssig ist. Diese NH-Gruppe positioniert den Inhibitor durch die Bildung einer starken Wasserstoffbrückenbindung zu Gly47O, welches für die Substrathydrolyse die antiparallele  $\beta$ -Faltblatt Konformation des Peptidrückrats koordiniert. An der Stelle der Kohlenstoffhauptkette im Substrat hat Omuralid das Carbonylsauerstoffatom des Lactamrings. Gly47N bildet das Oxyanion Loch und formt eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonylsauerstoff des geöffneten Lactons, wodurch der Ligand weiter stabilisiert wird. Durch die Wasserstoffbrückenbindungen verleiht die NH-Gruppe von Gly47 dem Naturstoff Omuralid eine Bindungsstärke ähnlich einer Peptidbindung. Im Fall von Vibralacton gibt es eine Doppelbindung im Cyclopentanring anstelle der Amid/ Lacton-Gruppe, die zu dem partiellen Doppelbindungscharakter der Peptidbindung in Omuralid und Salinosporamid A äquivalent ist. Somit besitzt das Ringsystem von Vibralacton eine ähnlich rigide Struktur und eine entropisch begünstigte Bindungspräferenz wie Omuralid und Salinosporamid A. Jedoch ist das Fehlen der NH-Gruppe von Vibralacton der Grund, warum dieser Ligand eine zu kurze Verweilzeit im aktiven Zentrum des Proteasoms hat, da keine Wasserstoffbrückenbindungen zu Gly47O ausgebildet werden können (siehe Abbildung 10). Im Gegensatz dazu spielt die Carbonylgruppe von Omuralid, die in Vibralacton durch eine CH<sub>2</sub>OH Gruppe ersetzt ist, keine signifikante Rolle bei der Bindung (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Bindungsweise des 20S Proteasoms an **a)** Vibralacton **b)** Omuralid **c)** Salinosporamid A; Die Spezifitätstaschen S1 und S3 des Chymotrypsin-ähnlichen Substratbindungskanals und ihre korrespondierenden Aminosäuren sind in schwarz dargestellt. Hydrophobe Interaktionen zwischen Ligand und S1 Tasche sind in lila und Wasserstoffbrücken als schwarz gestrichelte Linien eingezeichnet.

Die P1 Seitenkette (2-Methyl-pent-2-Enyl) von Vibralacton, die in die S1-Tasche des Proteasoms bindet, destabilisiert die Bindung ans 20S Proteasom zusätzlich. Im Vergleich zu Omuralid ist diese Seitenkette verlängert, wodurch die proteasomale Seitenkette von Met45 in der S1-Spezifitätstasche von seiner ursprünglichen Position Richtung Ile35 verschoben wird. Auch wenn diese Verschiebung bereits bei der Bindung von Salinosporamid A an das Proteasom erfolgt, reicht die Bindungsstärke von Vibralacton nicht aus um den Entropieverlust auszugleichen. Bei Salinosporamid A wird die entropisch ungünstige Verdrängung von Met45 über einen Enthalpiegewinn ausgeglichen, der durch zusätzliche

hydrophobe Interaktionen zwischen dem Cyclohexenylring und den Resten der S1-Tasche entsteht. Bei Vibralacton können keine hydrophoben Wechselwirkungen ausgebildet werden, weil die P1 Seitenkette aufgrund der Doppelbindung des Isopentenyls unflexibel ist. Somit entsteht durch die lange P1 Seitenkette ein struktureller Konflikt mit Met45, gefolgt von einem Entropieverlust und eine Destabilisierung von Vibralacton (siehe Abbildung 11 a und c). Omuralid bewirkt durch den kürzeren P1-Pseudovalin-Rest keine Umordnung der S1-Spezifitätstasche und begünstigt die Inhibitionseigenschaft (siehe Abbildung 10 b).



**Abbildung 11:** Strukturelle Überlagerung der Bindung an Chymotrypsin-ähnlichem aktiven Zentrum von a) Vibralacton (grün) und Omuralid (gelb) b) Vibralacton, Omuralid und Salinosporamid A (braun)

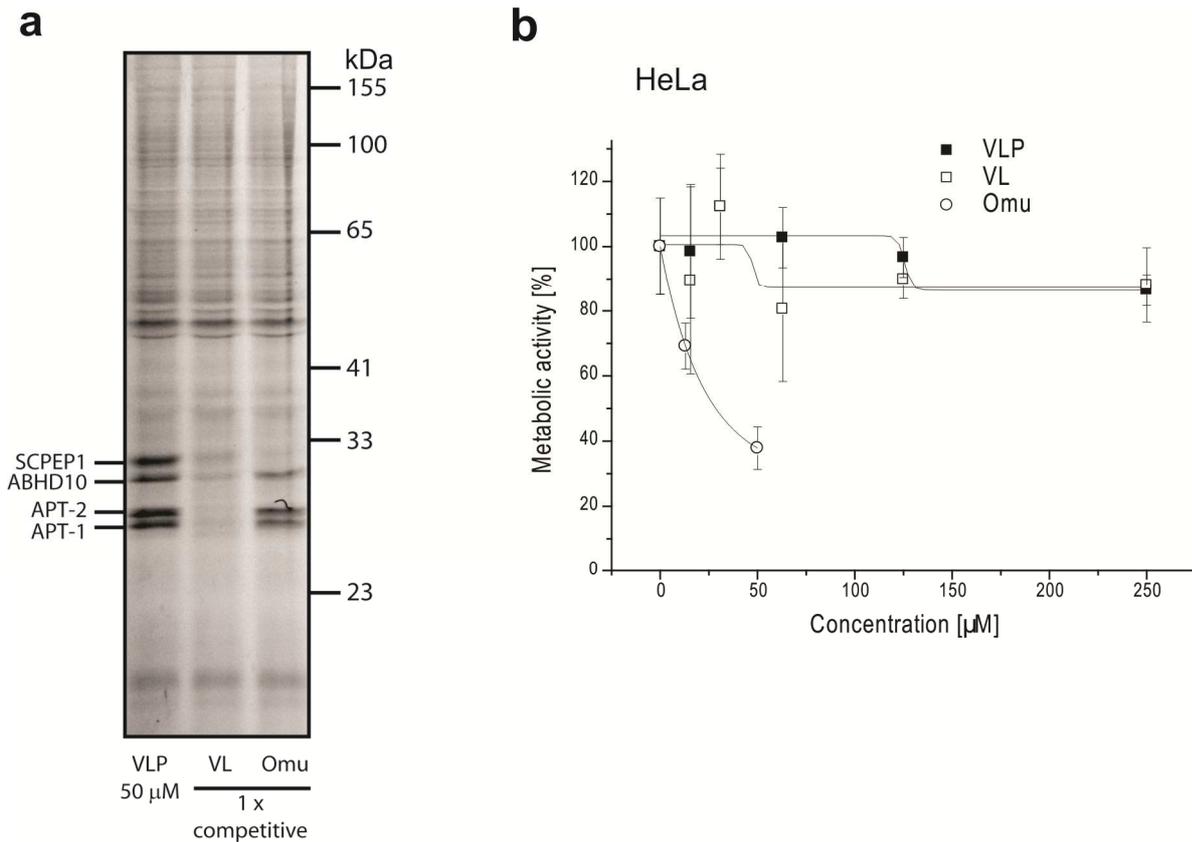
Zusätzlich werden durch die P1 Position der Hydroxylgruppe in Omuralid und Salinosporamid A die beiden Verbindungen ideal positioniert und stabilisiert. Verantwortlich dafür ist die Ausbildung weiterer Wasserstoffbrückenbindung zu Thr21N, was zu weiterem Enthalpiegewinn führt. Vibralacton fehlt diese OH-Gruppe, so dass der Entropieverlust auch nicht durch eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thr21N und der OH-Gruppe wiedergewonnen werden kann. Dieses Ergebnis beweist die Wichtigkeit der Gesamtstruktur der  $\beta$ -Lacton-Inhibitoren, die nicht durch eine funktionelle reaktive Kopfgruppe ausgeglichen werden kann.

Ebenso besitzt das 20S Proteasom keine spezifische S2 Tasche, so dass alle P2 Seitenketten generell akzeptiert werden und das Fehlen der P2 Seitenkette kein Grund für die fehlende inhibitorische Aktivität von Vibralacton gegenüber dem 20S Proteasom darstellt. Unterstützt

wird dies durch die Tatsache, dass verschiedene Proteasominhibitoren in ihrer Länge und Sequenz bezüglich der P2 Seitenkette stark variieren.

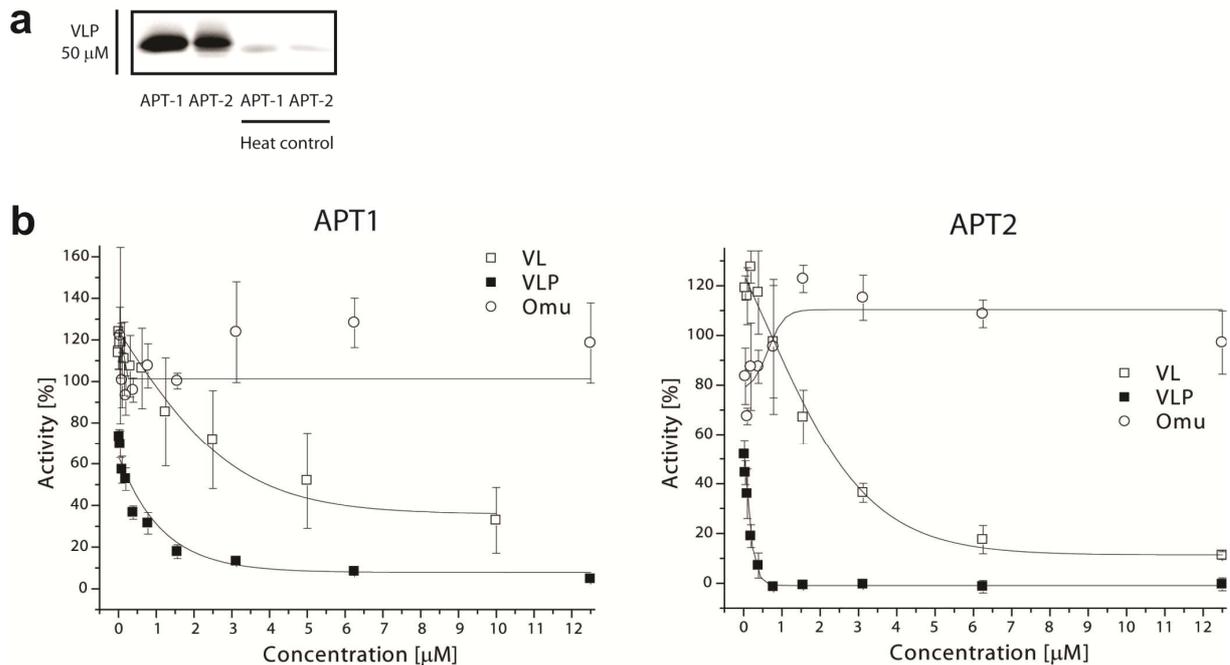
Omuralid wird nur von Bakterien exprimiert, die kein 20S Proteasom besitzen, wohingegen Vibralacton von Pilzen produziert wird, deren Überleben von einem funktionierendem 20S Proteasom abhängt. Somit erleiden Bakterien keinen Schaden durch die Produktion eines 20S Proteasom Inhibitors, wohingegen die Pilze in Anwesenheit eines 20S Proteasom Inhibitors stark in Mitleidenschaft gezogen würden. Dieser Unterschied unterstreicht das unterschiedliche Inhibitionsmuster der beiden Verbindungen.

In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. S. Sieber und Dr. C. Hedberg wurden die Targets von Vibralacton in eukaryotischen Zellen durch *activity-based protein profiling* (ABPP)<sup>[84]</sup> analysiert um die verschiedenen Inhibitionsprofile von Vibralacton und Omuralid zu untersuchen. Vibralacton wurde dafür mit einem Alkyne-Tag modifiziert. Dieses modifizierte Vibralacton (VLP) wurde zu HeLa Zellen gegeben und für eine Stunde inkubiert.<sup>[85]</sup> Die HeLa Zellen wurden lysiert und das Proteom mit Rhodaminazid unter Click-Chemie-Bedingungen<sup>[86]</sup> behandelt. Es wurden vier Targets, die von Vibralacton inhibiert werden, identifiziert (siehe Abbildung 12a): Carboxypeptidase (SCPEP1), *Abhydrolase domain containing protein 10* (ABHD10) und Acyl-Protein Thiosterease 1 und 2 (APT1, APT2). Omuralid inhibiert das 20S Proteasom und SCPEP1.



**Abbildung 12:** a) Target-Identifizierung für Vibralacton (VL), modifiziertes Vibralacton (VLP) und Omuralid (Omu) durch die Zugabe von Rhodaminazid unter Click-Chemie Bedingungen; Visualisierung durch die Verwendung einer fluoreszierenden SDS-Gel-Analyse und Massenspektrometrie; für Vibralacton wurden SCPEP-1, ABHD10 und APT1/2 als Targets identifiziert; Omuralid inhibiert das 20S Proteasom und SCPEP1. b) Zelltoxizitätstest, bei Omuralid-Behandlung Tod der HeLa Zellen; bei Zugabe von Vibralacton bleibt 100% der metabolischen Aktivität erhalten

Diese Ergebnisse bestätigen die unterschiedlichen Inhibitionsprofile dieser beiden strukturell ähnlichen Verbindungen. Außerdem konnte in Zelltoxizitätsassays gezeigt werden, dass die Behandlung von HeLa Zellen mit Omuralid zum Tod führt, wohingegen bei Zugabe von Vibralacton die metabolische Aktivität vollständig beibehalten wird (siehe Abbildung 12b). Die nähere Betrachtung der APT1/2 Inhibition durch Vibralacton zeigte interessante Ergebnisse. APT1/2 sind im RAS Signalweg involviert und daher interessante Targets in der Krebs-Forschung.<sup>[87]</sup> Die Hitze-Denaturierung von rekombinanten APT1/2 zeigte keine Markierung für das modifizierte Vibralacton (siehe Abbildung 13a), was bedeutet, dass nur aktive Enzyme mit VLP reagieren und was bestätigt, dass die Bindung von Vibralacton an APT1/2 vor allem im aktiven Zentrum geschieht.



**Abbildung 13:** a) Hitze-Denaturierung der rekombinanten APT1- und APT2-Enzyme, die keine Markierung für modifiziertes Vibralacton (VLP) zeigt, was beweist, dass nur aktive Enzyme mit VLP reagieren und VLP ins aktive Zentrum bindet. b) Der Graph zeigt die IC<sub>50</sub> Werte für Vibralacton (VL), VLP und Omuralid (Omu) gegenüber APT1/2; VL und VLP inhibieren APT1 und APT2; bei Omu ist volle Aktivität zu sehen.

In Kooperation mit Dr. C. Hedberg wurden die IC<sub>50</sub>-Werte von Vibralacton und VLP gegenüber APT1 und APT2 bestimmt. Der IC<sub>50</sub> von Vibralacton ist 8 μM für APT1 und 2 μM für APT2. Überraschenderweise hat das modifizierte Vibralacton einen IC<sub>50</sub> von 400 nM gegenüber APT1 und 160 nM gegenüber APT2 (siehe Abbildung 13b).

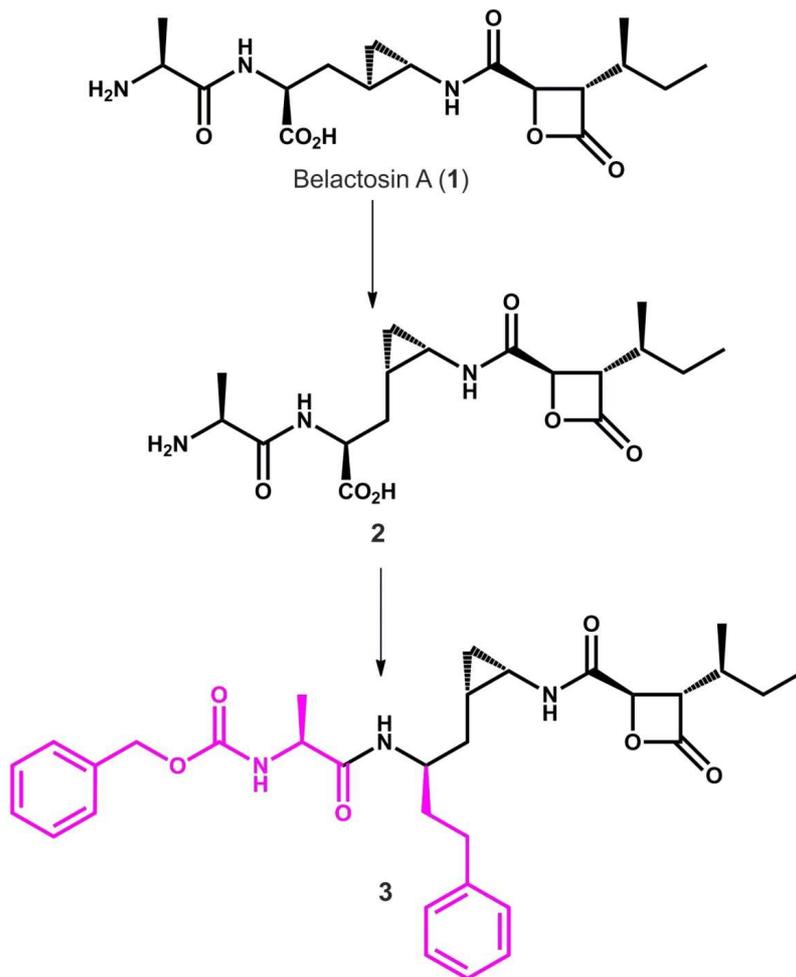
β-Lacton Proteasom-Inhibitoren wurden als wichtige biologische Werkzeuge entdeckt und befinden sich nun in der klinischen Phase I und II zur Behandlung von Multiplem Myelom, Leukämie, Lymphomen und Tumoren. Einer der ersten Inhibitoren war Omuralid, der eine zentrale Rolle in der Identifizierung von katalytisch aktiven Resten des Proteasoms spielte und das generelle Verständnis der Proteasombiologie erhöhte. Mit der Entdeckung des Naturprodukts Vibralacton und der Kombination der Methoden Kristallographie, Target-Identifizierung und *in-vitro* bzw. *in-vivo* Zelltoxizitätsassays kann mit dieser Arbeit ein besseres Verständnis in dem Inhibitor-Bindungsprofil erlangt werden. Es konnten die exakten Komponenten, die für eine 20S Proteasom Inhibition mit einem β-Lacton notwendig sind, bestimmt werden, die bislang noch nicht bekannt waren. Diese neuen Einblicke in die β-

Lacton-Bindungsweise eröffnen neue Wege für die Medikamentenentwicklung gegen z.B. Krebs.

## 3.2 Ein Belactosin A-Derivat

### 3.2.1 Kristalle des Belactosin A-Derivats

Belactosin A (**1**) (siehe Abbildung 14) ist ein natürlich vorkommendes Tripeptid aus L-Alanin, 3-(*trans*-2-aminocyclopropyl)-L-Alanin (*trans*-3,4-Methan-L-Ornithin) und einem chiralen Carboxyl- $\beta$ -Lacton. Es ist eine neue Leitstruktur für die Entwicklung von potenten Antikrebs-Medikamenten, weil es das Proteasom über eine Acylierung des Thr1 des aktiven Zentrums über die Ringöffnung des gespannten  $\beta$ -Lactons inhibiert.<sup>[3]</sup> Aufgrund seiner starren strukturellen Eigenschaften schränkt ein Cyclopropan effektiv die Konformation von Molekülen ein, die oft die biologische Aktivität beeinflusst.<sup>[88]</sup> Beim Belactosin grenzt das Cyclopropan die Orientierung des L-Alanins und des  $\beta$ -Lacton-Restes ein, die entscheidende Interaktionen mit dem Proteasom ausbilden können. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Shuto wurde daher eine Reihe an Belactosin A Analoga mit unterschiedlicher Stereochemie synthetisiert, bei denen das zentrale Aminocyclopropyl-L-Alanin (Methano-L-Ornithin) durch eine korrespondierende stereo- oder regioisomerische Cyclopropan Aminosäure ersetzt wurde. Es zeigte sich, dass die Verbindung **3** ein sehr potenter Proteasom-Inhibitor ist, der 20-mal wirksamer als der ursprüngliche Naturstoff Belactosin A ist (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Auf Belactosin A-Basis entwickelter Proteasom-Inhibitor **3**; neu modifizierte Reste sind in pink dargestellt

Um den Bindungsmechanismus von **3** an das Chymotrypsin-ähnliche aktive Zentrum des 20S Proteasoms aus *S. cerevisiae* besser zu verstehen wurde die Kristallstruktur des 20S Proteasom:**3**-Komplexes gelöst.

Kristalle des 20S Proteasoms von *S. cerevisiae* wuchsen unter den unter 3.1 *Vibrilacton* beschriebenen Bedingungen in *Hanging Drops* bei 20°C.<sup>[21]</sup> Die Kristalle entstanden innerhalb von zwei Tagen und hatten eine finale Größe von ca. 50×200×500 μm<sup>3</sup>. Sie wurden mindestens 24 h mit der Verbindung **3** inkubiert. Auch das Einfrieren und die Strukturmessung wurde analog zu 3.1 *Vibrilacton* durchgeführt. Die Struktur hatte eine Auflösung von 2.8 Å (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung der Komplexstruktur des 20S Proteasom aus *S. cerevisiae* gesoaked mit 3

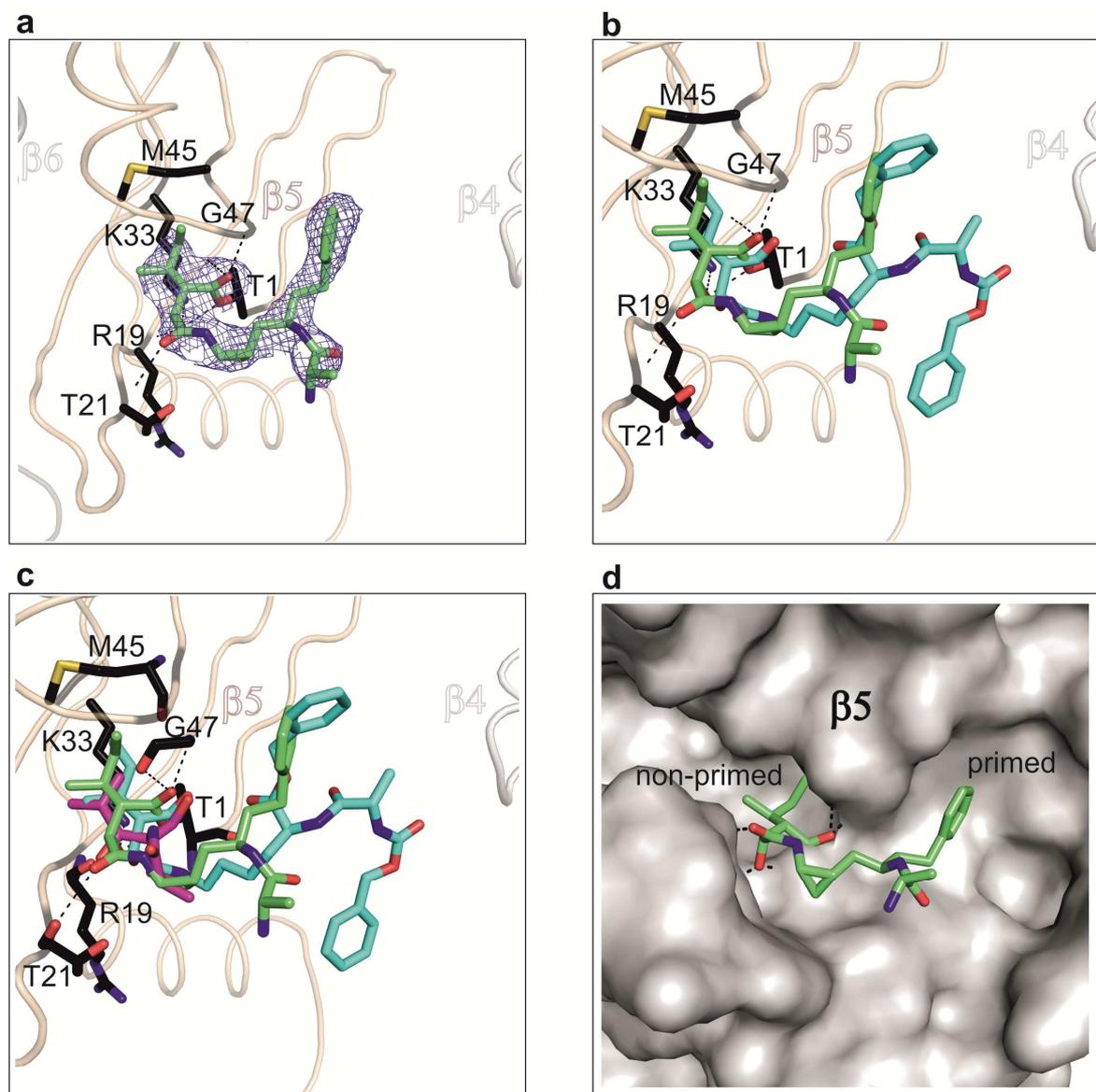
Proteasom:3	
<u>Kristallparameter</u>	
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>
Zellparameter	a=137 Å, b= 302 Å, c=146 Å, β = 114°
Moleküle in AE <sup>a</sup>	1
<u>Datensammlung</u>	
Vorbestrahlung	nein
Beamline	SLS, X06DA
Wellenlänge (Å)	1.0
Auflösungsbereich (Å) <sup>b</sup>	40-2.8 (2.9-2.8)
Anzahl der beobachteten Reflexe	875510
Anzahl der Einzelreflexe <sup>c</sup>	262724
Vollständigkeit (%) <sup>b</sup>	98.6 (92.0)
R <sub>merge</sub> (%) <sup>b, d</sup>	11.2 (47.4)
I/σ (I) <sup>b</sup>	9.97 (2.56)
<u>Verfeinerung (REFMAC5)</u>	
Auflösungsbereich (Å)	49-2.8
Anzahl der Reflexe	249587
Atomanzahl	
Protein	49548
Inhibitor	62
Wasser	1339
R <sub>work</sub> / R <sub>free</sub> (%) <sup>e</sup>	0.227/ 0.241
RMS Abweichung <sup>f</sup>	
Bindungslänge (Å)/ Winkel (°)	0.004/ 0.815
Durchschnittlicher B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	48.154
Ramachandran Plot (%) <sup>g</sup>	97.2/ 2.5/ 0.3
<sup>a</sup> Asymmetrische Einheit.	
<sup>b</sup> Die Werte in Klammern bei Vollständigkeit, R <sub>merge</sub> und I/σ (I) entsprechen der letzten Auflösungsschale.	
<sup>c</sup> Friedel Paare wurden als identische Reflexe behandelt.	
<sup>d</sup> $R_{\text{merge}}(I) = \sum_{\text{hkl}} \sum_j  I(\text{hkl})_j - I(\text{hkl})  / [\sum_{\text{hkl}} I_{\text{hkl}}]$ , wobei $I(\text{hkl})_j$ die j-ste Messung der Intensität der Reflexe hkl ist und $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ Durchschnittsintensität ist.	
<sup>e</sup> $R = \sum_{\text{hkl}}    F_{\text{obs}}  -  F_{\text{calc}}    / \sum_{\text{hkl}}  F_{\text{obs}} $ , wobei R <sub>free</sub> ohne Sigma Cutoff für zufällig ausgewählte 5 % der Reflexe, die nicht in die Struktur-Verfeinerung einbezogen wurden. R <sub>work</sub> wird von den verbleibenden Reflexen berechnet.	
<sup>f</sup> Abweichung von den idealen Bindungslängen und Bindungswinkeln.	
<sup>g</sup> Anzahl der Aminosäurereste in favorisierten Regionen/ erlaubten Regionen/ verbotenen Regionen	

Die Daten-Auswertung geschah wie unter 3.1. *Vibrilacton* beschrieben und resultierte in der Raumgruppe P2<sub>1</sub> mit den Zell-Parametern a = 137 Å, b = 302 Å, c = 146 Å und β = 114° und einem kristallographischen R-Faktor von 22.7 % (freier R-Faktor = 24.1 %) mit RMS Abweichung von 0.004 Å in den Bindungslänge und 0.815° in den Winkeln (siehe Tabelle 9).

### 3.2.2 Röntgenstruktur Analyse der Verbindung **3** im Komplex mit dem Proteasom

Um Einblicke in den Bindungsmechanismus der Verbindung **3** mit dem Proteasom zu erlangen, wurde das Belactosin A-Analoga **3** mit Kristallen des 20S Proteasoms aus *S. cerevisiae* gesoaked. Die 20 fach gemittelte  $2F_0F_C$ -Elektronendichte-Mappe zeigt, dass **3** in der gestrichenen Seite des Chymotrypsin-ähnlichen aktiven Zentrums lokalisiert ist. Die begrenzte Größe der gestrichenen Seite in den  $\beta 1$ - und  $\beta 2$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms aus *S. cerevisiae* und die sterisch starre Cyclopropan-Gruppe des Liganden **3** verhindern die Bindung von **3** in diese Spezifitätstaschen, weswegen der Inhibitor selektiv die  $\beta 5$ -Untereinheit hemmt.<sup>[42a]</sup> Das Isoleucin der Verbindung **3** ist die einzige Seitenkette, die in die ungestrichene Seite zeigt und perfekt in die S1 Tasche hineinragt und durch zahlreiche Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Resten dieser Spezifitätstasche stabilisiert wird. Außerdem zeigte die Komplexstruktur eine kovalente Bindung von **3** an das katalytische, N-terminale Thr10<sup>y</sup> der  $\beta 5$ -Untereinheit. Der  $\beta$ -Lacton-Ring von **3** wird unter einer Esterbildung mit Thr10<sup>y</sup> geöffnet, genauso wie es für die  $\beta$ -Lactone Omuralid, Salinosporamid A und Homobelactosin C beobachtet wird.<sup>[22, 81]</sup> Bei Bindung von konventionellen Lacton-Inhibitoren formiert sich während der  $\beta$ -Lactonring-Öffnung am C4 eine sekundäre Hydroxylgruppe, die durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit Thr1 stabilisiert ist und die die Position des nukleophilen Wassermoleküls (NUK) einnimmt und somit die Esterspaltung und Regenerierung des aktiven Zentrums unterdrückt. Normalerweise greift NUK das Carbonylkohlenstoff nukleophil nach der Bürgi-Dunitz-Trajektorie an. Bei der Inhibitor-Bindung verschiebt die C4-Hydroxylgruppe das NUK um etwa einen Angström und der notwendige  $108^\circ$  Winkel ist nicht mehr gegeben. Dadurch wird die Freisetzung des Inhibitors verhindert, weil der nukleophile Angriff des NUKs an die Thr10<sup>y</sup>-CO Esterbindung blockiert ist.<sup>[66, 89]</sup> Im Falle der Verbindung **3** bildet die neu gebildete Hydroxylgruppe am C4 jedoch eine Wasserstoffbrückenbindung zu Arg19O, was in die entgegengesetzte Richtung zeigt, wie es für  $\beta$ -Lacton- $\gamma$ -Lactam-Inhibitoren bekannt ist.<sup>[81, 90]</sup> Der Cyclopropan Ring von **3** nimmt trotzdem eine ähnliche Position wie das C4-OH von Omuralid (in Homobelactosin C durch das Stickstoff-Amid (NH-6) der 4-Aminocarbonyl Seitenkette besetzt) ein, was auch die Freisetzung des Inhibitors unterbindet. Diese Bindungsposition, die Stereochemie von **3** und der Cyclopropanring zwingen den Rest des Belactosin-Derivats **3** in die gestrichene Seite des Proteasoms. Die strukturelle Überlagerung des gebundenen Homobelactosins C und der Verbindung **3** zeigen eine analoge Bindung an das aktive Thr1 und eine ähnliche Bindung der

S1 Seitenkette an den P1 Rest (siehe Abbildung 15). Die Interaktion mit der gestrichenen Seite hat eine vergleichbare Orientierung in beiden Inhibitoren, wobei jedoch keine wirklich entscheidenden Interaktionen mit den Seitenketten des aktiven Zentrums beobachtet werden.



**Abbildung 15:** Verbindung 3 und seine Bindungsweise an die  $\beta 5$ -Untereinheit. **a)** Kristallstruktur des Chymotrypsin-ähnlichen aktiven Zentrums im Komplex mit 3. Das Rückgrat der proteasomalen  $\beta 5$ -Untereinheit ist in beige gefärbt, Untereinheit  $\beta 6$  und  $\beta 4$  in grau, und als *coil* Model dargestellt; der Ligand ist als grünes *stick* Model abgebildet. Die Elektronendichte (blau) ist um Thr1 (schwarz) mit  $1 \sigma$  konturiert. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen 3 und den Atomen Gly47N, Thr1N, Thr21O, Lys33N und Arg19O der  $\beta 5$ -Hauptkette sind als schwarze gestrichelte Linien dargestellt. **b)** Strukturelle Überlagerung von 3 (grün) und Homobelactosin C<sup>[81]</sup> (cyan), die an das Chymotrypsin-ähnliche aktive Zentrum gebunden sind. **c)** Strukturelle Überlagerung von 3 (grün), Homobelactosin C<sup>[81]</sup> (cyan) und Omuralid (pink). **d)** Oberflächendarstellung der Bindung von 3 in die  $\beta 5$ -Untereinheit

Es konnte eine Verbindung **3** synthetisiert werden, die sogar 20-mal wirksamer als der Naturstoff Belactosin A ist. Sie hat einen bemerkenswert niedrigen  $IC_{50}$  von 5.7 nM und ist damit vergleichbar mit dem Medikament Bortezomib ( $IC_{50} = 4.5$  nM). Die Ursache für den niedrigen  $IC_{50}$ -Wert ist der Cyclopropanring, der die Entropie beeinflusst. Die Seitenkette ist noch zu flexibel und kann weiter optimiert werden. Zudem befindet sich diese nicht in der besten Bindeposition, so dass die Verbindung **3** noch bezüglich ihrer Seitenketten-Stabilisierung durch das 20S Proteasom und die Passgenauigkeit in die gestrichene Seite verbessert werden kann. Basierend auf diesen Ergebnissen können hoch potente Proteasom-Inhibitoren mit einer unnatürlichen *cis*-Cyclopropan-Struktur entwickelt werden, die in der Medikamenten-Entwicklung eine entscheidende Rolle spielen.



---

## **IV ClpP**



# 1 Einleitung

Durch die fortschreitende Verbreitung von multiresistenten Bakterien kommt es zunehmend zur Gefährdung insbesondere von immunsupprimierten Patienten und Kleinkindern. Der *Staphylococcus aureus* Stamm spielt dabei eine besonders große Rolle, der in Deutschland nach Angaben der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene und des *Eursafety Health-Net*<sup>[91]</sup> knapp 25% der vorkommenden Bakterienstämme ausmacht und für viele nosokomiale Infektionen verantwortlich ist. Seine leichte Übertragbarkeit macht in Krankenhäusern, Altenheimen und beim Krankentransport immer aufwändigere Isolations- und Desinfektionsmaßnahmen nötig.<sup>[92]</sup> Konservative Schätzungen gehen für Deutschland von etwa 5000 *S. aureus* Neuinfektionen pro Jahr aus, von denen etwa ein Fünftel tödlich verlaufen. In den USA wurde die Zahl der Todesfälle durch HIV/AIDS von *S. aureus*-Infektionen in den letzten 10 Jahren das erste Mal überholt.<sup>[93]</sup>

Die caseinolytische Protease P (ClpP) stellt einen wichtigen Regulator der Virulenz in multiresistentem Bakterien dar und spielt eine bedeutende Rolle in der Stress-Antwort, der Protein-Qualitätskontrolle, sowie der Transkriptionskontrolle. Sie ist eine der Hauptkomponenten im zellulären Proteinabbau. Daher ist dieses Enzym ein interessanter Angriffspunkt für die Entwicklung von neuartigen Inhibitoren gegen multiresistente, pathogene Bakterien. Funktionelle und strukturelle Untersuchungen von ClpP könnten neue Erkenntnisse über den ClpP-Mechanismus liefern, durch die neue Wege zur Prävention und Behandlung von Infektionskrankheiten eröffnet werden

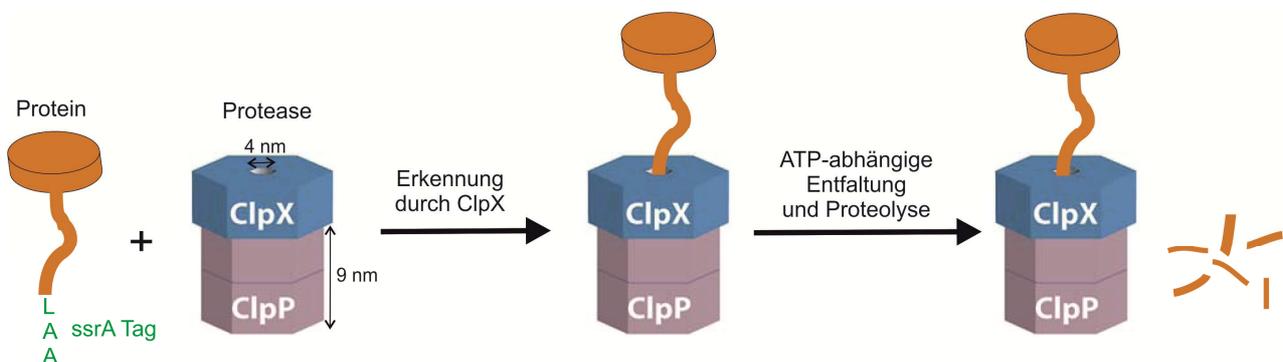
## 1.1 Funktion und Vorkommen von ClpP

Eine wichtige Voraussetzung für die Lebensfähigkeit von Zellen ist der Erhalt der zellulären Homöostase auf Proteinebene. Dazu müssen fehlgefaltete oder beschädigte Proteine, sowie regulatorische Proteine abgebaut werden können. In Prokaryoten existieren hierfür eine Reihe von ATP-abhängigen Proteasen, darunter ClpAP, ClpXP, HslVU, Lon und FtsH. Ihre Gemeinsamkeit ist, dass sie das abzubauen Protein binden und entfalten. Anschließend wird dieses ins Proteininnere eingefädelt, wo es abgebaut und als Peptid freigesetzt wird.<sup>[94]</sup>

Die Clp-Komplexe bestehen aus der teradecameren ClpP-Proteaseeinheit und einem hexameren, ATP-abhängigen Chaperon der AAA+-Familie (ClpA, ClpX) (siehe Abbildung 16). ClpP ist eine stark konservierte Serin-Protease, die in Eukaryoten und in fast allen

Bakterien, mit Ausnahme von *Mollicutes*, Homologe besitzt. Während Insekten, Säugetiere und die meisten Prokaryoten nur eine Isoform besitzen, existieren auch Stämme mit zwei bis drei Isoformen, darunter *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* und bestimmte Cyanobakterien. Auch viele Pflanzengattungen besitzen mehrere Isoformen. In Archaea und einigen Pilzen ist bislang kein ClpP gefunden worden.<sup>[95]</sup>

Bei ClpP handelt es sich um eine Carboxypeptidase, so dass der Proteinabbau vom C- zum N-Terminus erfolgt. Gezeigt wurde das durch Fluoreszenzmessungen mittels grün-fluoreszierendem Proteins (GFP) mit einem C-terminalem SsrA-Tag. Eine wichtige Aufgabe des ClpXP-Komplexes besteht darin Proteine mit SsrA-Tag abzubauen, weil dieser C-terminale Tag unvollständige oder nicht funktionsfähige Proteine kennzeichnet (siehe Abbildung 16). So wurde mit diesem Experiment bewiesen, dass der Abbau bei Clp-Komplexen vom C-Terminus her geschieht.<sup>[96]</sup> Diese Annahme wurde durch die Experimente von Reid *et al.* 2001<sup>[97]</sup> bestätigt, die ein Fluoreszenz-markiertes ClpP und zwei Modellsubstrate, die an je einem Terminus einen Farbstoff trugen, nutzten. Durch Messung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzanisotropie und des Resonanzenergie transfers konnte gezeigt werden, dass zunächst die Anisotropie des C-terminalen Farbstoffs zunimmt und dieser auch früher einen Fluoreszenz-Resonanzenergie transfer (FRET) als die N-terminale Markierung zeigt.



**Abbildung 16:** ClpXP Proteolyse Model. ClpX erkennt SsrA Tag des abzubauenen Proteins und entfaltet es. ClpP zerschneidet das Protein in Peptide

## 1.2 Aufbau des Protease-Komplexes

Unter physiologischen Bedingungen besteht ClpP aus zwei ringförmigen Heptameren, die ein zylindrisch geformtes Homotetradecamer bilden. Der 300 kDa Komplex hat sowohl eine Höhe als auch einen Durchmesser von 9 nm und besitzt im Inneren eine zentrale Kammer, in dem auf zwei Ringen die aktiven Zentren angeordnet sind. Der Innenraum wird seitlich durch die Handle-Regionen nach außen hin abgeschlossen, während auf der Ober- und Unterseite axiale Poren vorliegen über die der Zugang zu dieser Kammer erfolgt.

ClpP ist ein wichtiges Mitglied der Familie der zylindrischen Proteasen, zu denen auch das eukaryotische 20S-Proteasom und das bakterielle HslV gehören. Diese spielen durch den gezielten und streng regulierten Abbau von Proteinen eine wichtige Rolle in der Proteinhomeostase.<sup>[93]</sup>

ClpP alleine besitzt nur eine mäßige und unspezifische Peptidase-Aktivität. Erst im Komplex mit einem oder zwei ATP-abhängigen Chaperonen der AAA+ Familie, bei der ClpX und ClpA die beiden Hauptvertreter darstellen, wird ClpP intrazellulär proteolytisch aktiv (siehe Abbildung 16). Diese hexameren Chaperone binden axial an ClpP und übernehmen dabei die Erkennung, Bindung, und Entfaltung der abzubauenen Proteine. Der Durchmesser der axialen Poren beträgt ca. 4 nm, wodurch diese für  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter groß genug sind, nicht aber für native Proteine. ClpP allein verfügt nur über Peptidase-Aktivität und ist erst im Komplex mit diesen Chaperonen proteolytisch aktiv.<sup>[95]</sup> Unbekannt ist, ob der Austritt der Peptid-Fragmente über eine axiale oder eine seitliche Pore erfolgt, die durch konformative Umordnung in den Handle-Regionen transient gebildet wird.

ClpP kann sowohl eine komprimierte, inaktive Konformation, die ~ 1 nm kleiner ist, annehmen, als auch eine aktive Konformation, bei der die E-Helix gestreckt ist. Beide Konformationen spielen eine Rolle im katalytischen Zyklus der ClpP Protease. Es ist aber noch unklar, ob die beiden unterschiedlichen Konformationen der Kopfdomäne eine Auswirkung auf den Oligomerisierungsstatus der Protease haben. Bisher wurde noch nicht herausgefunden, welche Reste an der Bildung des Ringsystems beteiligt sind.

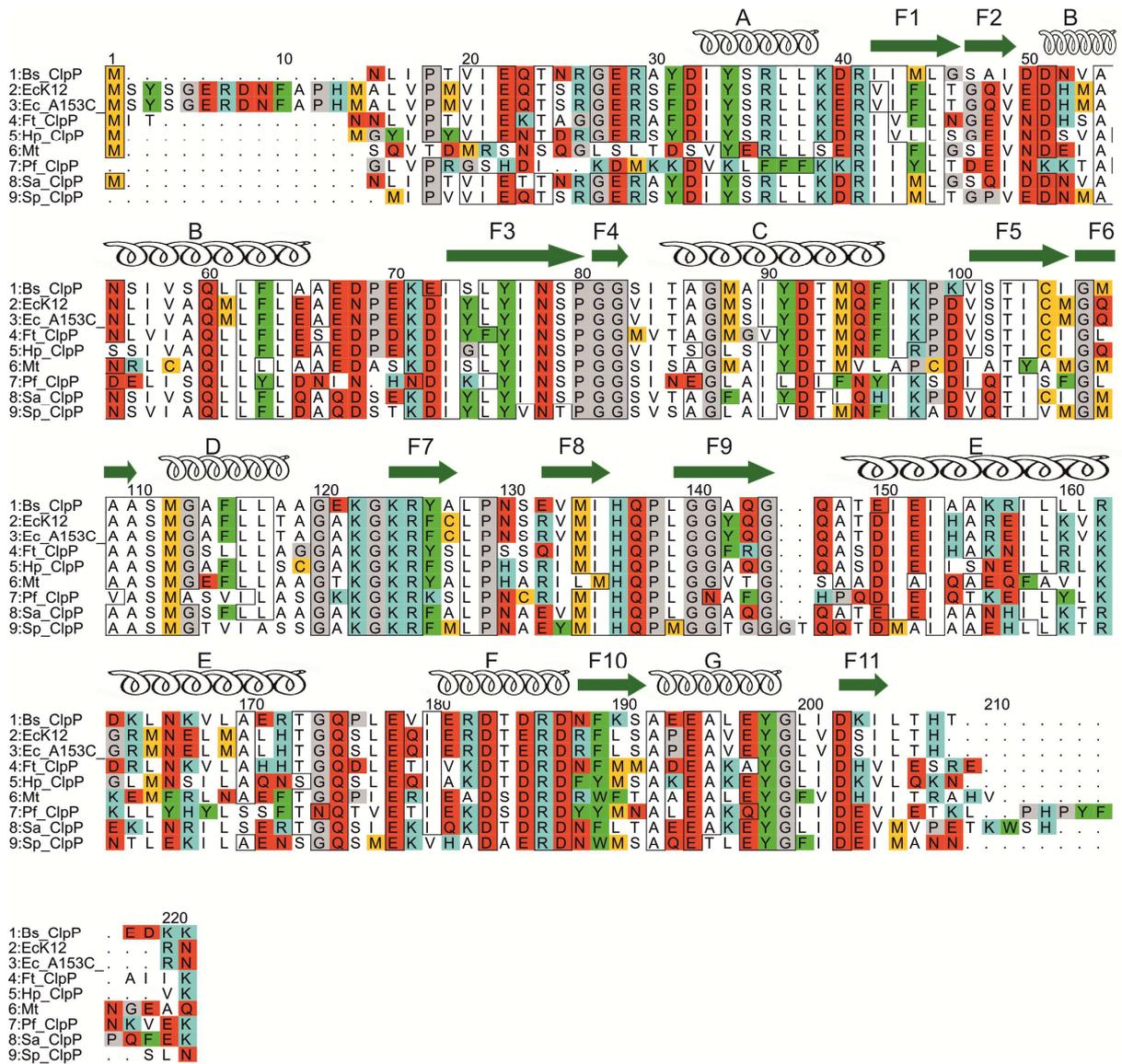
### 1.3 Chaperon-Protease-Wechselwirkung

Die Chaperon-Protease-Interaktion erfolgt über N-terminale Schleifen von ClpP und über hochkonservierte Motive der Chaperone (IGF in ClpX, IGL in ClpA). Bisher konnten noch keine Wechselwirkungen identifiziert werden, aber es wird über eine „loop-groove“-Interaktion<sup>[98]</sup> spekuliert, die die Komplementarität der beiden Bindungsstellen ausnutzt. Es existiert bisher noch keine schlüssige Begründung für die Symmetrieungleichheit zwischen dem siebenfach symmetrischen ClpP und dem sechsfach symmetrischem Chaperon. Es wird spekuliert, dass die beiden Komplexe während der Translokation rotieren.<sup>[95]</sup>

Ohne N-Terminus kann ClpA/ClpX nicht mehr an ClpP binden und so kommt es zu einer erhöhten Peptidase-Aktivität von ClpP. Dies ist auf die größere Porenöffnung und die damit verbesserte Zugänglichkeit zu den aktiven Zentren zurückzuführen. Damit stimmt die Beobachtung überein, dass sich die Kinetik des Substratabbaus nicht mit dem Standard-Michaelis-Menten-Modell beschreiben lässt.<sup>[93]</sup> Vielmehr scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Bildung des Substrat-Protease-Komplexes zu sein. Folglich wird die Rate des Proteinabbaus durch das ATP-abhängige Entfalten und Einfädeln des abzubauenen Proteins durch das Chaperon bestimmt und nicht durch die von ClpP durchgeführte Proteolyse.<sup>[98]</sup>

### 1.4 ClpP-Kristallstrukturen

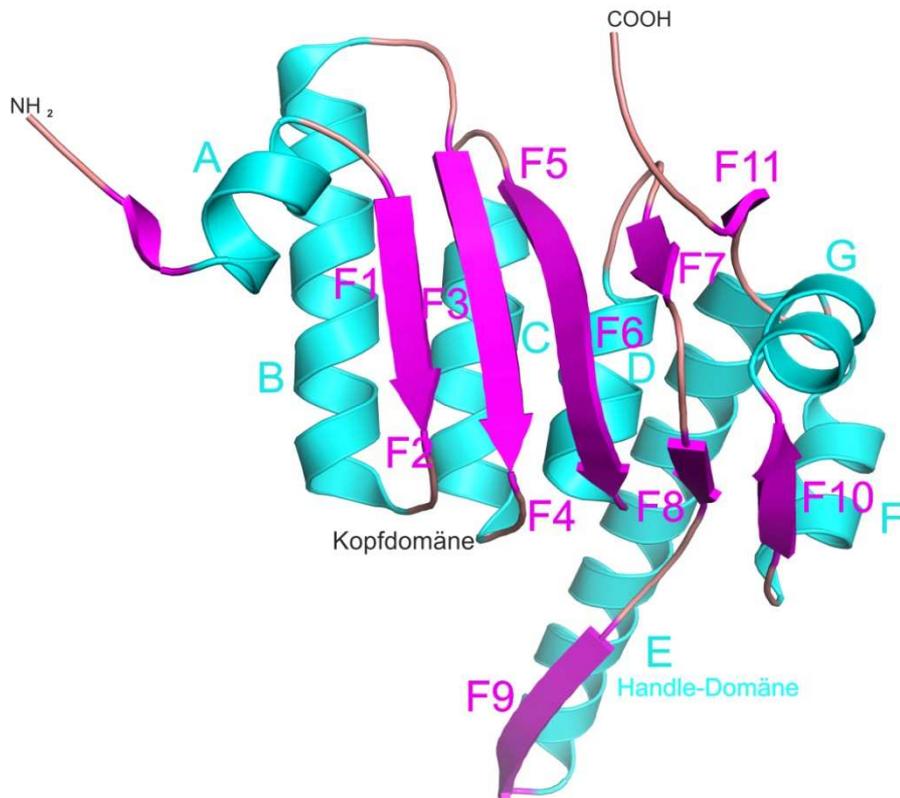
Mit der ersten veröffentlichten Kristallstruktur eines ClpP-Komplexes aus *Escherichia coli* (*EcClpP*) von Wang, Hartling *et al.* im Jahr 1997<sup>[99]</sup> konnte gezeigt werden, dass ein ClpP Monomer aus sechs  $\alpha$ -Helices (A-G) und elf  $\beta$ -Faltblättern (F1-F11) besteht (siehe Abbildung 17). Die Helices sind an der Außenseite des Proteins lokalisiert, wohingegen die Faltblätter im Inneren liegen.



**Abbildung 17:** Sequenzalignment von ClpP aus verschiedenen Organismen. Negativ geladene Aminosäurereste sind in rot, positiv geladenen Reste in blau, schwefelhaltige Reste in gelb und aromatische Reste in grün dargestellt. Die elf Faltblätter sind als grüne Pfeile dargestellt (F1-F11) und die sieben Helices sind mit A-G abgekürzt.

Die Kristallstrukturen von mehreren ClpP Proteinen, wie z.B. von *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Plasmodium falciparum*, wurden bereits gelöst.<sup>[96, 100]</sup> Die Strukturen zeigen alle eine Faltung mit drei Eigenschaften (siehe Abbildung 18). Die erste ist ein flexibler N-terminaler Loop, der aus dem axialen Ende des Zylinders heraussteht und die Interaktion mit den Chaperonen erleichtert. Die zweite ist eine große Kopfdomäne mit auf der Innenseite des Zylinders liegenden aktiven Zentren und mit einer hydrophoben Oberfläche, die für den

Untereinheiten-Kontakt in einem Ring verantwortlich ist. Und die dritte Eigenschaft ist eine Handle-Domäne (Helix E), die mit ihrem Pendant des gegenüber liegenden Rings interagiert.



**Abbildung 18:** Cartoon-Darstellung einer ClpP Untereinheit aus *Escherichia coli*, die die typische  $\alpha/\beta$ -Faltung zeigt. Die  $\alpha$ -Helices sind in magenta, die  $\beta$ -Faltblätter in cyan und die Loops in bräunlich dargestellt.

Überraschenderweise führt das Entfernen dieser Handle-Domäne nicht zu einer Dissoziation des Tetradecamers in Heptamere, aber zu proteolytisch inaktiven Komplexen. Daher wird vermutet, dass die zwei Ringe hauptsächlich durch ionische Wechselwirkungen zwischen Resten der Kopfdomäne stabilisiert werden. Bislang ist wenig über die Chaperon-Protease-Interaktion und die Funktion auf molekularer Ebene bekannt. Allgemein wird angenommen, dass die Kopfdomäne für die Peptid-Freisetzung eine Öffnung an der äquatorialen Seite bildet. NMR-Untersuchungen haben gezeigt, dass der helikale Teil der Kopfdomäne in Lösung sehr dynamisch ist und zwei verschiedene Konformationen annehmen kann, die bei höherer Temperatur schnell ineinander übergehen.<sup>[101]</sup>

## 1.5 Funktionen der Handle-Region

In den ClpP-Kristallstrukturen von *P. falciparum*, *M. tuberculosis* und der *S. pneumoniae*-Mutante<sup>[98]</sup> liegen 13-15 Reste der Handle-Domäne nicht definiert vor, was auf große Flexibilität hinweist. In der *SaClpP* Struktur, die mit Kristallisationsbedingungen bei pH 4.5 erhalten wurde, knickt die  $\alpha$ E-Helix in der Mitte ab, wodurch sich das  $\beta$ 9-Faltblatt in einer anderen Konformation als bei den Strukturen befindet, die mit Kristallisationsbedingungen bei pH-Werten zwischen 6.5 und 9.0 erhalten wurden. Die katalytische Triade liegt dadurch in einer inaktiven Form vor, weil es zu keiner Aktivierung des Serins durch die nötige Wasserstoffbrückenbindung kommen kann. Bei pH 4.5 liegen die Seitenketten von E138 und D38 in protonierter Form vor und stabilisieren die aktive Konformation durch ionische Wechselwirkungen. Bei höheren pH Werten liegen beide Säurereste dagegen deprotoniert vor. Die Existenz sowohl der abgeknickten als auch der gestreckten Konformationen der Handle-Region konnte durch Protein-NMR-Experimente für *EcClpP* gezeigt werden.<sup>[102]</sup> Ob die durch diese Struktur gebildeten Poren groß genug sind, um den entstehenden Peptidfragmenten als Ausgang zu dienen und die genaue physiologische Relevanz der abgeknickten Helix ist noch unklar.

Eine weitere Funktion der Handle-Region ist der Kontakt der beiden Heptamere. Dabei ist ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt von zentraler Bedeutung, das durch die zwei  $\beta$ 9-Faltblätter von zwei Monomeren aus dem oberen und unteren Ring gebildet wird. Trotzdem führen Mutationen und Deletionen in diesem Bereich nicht zur Trennung des Tetradecamers, jedoch zum Verlust der katalytischen Aktivität. Neben den spezifischen Wechselwirkungen vom Wasserstoffbrückennetzwerk werden die beiden heptameren Ringe zudem durch hydrophobe Interaktionen zusammengehalten, bei denen über 40% der Oberfläche beteiligt sind.<sup>[98]</sup>

## 1.6 ClpP aus *Staphylococcus aureus*

Das Bakterium *Staphylococcus aureus* ist in der Natur weit verbreitet und bei 25% der deutschen Bevölkerung auf der Haut zu finden. Bei Personen mit geschwächtem Immunsystem können durch *S. aureus* Bakterien topische oder systemische Infektionen auftreten. Topische Infektionen führen im Regelfall zu lokal begrenzten Hautabszessen, während systemische Infektionen zu lebensbedrohlichen Erkrankungen, wie z.B. dem Toxischem-Schock-Syndrom oder Sepsis führen. Die Pathogenität bekommt *S. aureus* durch eine große Anzahl an Toxinen, darunter Enterotoxine, gerinnungshemmende Faktoren und durch das Immunoglobulin bindende Protein A, das die Opsonierung der Makrophagen verhindert. Bei multiresistenten Bakterien, wie *S. aureus*, muss in vielen Fällen auf teure Reserveantibiotika, wie Vancomycin, Daptomycin oder Tigecyclin zurückgegriffen werden und es besteht die Gefahr der erneuten Resistenzbildung.<sup>[103]</sup>

Einen neuen Ansatz *S. aureus*. zu bekämpfen, fanden Böttcher und Sieber 2008<sup>[104]</sup> mithilfe von *Affinity-based Protein Profiling* (ABPP) einer kleinen Bibliothek von  $\beta$ -Lactonen. Die konzentrationsabhängige Inhibition von ClpP mit solch einem  $\beta$ -Lacton führt zu einer Expressionsabnahme von antikoagulanten und proteolytischen Pathogenitätsfaktoren. Mittlerweile wurde die Wirksamkeit der Lactone im Mausmodell einer topischen *S. aureus* Infektion bestätigt.

Das Monomer von ClpP aus *Staphylococcus aureus* (*SaClpP*) besteht aus 195 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 22 kDa. Im Gegensatz zu ClpP aus *E. coli* oder *Plasmodium falciparum* besitzt es keine N-terminale Prosequenz, die autokatalytisch abgetrennt wird. Die Sequenzidentität zwischen *SaClpP* und *EcClpP* ist 85%, die für *SaClpP* und *PfClpP* 66%. Die Monomere zeigen eine große strukturelle Ähnlichkeit, bei der die konservierten Reste vor allem auf der hydrophoben Innenseite der Kammer liegen und die der Lösung zugewandten Außenseiten eine große Variabilität aufweisen.

## 2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin anhand von Röntgenkristallographie Fragestellungen zum molekularen Mechanismus und Ablauf der ClpP Reaktion zu untersuchen. Insbesondere sollte die Rolle der zwei unterschiedlichen Konformere im Ablauf des katalytischen Zyklus der ClpP-Reaktion geklärt werden. Die zentrale Fragestellung war, ob die abgeknickte Helix von ClpP aus *S. aureus* ein Konformationszustand ist oder eine spezifische Faltung einer einzelnen Spezies. Daher war geplant neue Kristallisationsbedingungen für das noch unbekannte ClpP-Protein aus *S. aureus* in der aktiven, ausgestreckten Konformation zu finden. Anhand dieser Struktur sollten die Unklarheiten der beiden unterschiedlichen Konformationen der Kopfdomäne bezüglich einer Auswirkung auf den Oligomerisierungsstatus der Protease untersucht werden, indem die zwei Zustände der ClpP Protease innerhalb einer Spezies verglichen werden sollen. Der Zusammenhang von Oligomerisierung und Aktivität wurde in der Literatur<sup>[105]</sup> kontrovers diskutiert. Dieses Thema stand unter anderem im Fokus dieser Arbeit.

Des Weiteren sollte herausgefunden werden, welche Reste an der Bildung und Stabilisierung des Tetradecamers beteiligt sind. Anhand der gefundenen Struktur werden Aminosäure-Reste ausgewählt und durch eine strukturbasierte Mutagenese die Interaktionen der beiden heptameren Ringe charakterisiert. Ziel hierbei ist die Identifizierung der Aminosäuren die Wechselwirkungen am Innenringkontakt ausbilden und für die Tetradecamer-Bildung sowie die proteolytische Aktivität essentiell sind. Weiterhin soll verglichen werden, ob diese Aminosäurereste in den beiden unterschiedlichen Konformationen andere Bindungspartner haben. Ebenso sollte die Mutante S98A kristallisiert werden um herauszufinden, ob die aktive Konformation mit ausgestreckter Helix aufgrund der veränderten Positionen von Arg<sup>171</sup> oder Ser<sup>98</sup> des aktiven Zentrums entsteht.

Zuletzt ist angestrebt einen Einblick in die ClpP Protease Funktion durch strukturelle Studien und Mutationsanalysen zu erhalten. Auf Basis der gewonnenen Ergebnisse und der Literaturlauswertung soll der Mechanismus für die Funktionsweise von ClpP auf molekularer Ebene näher charakterisiert werden, der einen Zusammenhang zwischen Aktivität und Oligomerisierung beschreibt.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

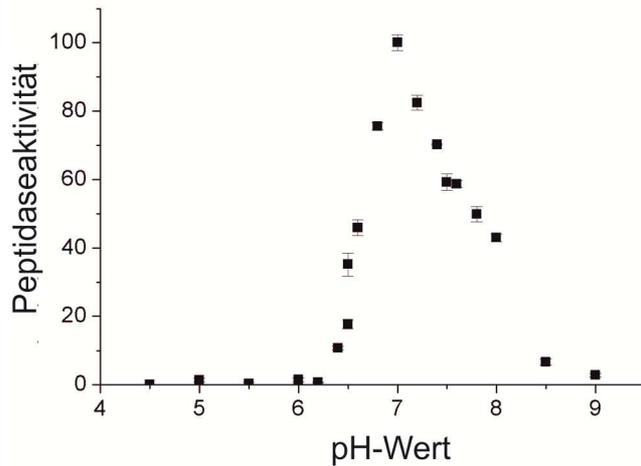
In Kooperation mit Malte Gersch aus der Gruppe von Prof. Dr. S. Sieber wurde zur heterologen Expression von *SaClpP* in *E. coli* ein pDest 007-Vektor verwendet. Das klonierte Konstrukt umfasst 203 Aminosäuren, wobei die letzten acht einen C-terminalen Strep-II-Tag bilden (WSHPQFEK). Das verwendete Aufreinigungsprotokoll orientierte sich an den Angaben in Maurizi *et al.* 1994<sup>[106]</sup>, und sah eine PEI-Fällung und eine Salzgradientensäule vor. Die direkte Aufreinigung der abzentrifugierten cytosolischen Fraktionen des Lysats über eine Strep-Säule ergab hinreichend sauberes Protein für Kristallisationsexperimente. Es konnten durchschnittlich 10 mg hochreines Protein pro L Kultur erhalten werden.

Es gelang, die von Böttcher und Geiger<sup>[107]</sup> gefundenen Kristallisationsbedingungen von *SaClpP* zu reproduzieren (50 mM Natriumacetat pH 4.5, 2.2 M Ammoniumsulfat). Die Kristalle zeigten eine hexagonale Form, wuchsen innerhalb von einer Woche auf die Größe von 0.8 mm und beugten mit einer Auflösung von 2.2 Å am Synchrotron im Paul-Scherrer Institut in Villigen.

Daraufhin wurde eine große Anzahl an Kristallisationsbedingungen im 0.1 µL-Maßstab getestet, um eine Kristallisationsbedingung mit pH innerhalb des Aktivitätsbereichs (pH = 6.4- 8.5) von ClpP zu finden. Stäbchenförmige, polarisierende Kristalle wurden bei 0.16 M Natriumcacodylat pH 7.0, 20 mM Magnesiumacetat und 30% MPD erhalten. Davon wurde ein Kristall mit einer Auflösung von 2.3 Å vermessen und die Kristallstruktur gelöst.

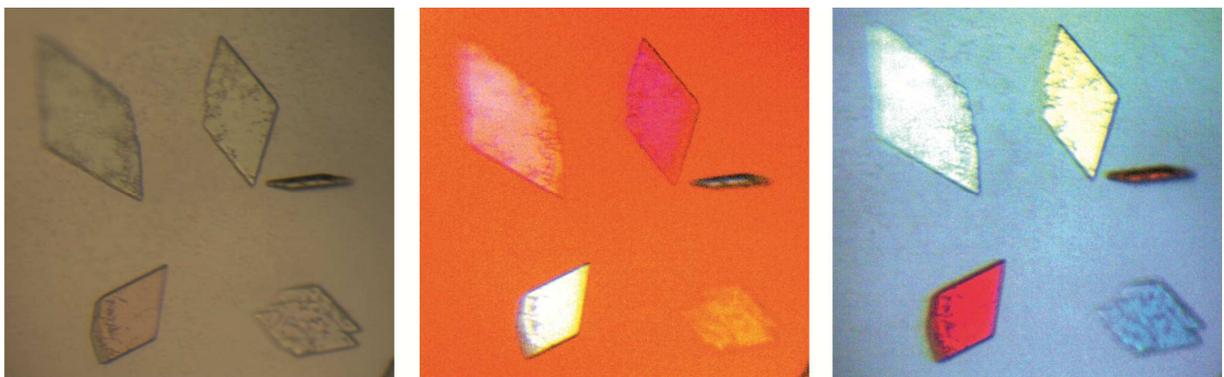
#### 3.1 *SaClpP* Kristallstruktur in aktiver Konformation

Um zu beweisen, dass die abgeknickte Helix von *SaClpP* ein Konformationszustand ist und nicht nur eine Spezies-spezifische Faltung, wurde nach der *SaClpP* Kristallstruktur in der aktiven, ausgestreckten Konformation gesucht. Kristalle der inaktiven, abgeknickten Konformation wurden zunächst ausschließlich bei niedrigem pH von 4.5 erhalten, so dass im folgendem in Kooperation mit Malte Gersch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Sieber das pH Aktivitätsprofil von *SaClpP* untersucht wurde um den physiologischen proteolytischen Bereich der Protease festzustellen (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19:** pH-Profil der Peptidase-Aktivität von ClpP, durch Assay mit fluoreszierendem Substrat gemessen

Der Aktivitätsassay erfolgte mit fluorogenem Substrat, in dem ein AMC-konjugiertes Peptid durch eine Protease in ein 7-Amino-4-Methylcoumarin geschnitten wird. Der Anstieg wurde durch Spektroskopie quantifiziert. *SaClpP* besitzt die höchste Aktivität bei pH 7.0 und halbmaximale Aktivität zwischen pH 6.5 und 8.0 (siehe Abbildung 19). Deswegen wurde sich auf Kristallisations-Bedingungen innerhalb dieses Bereichs konzentriert um Kristallansätzen für die aktive und möglicherweise ausgestreckte Konformation zu finden.



**Abbildung 20** Kristalle von *SaClpP*

Kristalle (siehe Abbildung 20) konnten nun ebenfalls bei pH 7.0 erhalten werden, die auf 2.3 Å Auflösung gebeugt haben. Die Struktur wurde mit der Molekularer-Ersatz-Methode gelöst, bei der die Koordinaten der abgeknickten Konformation von *SaClpP* als Startmodell benutzt wurden.<sup>[107]</sup> Die Koordinaten erfüllen alle geometrischen Anforderungen (siehe Tabelle 10). Die Struktur zeigt zwei aufeinanderliegende Ringe mit der charakteristischen

Topologie von ClpP mit einer zylindrischen Form. Die Reste der katalytischen Triade (Ser<sup>98</sup>, His<sup>123</sup>, Asp<sup>172</sup>) sind in allen 14 Untereinheiten in der aktiven Konformation angeordnet und durch zwei ausgebildete Wasserstoffbrücken stabilisiert (siehe Abbildung 21a, d). Die ersten 16 N-terminalen Aminosäuren, die die axialen Loops bilden, konnten nicht positioniert werden. Die hohe konformative Flexibilität in diesem Bereich wurde bereits bei einer Reihe anderer ClpP-Strukturen festgestellt<sup>[95]</sup>. Die Handle-Domäne ist in der Elektronendichte gut definiert und verbindet die zwei heptameren Ringe. Vergleicht man diese Struktur mit der Struktur von Böttcher und Geiger bei pH 4.5 zeigen beide Strukturen einen hohen Grad an Übereinstimmung im Kopfbereich. Sie unterscheiden sich jedoch in der Anordnung der Handle-Domäne. Während bei pH 4.5 die  $\alpha$ E-Helix abgelenkt vorliegt, wodurch die katalytische Triade nicht aktiv angeordnet ist, zeigt die Struktur bei pH 7.0 eine ausgestreckte  $\alpha$ E-Helix und die katalytische Triade befindet sich in einer aktiven Konformation. Durch die Rotation des Serin-Sauerstoffs lässt sich diese aktive katalytische Anordnung erreichen. Der ClpP-Zylinder hat eine Höhe von 9.5 nm Höhe und einen Durchmesser von 10.5 nm. Die axialen Porenöffnungen auf beiden Seiten sind gut zu erkennen. Durch die ausgestreckte Handle-Region wird der Zugang zur inneren Kammer an den Seiten geschlossen. Der Zusammenhalt zweier gegenüberliegender Monomere wird durch ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt bestimmt (siehe Abbildung 21).<sup>[101]</sup>

**Tabelle 10:** Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung der Wildtyp-Struktur von SaClpP und der Mutantenstruktur S98A

	SaClpP wt	SaClpP S98A
<u>Kristallparameter</u>		
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	P1
Zellparameter	a = 117 Å, b = 95 Å, c = 139 Å, β = 98°	a = 97.55 Å, b = 109.73 Å, c = 171.41 Å, β = 79°, γ = 71°
Moleküle in AE <sup>a</sup>	1	2
<u>Datensammlung</u>		
Vorbelichtung	nein	nein
Beamline	SLS, X06DA	SLS, X06DA
Wellenlänge (Å)	1.0	1.0
Auflösungsbereich (Å) <sup>b</sup>	40-2.3 (2.4-2.3)	20-2.8 (2.9-2.8)
Anzahl an Einzelreflexen <sup>c</sup>	129058	150830
Vollständigkeit (%) <sup>b</sup>	96.1 (98.6)	95.6 (96.5)
R <sub>merge</sub> (%) <sup>b, d</sup>	6.5 (51.0)	9.1 (39.3)
I/σ (I) <sup>b</sup>	11.21 (2.23)	5.55 (1.67)
<u>Verfeinerung (REFMAC5)</u>		
Auflösungsbereich (Å)	15-2.3	15-2.8
Anzahl an Atomen		
Protein	19908	39789
Wasser	1119	676
R <sub>work</sub> / R <sub>free</sub> (%) <sup>e</sup>	20.1/ 23.1	21.6/ 24.0
RMS Abweichung <sup>f</sup>		
Bindungslänge (Å)	0.005	0.012
Bindungswinkel (°)	0.860	1.357
Durchschnittlicher B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	48.154	86.52
Ramachandran Plot (%) <sup>g</sup>	98.7/ 1.3/ 0.0	97.8/ 2.2/ 0.0
PDB Code	3V5E	3V5I

<sup>a</sup> Asymmetrische Einheit.

<sup>b</sup> Die Werte in Klammern bei Vollständigkeit, R<sub>merge</sub> und I/σ (I) entsprechen der letzten Auflösungsschale.

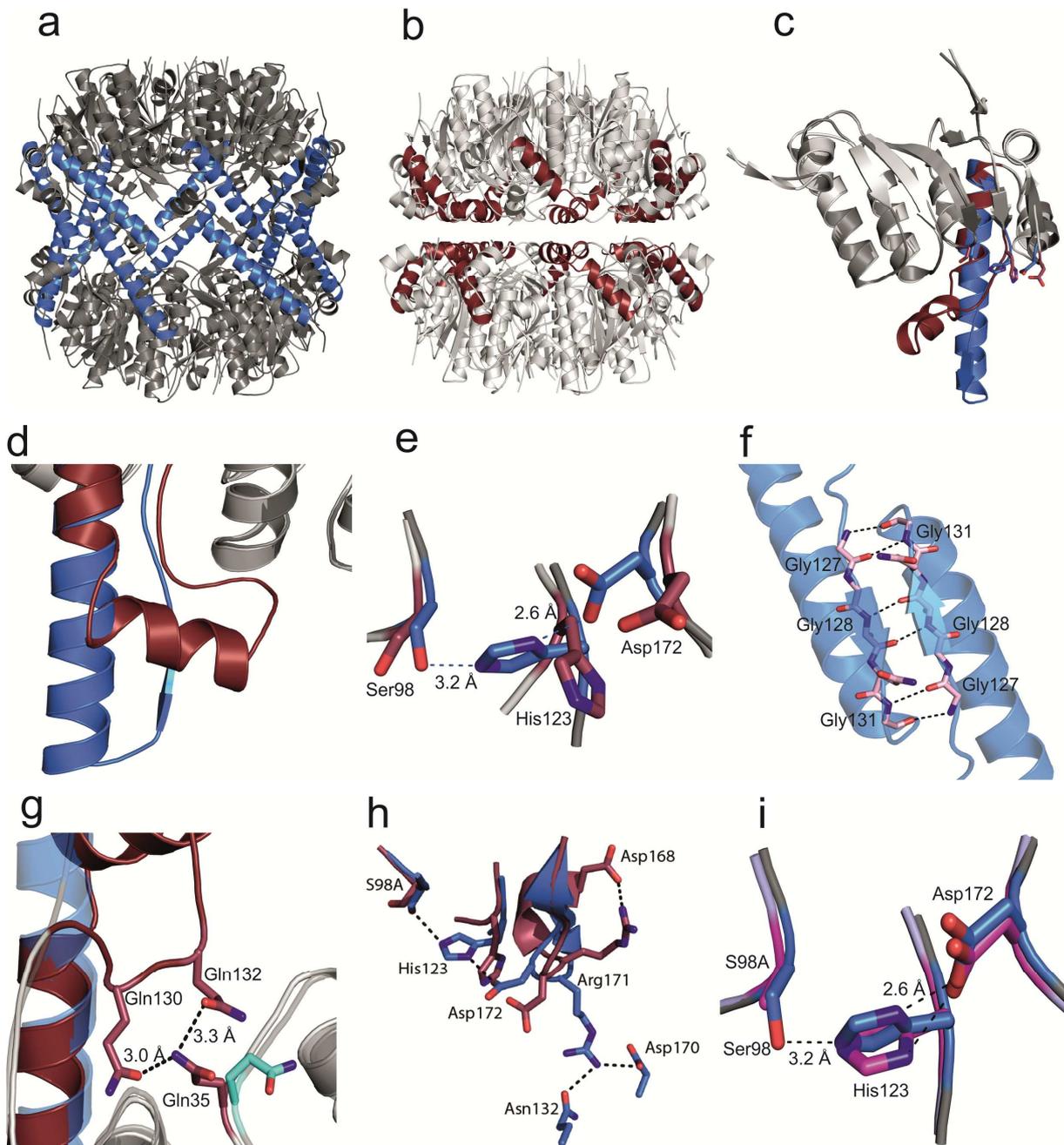
<sup>c</sup> Friedel Paare wurden als identische Reflexe behandelt.

<sup>d</sup>  $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - I(\text{hkl})|}{[\sum_{\text{hkl}} I_{\text{hkl}}]}$ , wobei I(hkl)<sub>j</sub> die j-ste Messung der Intensität der Reflexe hkl ist und <I(hkl)> Durchschnittsintensität ist.

<sup>e</sup>  $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} | |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| |}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$ , wobei R<sub>free</sub> ohne Sigma Cutoff für zufällig ausgewählte 5 % der Reflexe, die nicht in die Struktur-Verfeinerung einbezogen wurden. R<sub>work</sub> wird von den verbleibenden Reflexen berechnet.

<sup>f</sup> Abweichung von den idealen Bindungslängen und Bindungswinkeln.

<sup>g</sup> Anzahl der Aminosäurereste in favorisierten Regionen/ erlaubten Regionen/ verbotenen Regionen

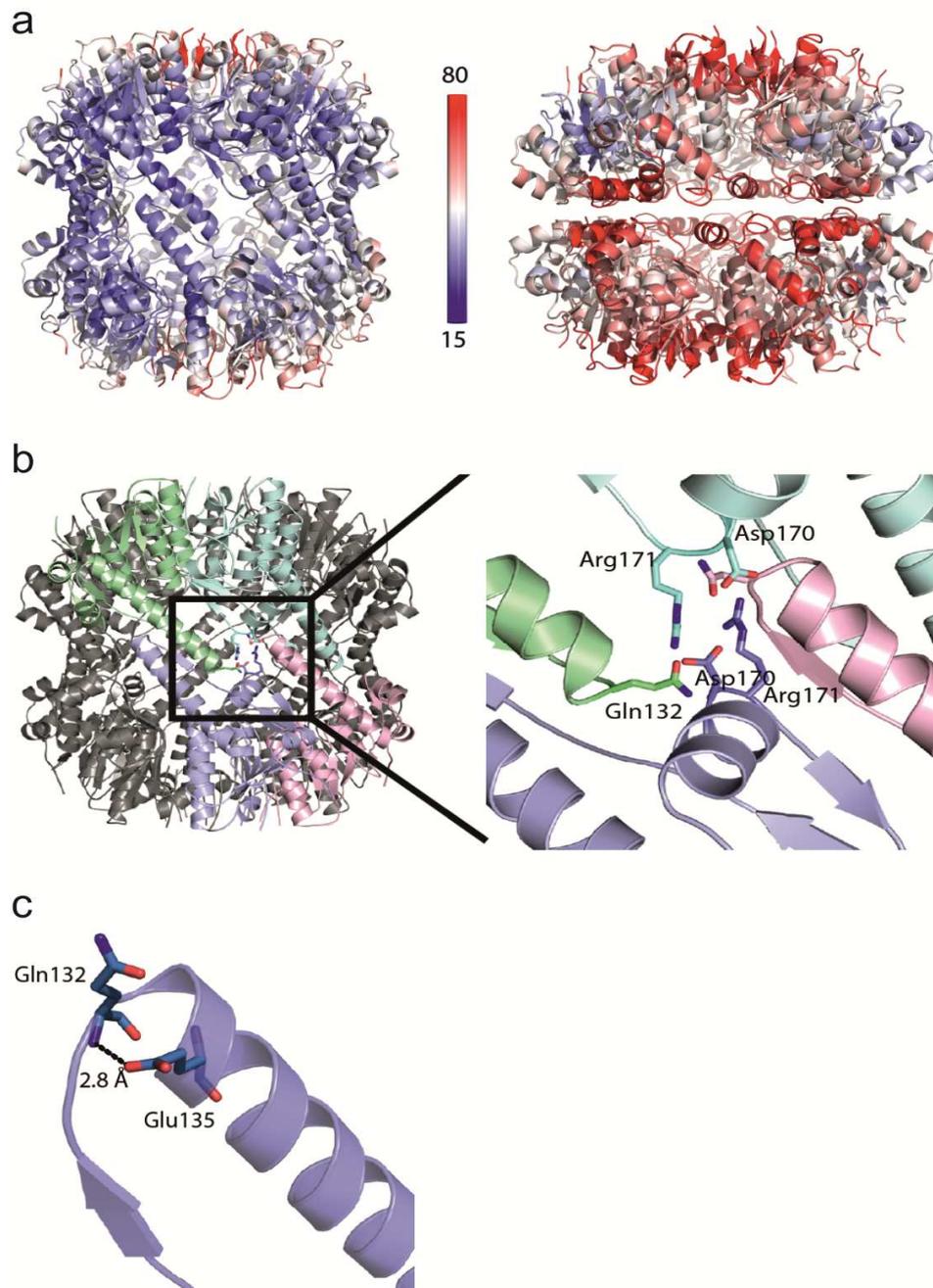


**Abbildung 21:** Struktur von *SaClpP*. **a)** *SaClpP* Tetradecamer in seiner aktiven, gestreckten Konformation; Aminosäurereste der Handle-Domäne sind in blau dargestellt. **b)** Kürzlich entdeckte *SaClpP* Struktur in ihrer inaktiven, abgeknickten Konformation; Aminosäurereste der Handle-Domäne sind in rot gezeichnet.<sup>[4]</sup> **c, d)** Überlagerung der verschiedenen Monomere (gestreckte und abgeknickte Konformation). **e)** Überlagerung der aktiven Zentren der inaktiven und aktiven Konformation. **f)** Interaktion zwischen zwei Handle-Domänen von Untereinheiten auf verschiedenen Ringen. **g)** Die abgeknickte Konformation ist über Wechselwirkungen zwischen Gln<sup>130</sup> und Gln<sup>132</sup> der Handle Domäne und Gln<sup>35</sup> der Kopfdomäne stabilisiert. **h)** Auswirkung der Konformation von Arg<sup>171</sup> der beiden Konformationen auf die Orientierung des aktiven Zentrums. **i)** Überlagerung des aktiven Zentrums der aktiven, gestreckten Wildtyp-Konformation und der S98A Mutante.

Durch die Kristallstruktur von *S. aureus* mit aktiver Konformation können die zwei Zustände der ClpP Protease innerhalb einer Spezies verglichen werden (siehe Abbildung 21 a-e). Die jeweilige Kopfdomänen (Reste 17-122 und 146-192) überlagern nahezu perfekt mit einer mittleren quadratischen Standardabweichung (*root mean square deviation*, RMSD) von 0.3 Å. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Zuständen besteht in der Handle-Domäne. Strukturelle Unterschiede entstehen durch die Carbonylgruppe des Ile<sup>122</sup>, welches in entgegengesetzte Richtungen zeigt. Diese Orientierungsveränderung induziert gleichzeitig eine neue Konformationen des His<sup>123</sup> des aktiven Zentrums. Die nachfolgenden Reste Gln<sup>124</sup> und Gln<sup>132</sup> der Handle-Domäne zeigen aus der Kopfdomäne heraus und bilden ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt. In diesem Motiv stehen drei hoch konservierte Glycine (Gly<sup>127</sup>, Gly<sup>128</sup>, Gly<sup>131</sup>) im Kontakt mit den entsprechenden Resten des Monomers vom anderen Ring (siehe Abbildung 21f). Die Reste Ala<sup>133</sup> bis Lys<sup>145</sup> bilden eine  $\alpha$ -Helix, die den Proteinstrang zurück zur Kopfdomäne führt. Die Atome des Rückgrats von Thr<sup>146</sup> in beiden Zuständen sind gut aligniert. In der abgeknickten Konformation bricht die Helix genau an diesem Punkt ab und die Aminosäure-Reste His<sup>123</sup> und Glu<sup>135</sup> sind über einen Loop verbunden. Diese Faltung ist durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk stabilisiert, das die konservierten Reste Gln<sup>130</sup> und Gln<sup>132</sup> des Loops und das nicht konservierte Gln<sup>35</sup> der Kopfdomäne beinhaltet (siehe Abbildung 21g). Ein Vergleich des aktiven Zentrums von beiden Konformationen sieht man in Abbildung 21e. Im ausgestreckten Zustand ist der Abstand zwischen den Ser<sup>98</sup>O <sup>$\gamma$</sup>  und dem His<sup>123</sup>N <sup>$\epsilon$</sup>  des aktiven Zentrums 3.2 Å und zwischen His<sup>123</sup>N <sup>$\delta$</sup>  und dem Carbonyl Sauerstoff von Asp<sup>172</sup> 2.6 Å, was beweist, dass aktivierende Wasserstoffbrücken zwischen diesen Resten existieren. Dagegen ist im abgeknickten Zustand Asp<sup>172</sup>, aufgrund der drastisch veränderten Position der Seitenkette von Arg<sup>171</sup>, nach außen orientiert und daher an der Ausbildung der Wasserstoffbrücken nicht beteiligt (siehe Abbildung 21h). Der Imidazol Ring von His<sup>123</sup> ist gleichzeitig rotiert und um ~3.5 Å verschoben.

Um herauszufinden, ob diese Konformationen aufgrund der unterschiedlichen Position von Arg<sup>171</sup> entsteht und nicht durch die veränderte Position von Ser<sup>98</sup> im aktiven Zentrum, wurde die Mutante S98A kristallisiert und eine Kristallstruktur mit 2.8 Å und R<sub>free</sub> = 24.0% erhalten. Die Wildtyp- und S98A-Mutanten-Strukturen zeigen keinen signifikanten Unterschied und können mit einem RMSD von 0.2 Å überlagert werden (siehe Abbildung 21i). Interessanterweise nimmt His<sup>123</sup> die gleiche Position in beiden Strukturen ein, was beweist, dass die Ausbildung des aktiven Zentrums unabhängig vom Serin als Wasserstoffdonor passiert und somit von der Konformation des Arg<sup>171</sup> abhängt.

Ein Vergleich der kristallographischen B-Faktoren, die die strukturelle Flexibilität beschreiben, zeigt, dass die N-terminalen Loops (Rest 1-20), sowie die benachbarten Loops an der Spitze des Zylinders (Rest 55-60) in allen Strukturen sehr flexibel sind (siehe Abbildung 22a). Interessanterweise ist die Kopfdomäne des abgeknickten Zustands, bei der His<sup>142</sup> eine alternative Konformation zeigt, am Ring-Ring-Kontakt flexibel, wohingegen die entsprechenden Reste im ausgestreckten Zustand starr sind. Die sehr verschiedenen B-Faktoren sind eine Eigenschaft der beiden Konformationen und entstehen nicht durch die unterschiedliche Kristallpackung. Der Effekt ist genauso für Reste der Helixspitze bis hin zur Kammer des abgeknickten Zustands zu sehen, wo die Kristallpackung keinen Einfluss hat.



**Abbildung 22:** **a)** B-Faktoren der Hauptketten der beiden Konformationen sind als Cartoon dargestellt. **b)** Vier Untereinheiten von zwei Ringen sind über Wasserstoffbrücken zwischen Gln<sup>132</sup>, Asp<sup>170</sup> und Arg<sup>171</sup> verlinkt. **c)** Die Spitze der ausgestreckten E Helix ist über die Wechselwirkung zwischen Glu<sup>135</sup> und Gln<sup>132</sup> stabilisiert.

### 3.2 Das Salzbrücken Netzwerk von Asp<sup>170</sup>, Arg<sup>171</sup> und Gln<sup>132</sup>

Das Salzbrücken Netzwerk von Asp<sup>170</sup>, Arg<sup>171</sup> und Gln<sup>132</sup> zwischen den Ringen ist für die Tetradecamer-Bildung und die Aktivität essentiell. Im ausgestreckten Zustand sind die zwei heptameren Ringe durch zwei verschiedene Interaktionen verknüpft. Die erste Interaktion ist die Bildung eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts zwischen den Kopfdomänen beider Monomere von unterschiedlichen Ringen. Die zweite Interaktion entsteht durch die Bindung von Arg<sup>171</sup> des einen Monomers an Asp<sup>170</sup> des anderen Rings über ein Salzbrücken-Netzwerk (siehe Abbildung 22b). Das zweite Stickstoffatom der Guanidiniumgruppe von Arg<sup>171</sup> bindet an Gln<sup>132</sup> des vor ihm liegenden Monomers. Arg<sup>171</sup> verlinkt dabei drei verschiedene Untereinheiten und beide Ringe. Im abgeknicktem Zustand nimmt Arg<sup>171</sup> eine andere Konformation ein, bei der es eine Wasserstoffbrücke mit dem konserviertem Glu<sup>168</sup> der gleichen Untereinheit bildet (siehe Abbildung 21h). Asp<sup>170</sup> ist nach innen gedreht und bildet eine Wechselwirkung mit Arg<sup>147</sup>. Im Wesentlichen existieren mehrere Interaktionen zwischen den Untereinheiten im gestreckten Zustand, die dabei die Seitenwände des Zylinders verschließen und die es im abgeknickten Zustand nicht gibt.

### 3.3 Mutationsstudien in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Sieber

Die Mutationsstudien wurden von Malte Gersch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Sieber durchgeführt und analysiert. Mutanten wurden von ihm synthetisiert und charakterisiert.

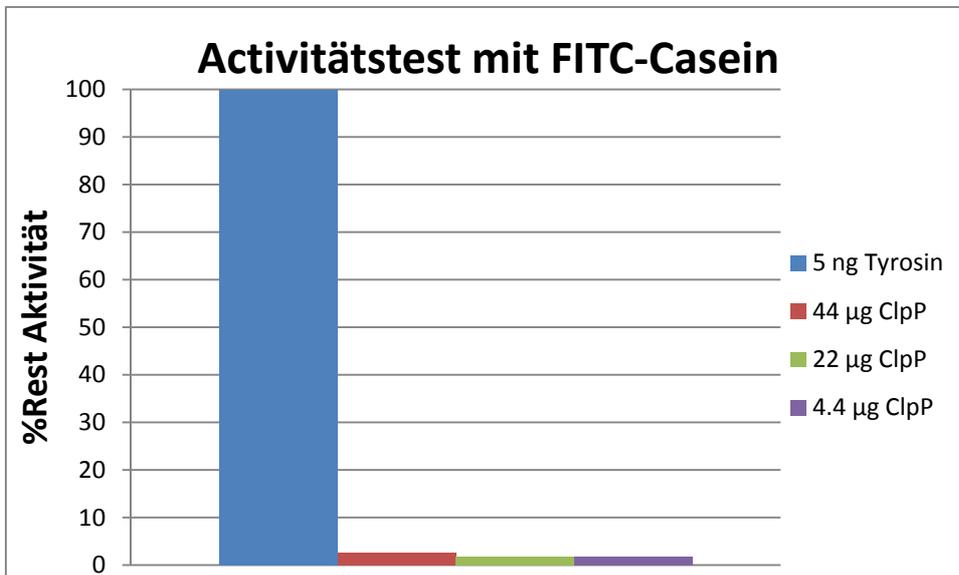
Um die Mitwirkung verschiedener Reste an der strukturellen Organisation von ClpP zu entschlüsseln, wurden Gln<sup>132</sup>, Asp<sup>170</sup> und Arg<sup>171</sup> jeweils zu Alanin mutiert. Außerdem wurde Arg<sup>171</sup> zu Lysin ersetzt um herauszufinden, ob ein Akzeptor zum Erfüllen der Aufgabe ausreicht oder ob es speziell Arginin sein muss. Zuerst wurde die Gesamtstruktur der mutierten Proteine durch CD-Spektroskopie untersucht, die nur kleinere Veränderungen zeigte. Als nächstes wurde der Oligomerisierungsstatus der mutierten Proteine durch Größenausschluss-Chromatographie sowie durch statische Lichtstreuung analysiert. Während D170A, R171A und R171K als Heptamere eluieren (siehe Tabelle 11), zeigt Q132A ein Gemisch aus Heptamer und einem geringeren Anteil Tetradecamer. Daraufhin wurde untersucht, ob der Übergang vom Tetradecamer zum Heptamer durch Temperaturveränderung induziert werden kann. Proteinschmelzkurven wurden anhand des hydrophoben Reporter-Farbstoffs SYPRO Orange gemessen. Das Wildtyp-Protein wird bei einer Schmelztemperatur

von  $58.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$  entfaltet, welche ähnlich zu den Werten der mutierten Proteine (D170A,  $60.8 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ; R171A,  $58.5 \pm 0.4^\circ\text{C}$ ; R171K,  $58.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$ ) ist. Weil es keinen zweiten Entfaltungszustand bei niedrigeren Temperaturen für die heptameren Mutanten gibt, sondern nur beim Wildtyp Protein, kann davon ausgegangen werden, dass die komplette Entfaltung des Wildtyp Proteins nicht über ein heptameres Intermediat geschieht.

**Tabelle 11:** Analyse des Oligomerisierungs-Zustands der ClpP Mutanten. Molekulare Masse wurde über die Retentionszeit der kalibrierten Größenaustausch-Chromatographie-Säule und über statistische Lichtstreuung berechnet. Die Peakfläche wurde über die Integration der UV-Absorption bei 280 nm bestimmt. Die erwartete molekulare Masse eines Tetramers ist 316 kDa.

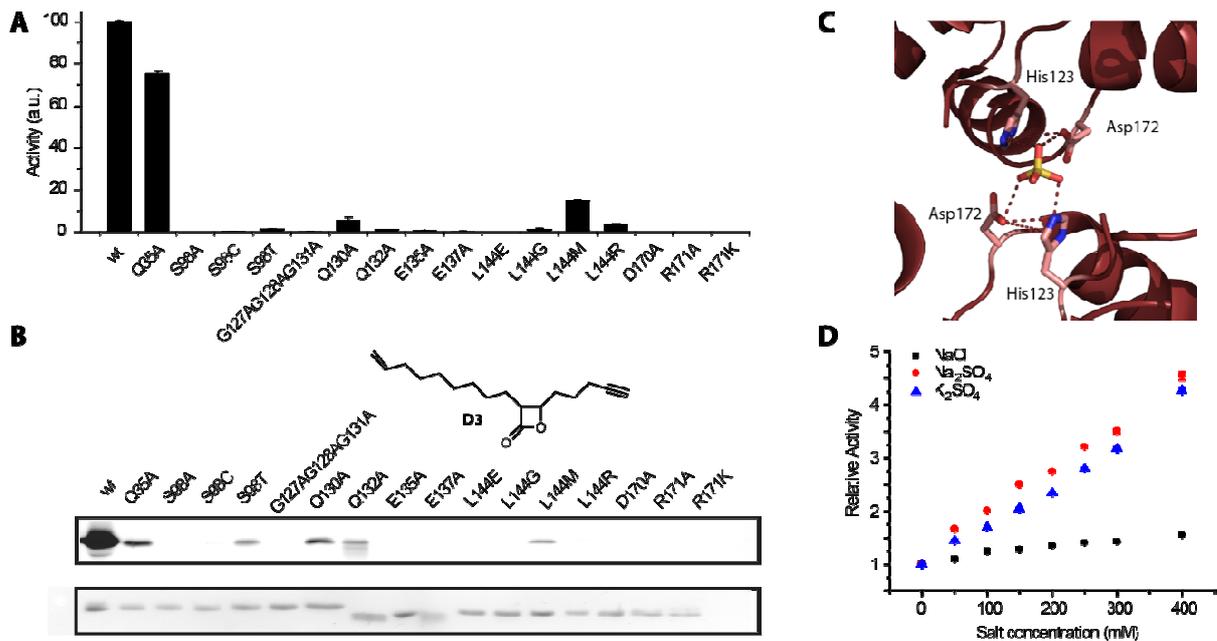
Protein	MW in kDa (SEC)	MW in kDa (SLS)	Peakfläche	Oligomerisierungszustand
<b>Wildtyp</b>	290	304	100%	Tetradecamer
<b>Q35A</b>	303	304	88%	Tetradecamer
	69	50	12%	Dimer?
<b>S98A</b>	302	325	100%	Tetradecamer
<b>S98C</b>	308	319	100%	Tetradecamer
<b>S98T</b>	317	nicht gemacht	35%	Tetradecamer
	173	nicht gemacht	65%	Heptamer
<b>G127AG128AG131A</b>	295	287	20%	Tetradecamer
	170	167	80%	Heptamer
<b>Q130A</b>	273	260	5%	Tetradecamer
	176	185	95%	Heptamer
<b>Q132A</b>	283	316	7%	Tetradecamer
	82	63	93%	Trimer?
<b>E135A</b>	148	176	100%	Heptamer
<b>E135R</b>	281	317	100%	Tetradecamer
<b>E137A</b>	289	292	100%	Tetradecamer
<b>L144E</b>	168	142	47%	Heptamer
	68	22	53%	Monomer
<b>L144G</b>	164	131	75%	Heptamer
	109	84	25%	Tetramer?
<b>L144M</b>	300	316	100%	Tetradecamer
<b>L144R</b>	260	319	100%	Tetradecamer
<b>D170A</b>	170	163	100%	Heptamer
<b>R171A</b>	168	151	100%	Heptamer
<b>R171K</b>	162	146	100%	Heptamer

Im Gegensatz zu *EcClpP* zerschneidet *SaClpP* keine Voll-Längenproteine wie Casein, was in einem FITC-Casein Assay gezeigt wurde (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Protease-Aktivitätstest von *SaClpP* mit FITC-Casein als Substrat. Die Reaktion wurde nach 24 h durch die Zugabe von 0.6 M TCA gestoppt und anschließend die Fluoreszenz gemessen.

Deswegen wurde die Peptidase Aktivität von allen Mutanten bezüglich der Wildtyp-Aktivität mithilfe eines fluoreszierenden Substrat Assays gemessen. D170A, R171A und R171K sind inaktiv, wohingegen Q132A eine stark reduzierte Aktivität besitzt (siehe Abbildung 24a).



**Abbildung 24:** a) Peptidase Aktivität von allen Mutanten gegenüber dem Wildtyp-Protein. b) SaClpP-spezifische Aktivität – basierend auf dem ClpP-Inhibitor Lacton D3. Fluoreszenz Gel (*oben*) - alle Mutantenproteinen wurden mit D3 inkubiert und anschließend mit Rhodaminazid über Click-Chemie markiert. (*unten*) Die Beladungskontrolle wurde mit Coomassie-Färbung gemessen. c) Zoom-in der Kontaktfläche der inneren Ringe der abgeknickten Konformation mit einem Sulfation im aktiven Zentrum<sup>[108]</sup>. d) Kinetische Studien mit dem fluoreszierendem Substrat Assay, die eine lineare Zunahme der Aktivität zeigen, wenn Natrium- oder Kalium-Sulfat zugefügt werden.<sup>[101]</sup>

Um das aktive Zentrum genauer zu untersuchen, wurde der ClpP-spezifische Lacton-Inhibitor D3 genutzt.<sup>[104]</sup> Das elektrophile  $\beta$ -Lacton wird durch das Serin des aktiven Zentrums nukleophil angegriffen, was zu einer Ringöffnung des  $\beta$ -Lactons und zu einer kovalenten Modifikation des Serins führt. Das rekombinante Protein wurde mit dem Ligand D3 zusammengegeben, eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann einen fluoreszierenden Farbstoff über eine Alkyne Behandlung und Click Chemie an den Liganden D3 angehängt (siehe Abbildung 24b). Die freie Verbindung D3 wurde vom markiertem Protein über SDS-PAGE abgetrennt und das Gel auf Fluoreszenz geprüft (siehe Abbildung 24b). D170A, R171A und R171K zeigen kein Fluoreszenz-Signal, was den Ergebnissen aus dem Assay mit fluoreszierendem Substrat entspricht. Die fehlende Aktivität dieser Mutanten kann durch Fehlbildung des aktiven Zentrums erklärt werden, wodurch der nukleophile Angriff des Serins verhindert wird. Q132A zeigt im Vergleich dazu eine schwache Bande, was mit seiner reduzierten Peptidase Aktivität übereinstimmt.

Außerdem wurde untersucht, ob die Mutation von dem S98 zu einem Threonin oder Cystein trotzdem noch zu einem nukleophil aktiven Tetradecamer führt. Die S98C Mutante ist inaktiv, was wahrscheinlich an der Größe des Schwefelatoms liegt. Die S98T Mutante wurde einerseits von D3 acyliert, andererseits war sie aber auch inaktiv im Aktivitätsassay mit dem fluoreszierenden Substrat. Das könnte an der zusätzlichen Methylgruppe liegen, die das Enzym-Acyl-Intermediat abschirmt, wodurch die Freisetzung des Produkts verhindert wird.

Der Kontaktfläche zwischen den Ringen des abgeknickten Zustands fehlen, im Gegensatz zum ausgestreckten Zustand, spezifische Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der „loop-groove“-Region, wodurch sich die Frage stellt, wie die Heptamere zusammengehalten werden. Deswegen wurden die Kontaktflächen der beiden Konformationen mit dem PDBePISA Webserver von EMBL-EBI untersucht.<sup>[109]</sup> Die freie Dissoziationsenergie ( $\Delta G^{\text{diss}}$ ) des Tetradecamers der ausgestreckten Konformation ist 81.8 kcal/mol und die des Heptamers 44 kcal/mol. Wie erwartet ist  $\Delta G^{\text{diss}}$  der abgeknickten Konformation viel niedriger (54.3 kcal/mol), wohingegen  $\Delta G^{\text{diss}}$  des Heptamers mit 106 kcal/mol stabiler ist.

Die Betrachtung der Kontaktfläche einer vor kurzen veröffentlichten abgeknickten *SaClpP* Struktur<sup>[105a]</sup> zeigte, dass die Ringe durch zwei Sulfat Ionen verbunden sind, die Wasserstoffbrücken zu den Resten His<sup>123</sup> und Asp<sup>172</sup> des aktiven Zentrums ausbilden (siehe Abbildung 24c). Da die Kristallbedingung in molarer Konzentration Ammoniumsulfat enthält, ist dieser Befund zu erwarten. Es wurde aber zugleich eine höhere Peptidase-Aktivität durch das Sulfation beobachtet.<sup>[105a]</sup> Daher wurde der Einfluss von verschiedenen Kationen und Anionen (200mM), wie von Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Nitrat, Chlorid, Bromid, Hydrogencarbonat, Hydrogenphosphat und Sulfat, auf die Peptidase-Aktivität untersucht. Die meisten Salze zeigen keinerlei Einfluss auf die Aktivität, wohingegen Natriumsulfat die Reaktionsgeschwindigkeit beschleunigte. Es wurde ein Konzentrations-abhängiger, linearer Anstieg der Peptidase-Aktivität bis zu 480 mM Salzkonzentration, der eine 4-fach höhere Aktivität bewirkt, beobachtet. Mit Kaliumsulfat wird der gleiche Effekt erzielt, wohingegen Natriumchlorid keinen Einfluss auf die Aktivität besitzt, was beweist, dass Sulfat das ausschlaggebende Ion für den Anstieg der Aktivität ist. Weiterhin konnte bewiesen werden, dass beide negativen Ladungen des Sulfations nötig sind, weil neutrale oder einfach geladene Analoga, wie Methansulfonamid oder Methansulfonat, keine Auswirkung auf die Enzymaktivität haben.

### 3.4 Konformationelle Änderung induziert durch Struktur-basierte Mutagenese

Eine weitere Fragestellung behandelte, ob beide Konformationen relevant für den katalytischen Zyklus sind. Basierend auf den strukturellen Unterschieden wurden neue Mutanten von Malte Gersch entworfen. Der Carbonylsauerstoff der Seitenkette von Glu<sup>135</sup>, der an der Spitze der E-Helix lokalisiert ist, bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Stickstoff des Rückgrats von Gln<sup>132</sup>, das den Loop am Anfang der E-Helix stabilisiert (siehe Abbildung 22c). Daher führt die Mutation von Glu<sup>135</sup> zu Alanin zu einer inaktiven Mutanten, die ein Hexamer bildet, was durch Größenaustausch-Chromatographie und statistischer Lichtstreuung gezeigt wurde (siehe Tabelle 11). Auch die Mutation von Leu<sup>144</sup> zu Aspartat bewirkt eine Dissoziation in inaktive Heptamere und kleinere Oligomere, da keine Wechselwirkungen mehr zwischen Leu<sup>144</sup> und Glu<sup>137</sup> ausgebildet werden können. Leu<sup>144</sup> stabilisiert den abgeknickten und somit heptameren Zustand. Eine Mutation von Leu<sup>144</sup> zu hydrophoben Methionin führt zu einem partiell aktiven Enzym<sup>[107]</sup>, wohingegen die L144R-Mutante überraschenderweise ein stabiles, aktives Tetradecamer bildet. Durch weitere Mutationsstudien (E137A, L144G, Q130A) wurde zum einen gezeigt, dass Glu<sup>137</sup> die abgeknickte Konformation durch eine Interaktion mit dem Stickstoff der Hauptkette von Thr<sup>143</sup> und Ser<sup>70</sup> stabilisiert. Zum anderen ist die Mutante L144G nicht aktiv und bildet Heptamere in Kombination mit kleineren Oligomerisierungs-Zuständen. E137A ist zwar ein stabiles Tetradecamer, das aber komplett inaktiv ist. Q130A bildet zu 95% Heptamere und zu einem kleinen Prozentsatz Tetradecamere, mit geringer Aktivität. Wenn alle drei Glycine 127, 128 und 131, die das antiparallele  $\beta$ -Faltblatt in der ausgestreckten Konformation zusammenhalten, mutiert werden, kommt es zur Dissoziation in Heptamere (80%) und es wurde keine Aktivität festgestellt, was auf die fehlende Bildung des  $\beta$ -Faltblatts zurückzuführen ist. Die Mutation von Gln<sup>35</sup> zu Alanin reduziert nur leicht die Protease-Aktivität, obwohl Gln<sup>35</sup> eigentlich an der Stabilisierung der abgeknickten Konformation durch Wechselwirkungen mit Gln<sup>130</sup> und Gln<sup>132</sup>, wie oben beschrieben, beteiligt ist.

Um weitere Einblicke in diese unerwarteten Ergebnisse zu bekommen, wurden die Schmelzpunkte der Mutanten bestimmt. Die meisten Proteine hatten ähnliche Schmelztemperaturen wie das Wildtyp-Protein. Q132A und E137A besitzen aber eine Schmelztemperatur, die in etwa 13°C unter der des Wildtyps liegt ( $44.6 \pm 1.1^\circ\text{C}$  und  $45.1 \pm 0.8^\circ\text{C}$ ; siehe Tabelle 12). Die Instabilität der Q132A-Mutante kann auf die wichtige

Rolle von Gln<sup>132</sup> im Kontakt zwischen den Ringen zurückgeführt werden, wohingegen bei E137A keine Information dafür bekannt sind.

**Tabelle 12:** Schmelztemperaturen des Wildtyps und der Mutanten-Proteine

<b>SaClpP Protein</b>	<b>Schmelztemperatur<sup>a</sup></b>
Wildtyp	(47.3 ± 0.8°C) 58.2 ± 0.3°C
Q35A	58.1 ± 0.3°C
S98A	nicht gemacht
S98C	61.3 ± 1.0°C
S98T	nicht gemacht
G127AG128AG131A	60.6 ± 0.3°C
Q130A	63.3 ± 0.3°C
Q132A	44.6 ± 1.1°C
E135A	62.1 ± 0.3°C
E137A	45.1 ± 0.8°C
L144E	(44.3 ± 0.6°C) 58.8 ± 0.3°C
L144G	(45.3 ± 0.8°C) 56.6 ± 0.3°C
L144M	(46.4 ± 1.5°C) 56.3 ± 0.9°C
L144R	72.3 ± 0.6°C
D170A	(56.0 ± 0.7°C) 60.8 ± 0.5°C
R171A	58.5 ± 0.4°C
R171K	58.9 ± 0.3°C

### 3.5 Physiologische Relevanz verschiedener Konformation von SaClpP

ClpP ist ein vielversprechendes Target für die Prävention und für neue Therapiemöglichkeiten von bakteriellen Infektionen und Malaria.<sup>[110]</sup> Ein grundlegendes Verständnis des molekularen Mechanismus kann daher den Weg für die Entwicklung von neuen und selektiven Inhibitoren oder Aktivatoren ebnet.<sup>[100a, 104, 111]</sup> Eine Schlüsselfunktion von ClpP ist die hohe Flexibilität in der Handle-Domäne, die zwischen den beiden heptameren Ringen liegt. Basierend auf dem Vergleich von ausgestreckter und abgeknickter Konformation, sowie der S98A-Mutantenstruktur konnten weitere Mutationen eingeführt werden, die Aufschluss über die Konformationsänderung und die Ring-Ring-Interaktion geben konnten. Eine detaillierte Charakterisierung dieser Mutantenproteine erlaubte die Entwicklung eines Modells auf

struktureller Basis, welches die Oligomerisierung mit der strukturellen Integrität des aktiven Zentrums und der enzymatische Aktivität verbindet.

In Übereinstimmung mit bisherigen Beobachtungen<sup>[98, 105a]</sup> wurde ein Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen Arg<sup>171</sup>, Asp<sup>170</sup> und Gln<sup>132</sup> gefunden, das die zwei heptameren Ringe miteinander verknüpft. Zum ersten Mal gelang eine übergreifende Mutationsanalyse von allen Aminosäure-Resten, die an dem Kontakt zwischen den Ringen beteiligt sind.<sup>[101]</sup> Die Mutationen von Arg<sup>171</sup> und Asp<sup>170</sup> zu Alanin bewirken die Dissoziation des Tetradecamers in Heptamere. Im Fall der Gln<sup>132</sup>-Mutation dissoziiert der Proteinkomplex in kleiner Oligomere mit einem kleinen Prozentsatz an Tetradecamere, aufgrund seiner Beteiligung an der Interaktion zwischen den Ringen. Die Aktivität der mutierten Proteine wurde mittels eines Fluoreszenz-Assays gemessen. Alle Mutanten waren inaktiv bis auf Q132A, was eine grundlegende Aktivität, wegen dem geringen Prozentsatz an Tetradecameren, zeigte. Die strukturelle Integrität des aktiven Zentrums wurde mit einem ClpP-spezifischen,  $\beta$ -Lacton-Inhibitor untersucht, das keine Markierung für die Mutanten R171A, R171K und D170A sowie eine schwache Markierung für Q132A zeigte. Die Auswertung all dieser Daten weist stark darauf hin, dass eine Tetradecameren-Bildung nötig ist, damit sich die Reste des aktiven Zentrums so anordnen, dass ClpP aktiv ist (siehe Tabelle 11 und Abbildung 21h).<sup>[101]</sup>

Weiterhin wurde entdeckt, dass Asp<sup>170</sup> und Arg<sup>171</sup> eine zentrale Rolle bei der Bildung des Oligomers spielen. Hierbei bewirkt die Bindung von Arg<sup>171</sup> des einen Heptamers an Asp<sup>170</sup> des anderen Heptamers den Übergang der abgeknickten in die gestreckte Konformation. Das hat direkte Auswirkungen auf das nahegelegene Asp<sup>172</sup> des aktiven Zentrums. Die Rotation um 90° und die Verschiebung der Seitenkette von Asp<sup>172</sup> um 3 Å initiiert, dass His<sup>123</sup> im aktiven Zentrum eine Wasserstoffbrücke mit Asp<sup>172</sup> und Ser<sup>98</sup> erzeugt, wodurch eine katalytisch aktive Triade entsteht. Die Kristallstruktur der S98A-Mutante in gestreckter Form zeigt, dass His<sup>123</sup> die gleiche Konformation wie in der Wildtyp-Struktur einnimmt. Somit ist die Bildung des aktiven Zentrums unabhängig von der Eigenschaft des Serins als Wasserstoffbrücken-Donor.

Trotzdem ist die Tetradecameren-Bildung nicht ausreichend für die Aktivität von ClpP, was durch die Mutanten E137A und G127A/G128A/G131A gezeigt wurde. Die Bindung der beiden heptameren Ringe löst die Bildung eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts der zwei Handle-Domänen aus, was wiederum zur Entspannung der E-Helix führt. Genau diese Bewegung ermöglicht dem His<sup>123</sup> seine aktive Konformation einzunehmen. Ein Fehlen dieser Helix oder

der  $\beta$ -Faltblatt Konformation bewirkt den kompletten Verlust der Aktivität, aufgrund der falschen Orientierung der Reste im aktiven Zentrum. Das gleiche gilt für die Zerstörung der Interaktion zwischen Gln<sup>132</sup> und Arg<sup>171</sup>.

Die Ladungswechselwirkungen zwischen der abgeknickten Helix und der Handle-Domäne, welche in der Mutanten Q35A verhindert wurden, sind nicht entscheidend für die Aktivität. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Analyse der strukturellen B-Faktoren, die eine hohe Flexibilität der abgeknickten Handle-Domäne zeigen. Zusammengefasst ist somit die Scharnierbewegung der Handle-Domäne von der ausgestreckten Konformation in die abgeknickten Konformation essentiell für die ClpP Funktion. Daraus lassen sich jedoch keine Schlussfolgerungen über die Bedeutung des abgeknickten Zustands für den katalytischen Zyklus treffen.

Basierend auf den hier gezeigten Struktur- und Mutations-Daten, wird vermutet, dass nur Tetradecamere die aktive Konformation bilden können. Die richtige Orientierung des aktiven Zentrums unter physiologischen Bedingungen kann ausschließlich durch Wechselwirkungen zwischen den Handle-Domänen von unterschiedlichen Heptameren erreicht werden. Diese Annahme wird durch weitere Studien an ClpP aus anderen Organismen unterstützt. Menschliches ClpP bildet proteolytisch inaktive Heptamere in Lösung, die durch Bindung von Chaperonen dimerisieren.<sup>[105b]</sup> Auch das Heterooligomer ClpP aus *Listeria monocytogenes* besitzt ausschließlich als Tetradecamer Aktivität.<sup>[85]</sup> Folglich ist der Grund für die Inaktivität der Glu<sup>135</sup> und Leu<sup>144</sup> Mutanten nicht die verhinderte Produktfreisetzung, sondern die Hemmung der Oligomerisierung, wie es kürzlich publiziert wurde.<sup>[112]</sup>

Interessanterweise bildet ClpP bei nicht-physiologischen, hohen Sulfat-Konzentrationen Heptamere und zeigt gleichzeitig höhere katalytische Aktivität.<sup>[101]</sup> Dabei halten zwei Sulfationen die zwei heptameren Ringe in der abgeknickten Konformation durch Interaktionen mit den Resten des aktiven Zentrums zusammen. Daraus lässt sich schließen, dass die abgeknickte Konformation in Lösung Heptamere bildet und der Zusammenschluss von Tetradecameren ein kristallographisches Artefakt darstellt. Bei einer detaillierten Untersuchung der Kontaktflächen zwischen den Ringen im Heptamer wurden keine spezifischen Wechselwirkungen gefunden. Diese Folgerung wird durch Computer-Ergebnisse des PDBePISA Webservers unterstützt. Diese zeigen, dass Heptamere des abgeknickten Zustands stabiler sind als die in der gestreckten Konformation.

Die physiologische Relevanz der abgeknickten Konformation ist noch ungeklärt. Bisher konnte kein Beweis für diese strukturelle Anordnung in Lösung gefunden werden. Obwohl die Kristalle von *S. aureus* ClpP in der abgeknickten Konformation<sup>[4, 108]</sup> bei nicht-

physiologischem, niedrigen pH-Wert gewachsen sind, bei dem ClpP nicht aktiv ist, gibt es Hinweise auf physiologische Relevanz dieser Konformation. Erstens liefern quantitative NMR-Studien von Sprangers *et al.* überzeugende Beweise, das ClpP aus *E. coli* in Lösung zwei verschiedene Konformationen aufweist.<sup>[102]</sup> Durch Mutationsanalyse konnten die Reste, die an der Konformationsbewegung beteiligt sind, identifiziert werden. Sie befinden sich alle in der Handle-Domäne. Genau genommen in der Domäne, wo die Unterschiede der gestreckten und abgeknickten Kristallstruktur zu finden sind (siehe Abbildung 21). In dieser Untersuchung wurde kein Beweis für große, strukturelle Veränderungen in der Kopfdomäne gefunden, was mit den zwei Kristallstrukturen übereinstimmt. Zweitens konnte gezeigt werden, dass ClpP auch aktiv ist, wenn zwei Chaperone gebunden sind.<sup>[113]</sup> Das schließt die Peptidfreisetzung über die axialen Poren aus. Es wurde überdies gezeigt, dass ClpP Substrate fortsetzend schneidet<sup>[94]</sup>, was die Möglichkeit ausschließt, dass die Peptidfreisetzung über die Dissoziation der Chaperone geschieht. Daher ist die Schlussfolgerung, dass die Substratfreisetzung aus der geschlossenen Kammer über einen anderen Weg erfolgt. Im Wesentlichen wurde die Bildung der äquatorialen Pore vorgeschlagen, weil nur ein Konformationszustand nicht ausreichend ist um den katalytischen Mechanismus zu beschreiben. Drittens ist die abgeknickte Konformation definitiv weder auf ein speziesspezifisches Artefakt von *S. aureus* noch auf den niedrigen pH-Werte zurückzuführen. Es gibt ClpP-Strukturen in der abgeknickten Konformation von *M. tuberculosis* (pH = 8.0), *P. falciparum* (pH = 7.0) und *B. subtilis* (pH = 5.6) (siehe Tabelle 13) die diese charakteristische abgeknickte Konformation zeigen.<sup>[112, 114]</sup>

**Tabelle 13:** Vergleich der PDB-Einträge von ClpP-Strukturen<sup>[101]</sup>

Kode	Auflösung	Organismus	E-Helix	Barrel Höhe	Aktives Zentrum	Referenzen
<b>3KTG</b>	2.4 Å	<i>Bacillus subtilis</i>	aus-gestreckt	9 nm	aligniert	[100a]
<b>3Q7H</b>	2.5 Å	<i>Coxiella burnetii</i>	aus-gestreckt	9 nm	nicht aligniert	-
<b>1YG6</b>	1.9 Å	<i>Escherichia coli</i>	aus-gestreckt	9 nm	aligniert	[99]
<b>3P2L</b>	2.3 Å	<i>Francisella tularensis</i>	aus-gestreckt	9 nm	aligniert	-
<b>2ZL0</b>	2.6 Å	<i>Helicobacter pylori</i>	aus-gestreckt	9 nm	aligniert	[115]
<b>1TG6</b>	2.1 Å	<i>Homo sapiens</i>	aus-gestreckt	9 nm	aligniert	[105b]
<b>3V5E</b>	2.3 Å	<i>Staphylococcus aureus</i>	aus-gestreckt	9 nm	aligniert	diese Arbeit
<b>3QWD</b>	2.1 Å	<i>Staphylococcus aureus</i>	abgeknickt (H123-K145)	8 nm	nicht aligniert	[4]
<b>2CBY</b>	2.6 Å	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	nicht gelöst (P125-I136)	8 nm	nicht aligniert	[114b]
<b>2F6I</b>	2.5 Å	<i>Plasmodium falciparum</i>	nicht gelöst (P291-I304)	8 nm	nicht aligniert	[114a]
<b>1Y7O</b>	2.5 Å	<i>Streptococcus pneumonia</i> (A153P)	nicht gelöst (P123-A139)	8 nm	nicht aligniert	[98]

Ferner wurden Kristalle von *B. subtilis* sowohl in der abgeknickten als auch in der ausgestreckten Konformation in ein und derselben Kristallisationsbedingung gefunden.<sup>[112]</sup>

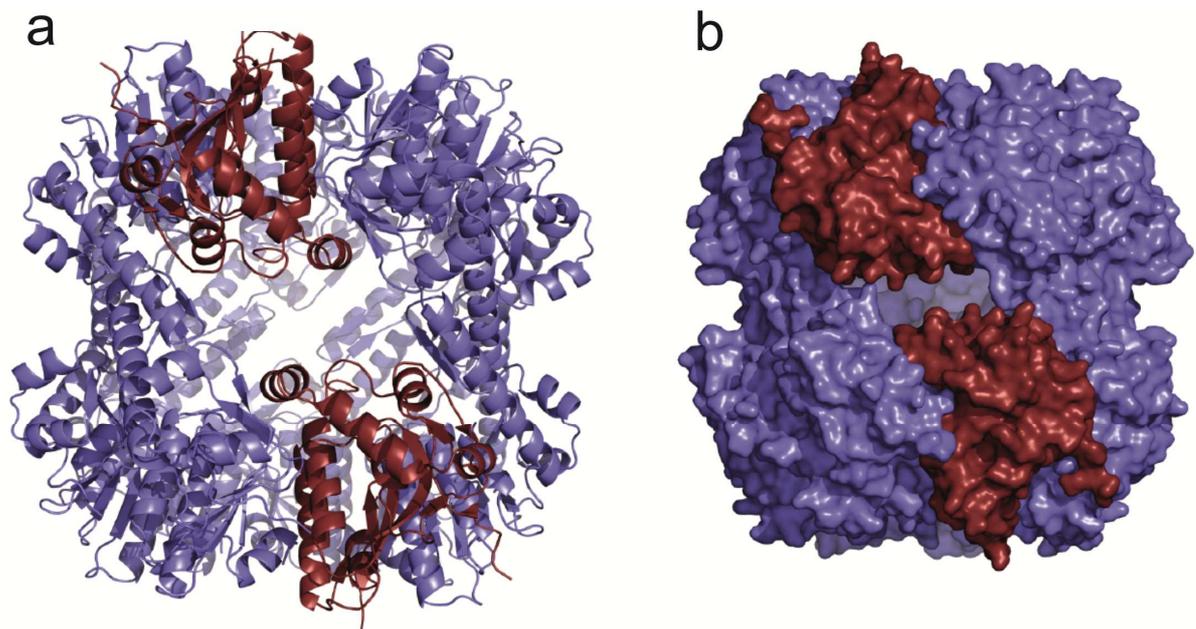
Dies deutet stark darauf hin, dass beide Konformationen in Lösung existieren. Ebenso resultiert das Einfrieren der ausgestreckten Konformation von *EcClpP* über eine künstlich eingeführte Disulfidbrücke<sup>[116]</sup> in katalytisch inaktiven Tetradecameren in der abgeknickte Konformation. Viertens liefert die Molekulare-Dynamik-Simulation<sup>[105a, 116]</sup> Hinweise auf Konformationsflexibilität der Handle-Domäne, was konsistent mit der strukturellen Änderung von der ausgestreckten in die abgeknickte Konformation ist.

Zusammengefasst weisen die hier vorgestellten Ergebnisse somit auf die physiologische Relevanz der abgeknickten Konformation hin. Ferner wurde diskutiert, das ein gemeinsames Umschalten aller 14 Untereinheiten von der ausgestreckten in die abgeknickte Konformation während der Substratprozessierung die Bildung einer äquatorialen Pore oder eine kurzlebigen Dissoziation in zwei Heptamere auslöst um die gebildeten Peptid-Produkte freizusetzen.<sup>[4, 102,</sup>

<sup>105a, 112]</sup> Dabei stützt sich diese Theorie der Porenbildung auf eine Struktur, bei der in genau

dieser Region mehrere Reste nicht gut definiert vorliegen.<sup>[112]</sup> Dieses Modell ist daher zweifelhaft und konnte auch nicht experimentell bewiesen werden.

Basierend auf die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse wurde ein Modell für die Produktfreisetzung entwickelt. Hierbei wird die Kopfdomäne von zwei interagierenden Untereinheiten von verschiedenen Ringen der ausgestreckten *SaClpP* Struktur durch Untereinheiten mit abgeknickter Helix ersetzt (siehe Abbildung 25). Man sieht nur einen minimalen Zusammenstoß der abgeknickten Helix mit Phe<sup>174</sup> der vorangehenden Untereinheit, der durch kleinere strukturelle Veränderungen umgangen werden kann.



**Abbildung 25:** a) Tetradecamerer Modell von *SaClpP*, das auf der ausgestreckten, aktiven Konformation basiert (blau), bei der aber zwei Untereinheiten durch Monomere mit inaktiver, abgeknickter Konformation (rot) ersetzt wurden. b) Oberflächen-Darstellung dieses Modells mit großer, äquatorialer Pore, die für die Freisetzung der Produkt-Peptide über kurzlebige Bewegung zuständig ist.

Es wurde bereits gezeigt, dass die ClpP-Protease Proteine zu kleineren Peptiden von 6-8 Aminosäuren abbaut.<sup>[94]</sup> Das Modell der schnellen Bewegung in der Kopfdomäne resultiert in großen, äquatorialen Poren von ca. 12 Å im Durchmesser, wodurch auch die Freisetzung von großen Peptidfragmenten gewährleistet wäre. Im Gegensatz dazu haben die Poren der abgeknickten Konformation nur einen Durchmesser von 3 Å. Die entstandenen Peptide innerhalb der Kammer würden die Konformationsänderung durch einen unbekanntem Mechanismus auslösen und dabei die Freisetzung aus der Protease bewirken.

Im Wesentlichen wurde gezeigt, dass die Aktivität der ClpP Protease streng durch strukturelle Umlagerung kontrolliert wird. Als erstes initiiert der Kontakt von zwei Heptameren die Bildung einer Wechselwirkung zwischen den beiden Ringen, die durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asp<sup>170</sup> und Arg<sup>171</sup> stabilisiert wird. Dadurch entsteht als nächstes eine Interaktion, die zu einer Konformationsänderung der Kopfdomäne führt, wodurch letztendlich die Konformation des aktiven katalytischen Zentrums eingenommen wird. Angesichts der hohen Unspezifität der Protease ist dieser stark kontrollierte Aktivierungsmechanismus biologisch sinnvoll. Die Aktivität ist nur in einem geordneten Zylinder vorhanden, was wiederum den unkontrollierten Zugang zum unspezifischem aktiven Zentrum der Protease verhindert. Für die menschliche ClpP Protease ist dies auch sinnvoll, denn wenn diese als Heptamer mit freiem Zugang zum aktiven Zentrum vorliegt, wäre sie inaktiv. Weitere Studien müssen sich mit der Frage beschäftigen, wie die Chaperone an die N-terminalen Loops binden und wie dadurch die Konformationsänderung und Bildung der aktiven Protease geschieht.

Mit den hier gewonnenen Ergebnissen konnten neue Einblicke in den molekularen Mechanismus der Clp Protease gewonnen werden, die zur Entwicklung von neuen Inhibitoren oder Aktivatoren genutzt werden können um so einen Schritt weiter im Kampf gegen Malaria und bakteriellen Infektionen voran zu kommen.

---

## **V Verzeichnisse**



## 1 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
A <sub>280</sub>	Absorption bei 280 nm
Amp	Ampicillindihydrat
amp <sup>f</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bicine	N,N-bis-(2-Hydroxyethyl)glycin
bidest.	bidestilliert
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celsius
ClpA	Caseinolytische Protease A
ClpP	Caseinolytische Protease P
ClpX	Caseinolytische Protease X
Cm	Chloramphenicol
cm <sup>f</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
Da	Dalton
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid
DTT	Dithiothreitol
<i>E.c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
GAP	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactose
kb	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Bertani
$\lambda$	lambda
m	milli
$\mu$	micro
M	molar
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionisation
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
n	nano
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
Ni	Nickel
nm	nano Meter
NMR	nuclear magnetic resonance
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data bank
PEG	Polyethylene glycol
pH	potentia hydrogenii
RE	Rohextrakt
RNA	ribonucleic acid
rmsd	root mean square deviation
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. a.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SLS	Swiss Light Source
SOC	super optimal broth mit Glucose

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
UV	Ultraviolett
VIS	Sichtbares Licht (engl visible)

## 2 Literaturverzeichnis

- [1] J. Adams, V. J. Palombella, E. A. Sausville, J. Johnson, A. Destree, D. D. Lazarus, J. Maas, C. S. Pien, S. Prakash, P. J. Elliott, *Cancer Res* **1999**, *59*, 2615-2622.
- [2] aJ. Adams, *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 349-360; bD. J. Park, H. J. Lenz, *Ann Med* **2004**, *36*, 296-303; cS. Tsukamoto, H. Yokosawa, *Curr Med Chem* **2006**, *13*, 745-754.
- [3] A. Asai, T. Tsujita, S. V. Sharma, Y. Yamashita, S. Akinaga, M. Funakoshi, H. Kobayashi, T. Mizukami, *Biochem Pharmacol* **2004**, *67*, 227-234.
- [4] S. R. Geiger, Böttcher, T., Sieber, S.A., Cramer, P., *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50*, 5749-5752.
- [5] W. O. Bullock, J. M. Fernandez, J. M. Short, *Biotechniques* **1987**, *5*, 376.
- [6] G. Langer, S. X. Cohen, V. S. Lamzin, A. Perrakis, *Nat Protoc* **2008**, *3*, 1171-1179.
- [7] M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin, K. S. Wilson, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2011**, *67*, 235-242.
- [8] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66*, 486-501.
- [9] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read, *J Appl Crystallogr* **2007**, *40*, 658-674.
- [10] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, *Journal of applied crystallography* **1993**, *26*, 283-291.
- [11] V.r.p., *Schrödinger, LLC*.
- [12] A. A. Vagin, R. A. Steiner, A. A. Lebedev, L. Potterton, S. McNicholas, F. Long, G. N. Murshudov, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2184-2195.
- [13] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1997**, *53*, 240-255.
- [14] W. Kabsch, *J. Appl. Cryst.* **1993**, *26*, 795-800.
- [15] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1986**, *51 Pt 1*, 263-273.
- [16] W. J. Dower, J. F. Miller, C. W. Ragsdale, *Nucleic Acids Res* **1988**, *16*, 6127-6145.
- [17] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, *74*, 5463-5467.
- [18] J. W. E. F. Lottspeich, *Bioanalytik, Vol. 2*, Elsevier GmbH, München, **2006**.
- [19] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680-685.

- [20] A. McPherson, *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1999**.
- [21] M. Groll, R. Huber, *Methods Enzymol.* **2005**, *398*, 329-336.
- [22] M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, *386*, 463-471.
- [23] A. Brünger, P. Adams, G. Clore, W. DeLano, P. Gros, R. Grosse-Kunstleve, J. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. Pannu, R. Read, L. Rice, T. Simonson, G. Warren, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **1998**, *1*, 905-921.
- [24] A. T. Brunger, *Nature* **1992**, *355*, 472-475.
- [25] G. J. Kleywegt, T. A. Jones, *Structure* **1995**, *3*, 535-540.
- [26] D. Turk, *Thesis* **1992**, Technische Universitaet Muenchen.
- [27] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2126-2132.
- [28] R. W. Homer, J. Swanson, R. J. Jilek, T. Hurst, R. D. Clark, *J Chem Inf Model* **2008**, *48*, 2294-2307.
- [29] M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. W. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin, K. S. Wilson, *Acta Crystallographica Section D* **2011**, *67*, 235-242.
- [30] A. Brünger, *Yale University Press* **1992**, New Haven.
- [31] R. Esnouf, *J Mol Graph Model* **1997**, *15*, 112-113; 132-114.
- [32] P. J. Kraulis, , *Journal of Applied Crystallography* **1991** *24*, 946-950.
- [33] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu Rev Biochem* **1998**, *67*, 425-479.
- [34] P. Schreiner, X. Chen, K. Husnjak, L. Randles, N. Zhang, S. Elsassser, D. Finley, I. Dikic, K. J. Walters, M. Groll, *Nature* **2008**, *453*, 548-552.
- [35] D. Voges, P. Zwickl, W. Baumeister, *Annu Rev Biochem* **1999**, *68*, 1015-1068.
- [36] Y. A. Lam, W. Xu, G. N. DeMartino, R. E. Cohen, *Nature* **1997**, *385*, 737-740.
- [37] S. van Nocker, S. Sadis, D. M. Rubin, M. Glickman, H. Fu, O. Coux, I. Wefes, D. Finley, R. D. Vierstra, *Mol Cell Biol* **1996**, *16*, 6020-6028.
- [38] C. M. Pickart, *Annu Rev Biochem* **2001**, *70*, 503-533.
- [39] Y. A. Lam, G. N. DeMartino, C. M. Pickart, R. E. Cohen, *J Biol Chem* **1997**, *272*, 28438-28446.
- [40] D. Stock, L. Ditzel, W. Baumeister, R. Huber, J. Lowe, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1995**, *60*, 525-532.

- [41] E. Rousseau, R. Kojima, G. Hoffner, P. Djian, A. Bertolotti, *J Biol Chem* **2009**, *284*, 1917-1929.
- [42] aL. Borissenko, M. Groll, *Chem Rev* **2007**, *107*, 687-717; bY. A. Lam, C. M. Pickart, A. Alban, M. Landon, C. Jamieson, R. Ramage, R. J. Mayer, R. Layfield, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 9902-9906.
- [43] aJ. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, *268*, 533-539; bM. Unno, T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka, T. Tsukihara, *Structure* **2002**, *10*, 609-618.
- [44] L. Borissenko, M. Groll, *Biol Chem* **2007**, *388*, 947-955.
- [45] aM. H. Glickman, D. M. Rubin, O. Coux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, W. Baumeister, V. A. Fried, D. Finley, *Cell* **1998**, *94*, 615-623; bM. Sharon, T. Taverner, X. I. Ambroggio, R. J. Deshaies, C. V. Robinson, *PLoS Biol* **2006**, *4*, 1314-1323.
- [46] D. M. Rubin, M. H. Glickman, C. N. Larsen, S. Dhruvakumar, D. Finley, *Embo J* **1998**, *17*, 4909-4919.
- [47] K. Husnjak, S. Elsassner, N. Zhang, X. Chen, L. Randles, Y. Shi, K. Hofmann, K. J. Walters, D. Finley, I. Dikic, *Nature* **2008**, *453*, 481-488.
- [48] M. Bochtler, L. Ditzel, M. Groll, R. Huber, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 6070-6074.
- [49] N. Gallastegui, M. Groll, *Trends Biochem Sci* **2010**, *35*, 634-642.
- [50] aE. M. Huber, M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, C. J. Kirk, M. Groettrup, M. Groll, *Cell* **2012**, *148*, 727-738; bM. Unno, T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka, T. Tsukihara, *Structure* **2002**, *10(5)*, 609-618.
- [51] O. Coux, K. Tanaka, A. L. Goldberg, *Annu Rev Biochem* **1996**, *65*, 801-847.
- [52] M. Groll, M. Bochtler, H. Brandstetter, T. Clausen, R. Huber, *ChemBiochem* **2005**, *6*, 222-256.
- [53] M. Groll, M. Bajorek, A. Kohler, L. Moroder, D. M. Rubin, R. Huber, M. H. Glickman, D. Finley, *Nat Struct Biol* **2000**, *7*, 1062-1067.
- [54] E. Seemüller, A. Lupas, D. Stock, J. Löwe, R. Huber, W. Baumeister, *Science* **1995**, *268*, 579-582.
- [55] A. J. Marques, R. Palanimurugan, A. C. Matias, P. C. Ramos, R. J. Dohmen, *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 1509-1536.
- [56] M. Groll, N. Gallastegui, X. Marechal, V. Le Ravalec, N. Basse, N. Richey, E. Genin, R. Huber, L. Moroder, J. Vidal, M. Reboud-Ravaux, *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1701-1705.

- [57] M. Groll, W. Heinemeyer, S. Jager, T. Ullrich, M. Bochtler, D. H. Wolf, R. Huber, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 10976-10983.
- [58] N. Gallastegui, M. Groll, *Structure* **2009**, *17*, 1279-1281.
- [59] T. P. Dick, A. K. Nussbaum, M. Deeg, W. Heinemeyer, M. Groll, M. Schirle, W. Keilholz, S. Stevanovic, D. H. Wolf, R. Huber, H. G. Rammensee, H. Schild, *J Biol Chem* **1998**, *273*, 25637-25646.
- [60] S. Murata, K. Sasaki, T. Kishimoto, S. Niwa, H. Hayashi, Y. Takahama, K. Tanaka, *Science* **2007**, *316*, 1349-1353.
- [61] E. Seemüller, A. Lupas, F. Zuhl, P. Zwickl, W. Baumeister, *FEBS Lett* **1995**, *359*, 173-178.
- [62] A. Escherich, L. Ditzel, H. J. Musiol, M. Groll, R. Huber, L. Moroder, *Biol Chem* **1997**, *378*, 893-898.
- [63] aA. Vinitsky, C. Cardozo, L. Sepp-Lorenzino, C. Michaud, M. Orłowski, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 29860-29866; bA. Vinitsky, C. Michaud, J. C. Powers, M. Orłowski, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9421-9428.
- [64] M. Groll, C. R. Berkers, H. L. Ploegh, H. Ovaa, *Structure* **2006**, *14*, 451-456.
- [65] M. Boccadoro, G. Morgan, J. Cavenagh, *Cancer Cell Int* **2005**, *5*, 18.
- [66] M. Groll, R. Huber, B. C. Potts, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 5136-5141.
- [67] K. Wiberg, K. Carlson, A. Aleskog, R. Larsson, P. Nygren, E. Lindhagen, *Med Oncol* **2009**, *26*, 193-201.
- [68] R. Orłowski, *Expert Rev Anticancer Ther.* **2004**, *4*, 171-179.
- [69] A. M. Ruschak, M. Slassi, L. E. Kay, A. D. Schimmer, *J Natl Cancer Inst* **2011**, *103*, 1007-1017.
- [70] D. Chen, M. Frezza, S. Schmitt, J. Kanwar, Q. P. Dou, *Curr Cancer Drug Targets* **2011**, *11*, 239-253.
- [71] aE. P. Grant, M. T. Michalek, A. L. Goldberg, K. L. Rock, *J Immunol* **1995**, *155*, 3750-3758; bM. T. Michalek, E. P. Grant, C. Gramm, A. L. Goldberg, K. L. Rock, *Nature* **1993**, *363*, 552-554; cA. Hershko, *Curr Opin Cell Biol* **1997**, *9*, 788-799.
- [72] aM. Aki, N. Shimbara, M. Takashina, K. Akiyama, S. Kagawa, T. Tamura, N. Tanahashi, T. Yoshimura, K. Tanaka, A. Ichihara, *J Biochem (Tokyo)* **1994**, *115*, 257-269; bM. G. Brown, J. Driscoll, J. J. Monaco, *Nature* **1991**, *353*, 355-357; cR. Glynne, S. H. Powis, S. Beck, A. Kelly, L. A. Kerr, J. Trowsdale, *Nature* **1991**, *353*, 357-360; dA. Kelly, S. H. Powis, R. Glynne, E. Radley, S. Beck, J. Trowsdale, *Nature* **1991**,

- 353, 667-668; eM. Groettrup, R. Kraft, S. Kostka, S. Standera, R. Stohwasser, P. M. Kloetzel, *Eur J Immunol* **1996**, *26*, 863-869.
- [73] P. G. Richardson, C. Mitsiades, *Future Oncol* **2005**, *1*, 161-171.
- [74] A. M. Burger, A. K. Seth, *Eur J Cancer* **2004**, *40*, 2217-2229.
- [75] C. S. Mitsiades, N. Mitsiades, T. Hideshima, P. G. Richardson, K. C. Anderson, *Essays Biochem* **2005**, *41*, 205-218.
- [76] M. A. Grawert, N. Gallastegui, M. Stein, B. Schmidt, P. M. Kloetzel, R. Huber, M. Groll, *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50*, 542-544.
- [77] M. Groll, E. P. Balskus, E. N. Jacobsen, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 14981-14983.
- [78] L. R. Dick, A. A. Cruikshank, L. Grenier, F. D. Melandri, S. L. Nunes, R. L. Stein, *J Biol Chem* **1996**, *271*, 7273-7276.
- [79] M. Groll, R. Huber, *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1695*, 33-44.
- [80] aA. Armstrong, J. N. Scutt, *Chem Commun (Camb)* **2004**, 510-511; bA. Asai, A. Hasegawa, K. Ochiai, Y. Yamashita, T. Mizukami, *J Antibiot (Tokyo)* **2000**, *53*, 81-83.
- [81] M. Groll, O. V. Larionov, R. Huber, A. de Meijere, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 4576-4579.
- [82] D. Chauhan, T. Hideshima, K. C. Anderson, *Br J Cancer* **2006**, *95*, 961-965.
- [83] A. T. Brünger, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1993**, *49*, 24-36.
- [84] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 4686-4687.
- [85] E. Zeiler, N. Braun, T. Bottcher, A. Kastenmuller, S. Weinkauff, S. A. Sieber, *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50*, 11001-11004.
- [86] aV. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, *41*, 2596-2599; bC. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J Org Chem* **2002**, *67*, 3057-3064; cR. Huisgen, *1,3 Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Wiley, New York, **1984**.
- [87] F. J. Dekker, O. Rocks, N. Vartak, S. Menninger, C. Hedberg, R. Balamurugan, S. Wetzler, S. Renner, M. Gerauer, B. Scholermann, M. Rusch, J. W. Kramer, D. Rauh, G. W. Coates, L. Brunsveld, P. I. Bastiaens, H. Waldmann, *Nat Chem Biol* **2010**, *6*, 449-456.
- [88] Y. Kazuta, A. Matsuda, S. Shuto, *J Org Chem* **2002**, *67*, 1669-1677.
- [89] H. Bürgi, J. Dunitz, E. Shefter, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5065 - 5067.
- [90] V. S. Korotkov, A. Ludwig, O. V. Larionov, A. V. Lygin, M. Groll, A. de Meijere, *Org Biomol Chem* **2011**, *9*, 7791-7798.

- [91] R. Hendrix, *Z Orthop Unfall* **2010**, *148*, 126-127.
- [92] DGKH, *DGKH - Sektion Hygiene* **2009**, *07*, 1-14.
- [93] M. Gersch, Masterarbeit thesis, LMU München (München), **2010**.
- [94] L. D. Jennings, D. S. Lun, M. Medard, S. Licht, *Biochemistry* **2008**, *47*, 11536-11546.
- [95] A. Y. Yu, W. A. Houry, *FEBS Lett* **2007**, *581*, 3749-3757.
- [96] A. Szyk, M. R. Maurizi, *J Struct Biol* **2006**, *156*, 165-174.
- [97] B. G. Reid, W. A. Fenton, A. L. Horwich, E. U. Weber-Ban, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 3768-3772.
- [98] A. Gribun, M. S. Kimber, R. Ching, R. Sprangers, K. M. Fiebig, W. A. Houry, *J Biol Chem* **2005**, *280*, 16185-16196.
- [99] J. Wang, J. A. Hartling, J. M. Flanagan, *Cell* **1997**, *91*, 447-456.
- [100] aB. G. Lee, E. Y. Park, K. E. Lee, H. Jeon, K. H. Sung, H. Paulsen, H. Rubsamen-Schaeff, H. Brotz-Oesterhelt, H. K. Song, *Nat Struct Mol Biol* **2010**, *17*, 471-478; bM. El Bakkouri, A. Pow, A. Mulichak, K. L. Cheung, J. D. Artz, M. Amani, S. Fell, T. F. de Koning-Ward, C. D. Goodman, G. I. McFadden, J. Ortega, R. Hui, W. A. Houry, *J Mol Biol* **2010**, *404*, 456-477.
- [101] M. Gersch, A. List, M. Groll, S. A. Sieber, *J Biol Chem* **2012**, *287*, 9484-9494.
- [102] R. Sprangers, A. Gribun, P. M. Hwang, W. A. Houry, L. E. Kay, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 16678-16683.
- [103] H. Hof, Dörries, R., *Medizinische Mikrobiologie* **2009**, Stuttgart.
- [104] T. Bottcher, S. A. Sieber, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 14400-14401.
- [105] aJ. Zhang, F. Ye, L. Lan, H. Jiang, C. Luo, C. G. Yang, *J Biol Chem* **2011**, *286*, 37590-37601; bS. G. Kang, M. N. Dimitrova, J. Ortega, A. Ginsburg, M. R. Maurizi, *J Biol Chem* **2005**, *280*, 35424-35432.
- [106] M. R. Maurizi, M. W. Thompson, S. K. Singh, S. H. Kim, *Methods Enzymol* **1994**, *244*, 314-331.
- [107] S. R. Geiger, T. Bottcher, S. A. Sieber, P. Cramer, *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50*, 5749-5752.
- [108] J. Zhang, F. Ye, L. F. Lan, H. L. Jiang, C. Luo, C. G. Yang, *J Biol Chem* **2011**, *286*, 37590-37601.
- [109] E. Krissinel, K. Henrick, *J Mol Biol* **2007**, *372*, 774-797.
- [110] S. Rathore, D. Sinha, M. Asad, T. Bottcher, F. Afrin, V. S. Chauhan, D. Gupta, S. A. Sieber, A. Mohammed, *Mol Microbiol* **2010**.

- [111] H. Brotz-Oesterhelt, D. Beyer, H. P. Kroll, R. Endermann, C. Ladel, W. Schroeder, B. Hinzen, S. Raddatz, H. Paulsen, K. Henninger, J. E. Bandow, H. G. Sahl, H. Labischinski, *Nat Med* **2005**, *11*, 1082-1087.
- [112] B. G. Lee, M. K. Kim, H. K. Song, *Mol Cells* **2011**, *32*, 589-595.
- [113] J. Ortega, H. S. Lee, M. R. Maurizi, A. C. Steven, *J Struct Biol* **2004**, *146*, 217-226.
- [114] aM. Vedadi, J. Lew, J. Artz, M. Amani, Y. Zhao, A. Dong, G. A. Wasney, M. Gao, T. Hills, S. Brokx, W. Qiu, S. Sharma, A. Diassiti, Z. Alam, M. Melone, A. Mulichak, A. Wernimont, J. Bray, P. Loppnau, O. Plotnikova, K. Newberry, E. Sundararajan, S. Houston, J. Walker, W. Tempel, A. Bochkarev, I. Kozieradzki, A. Edwards, C. Arrowsmith, D. Roos, K. Kain, R. Hui, *Mol Biochem Parasitol* **2007**, *151*, 100-110; bH. Ingvarsson, M. J. Mate, M. Hogbom, D. Portnoi, N. Benaroudj, P. M. Alzari, M. Ortiz-Lombardia, T. Unge, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2007**, *63*, 249-259.
- [115] D. Y. Kim, K. K. Kim, *J Mol Biol* **2008**, *379*, 760-771.
- [116] M. S. Kimber, A. Y. Yu, M. Borg, E. Leung, H. S. Chan, W. A. Houry, *Structure* **2010**, *18*, 798-808.

### **3 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Anja List, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt. Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden in wissenschaftlichen Journalen veröffentlicht.

Anja List

Garching, \_\_\_\_\_