

Stabilisierung von Quartärstrukturen von Proteinen durch supramolekulare Liganden

Corrigendum zur Dissertation von Michael Alexander Kuszner

Institut für Organische Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

Essen 2018

S. 46

Die vermessenen Konzentrationen der Liganden **30** und **31** liegen bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

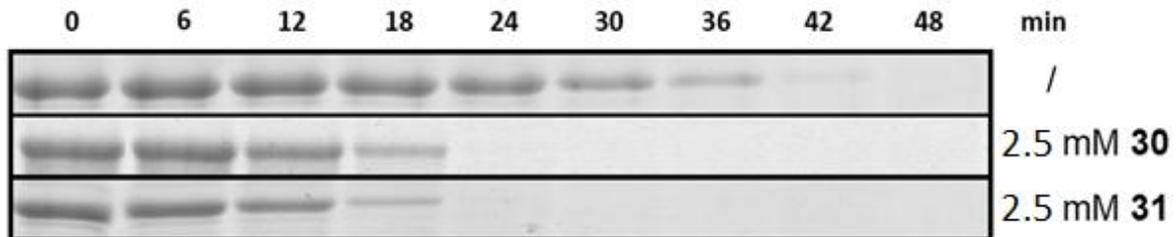


Abbildung 4.3: Vergleich von Mutante ohne Ligandenzugabe (oben) und mit Ligandenzugabe (mitte, unten) beim Verdau von β -Casein. Sowohl Verbindung **30** als auch **31** aktivieren die Mutante. Die Ergebnisse von Verbindung **32** sind nicht dargestellt.

S. 47

Die vermessene Konzentration des Liganden **31** liegt bei 0.63, 1.25, 1.88 und 2.5 mM statt bei 1, 2, 3 und 4 mM.

(...) Insgesamt zeigt Ligand **31** erst bei erhöhten Konzentrationen von bis zu 2.5 mM eine deutliche Aktivitätssteigerung der Mutante. (...)

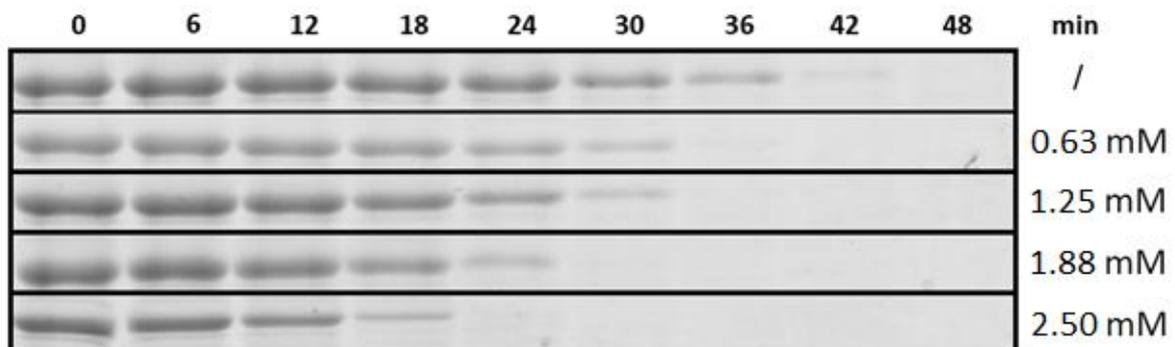


Abbildung 4.4: Vergleich von Mutante ohne Ligandenzugabe (oben) und mit Ligandenzugabe in unterschiedlichen Konzentrationen beim Verdau von β -Casein. Es ist eine deutliche proportionale Abhängigkeit der Aktivität mit steigender Konzentration von Verbindung **31** zu erkennen.

S. 53

Die vermessenen Konzentrationen der Liganden **37** und **48** liegen bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

(...) Für eine direkte Vergleichbarkeit mit Verbindung **31** wurden beide Liganden bei einer Konzentration von 2.5 mM vermessen. (...)

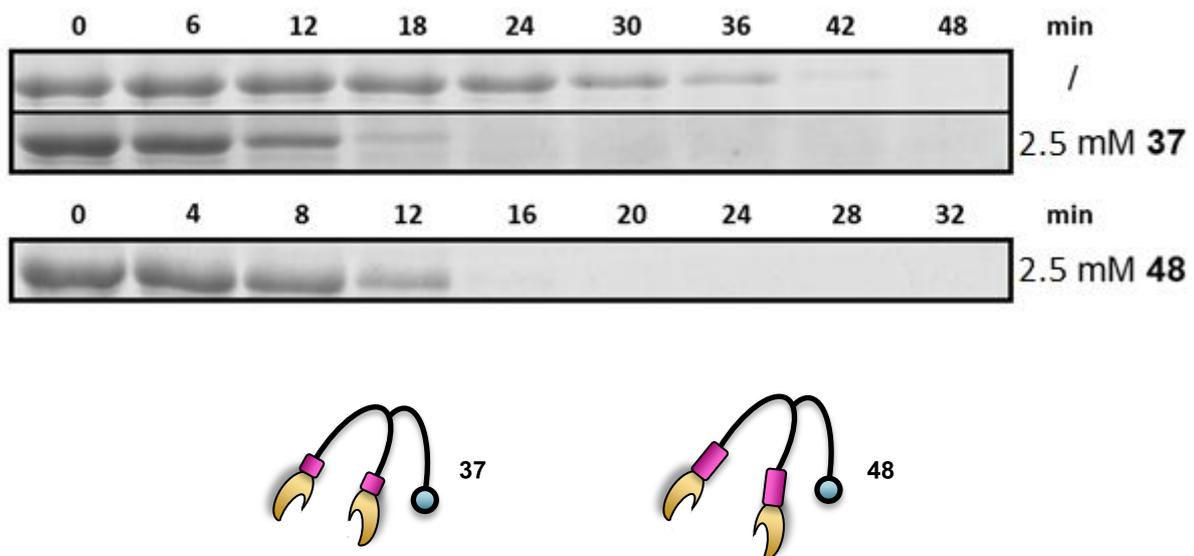


Abbildung 4.6: Vergleich von Mutante ohne Ligandenzugabe (oben), Mutante mit Zugabe von 2.5 mM Ligand **37** (mitte) und Mutante mit Zugabe von 4 mM Ligand **48** (unten) beim Verdau von β -Casein. Ligand **37** zeigt eine kleine Verbesserung der Aktivitätsrekonstruktion verglichen mit Ligand **31**. Bei Ligand **48** ist dieser Effekt noch stärker ausgeprägt.

S. 63

Die vermessene Konzentration des Liganden **51** liegt bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

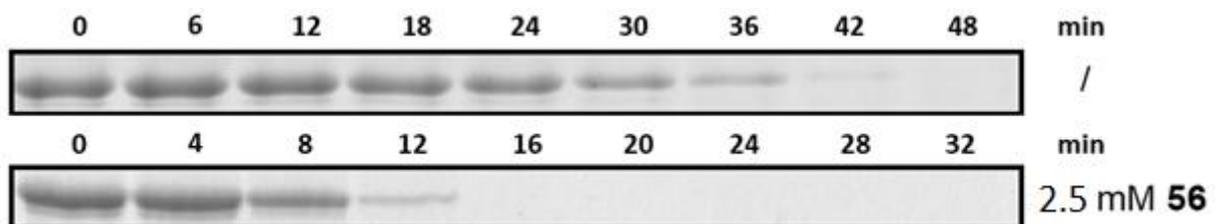


Abbildung 4.11: Vergleich von Mutante ohne Ligandenzugabe (oben) und Mutante mit Zugabe von 2.5 mM Ligand **56** (unten) beim Verdau von β -Casein. Ligand **56** zeigt eine kleine Verbesserung der Aktivitätsrekonstruktion verglichen mit den anderen Liganden.

S. 80

Die vermessenen Konzentrationen der Liganden **31**, **72**, **75** und **78** liegen bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

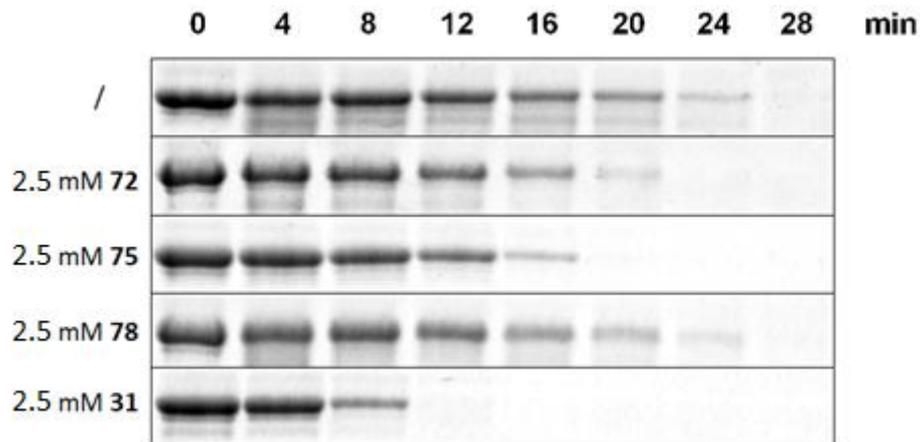


Abbildung 4.16: Vergleich von Mutante ohne Ligandenzugabe (oben) und Mutante mit Zugabe von je 2.5 mM Vergleichsligandligand beim Verdau von β -Casein. Während der Histidinligand **78** keine Aktivierung zeigt, zeigen Arginin **75** und Lysin **72** schwache Aktivierungen. Dabei ist der Effekt beim argininhaltigen Liganden stärker ausgeprägt. Ein Vergleich mit GCP-Ligand **31** unter denselben Bedingungen zeigt jedoch die deutliche Unterlegenheit der Naturanaloga gegenüber dem GCP-Motiv.

S. 81

Die vermessene Konzentration des Liganden **31** liegt bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

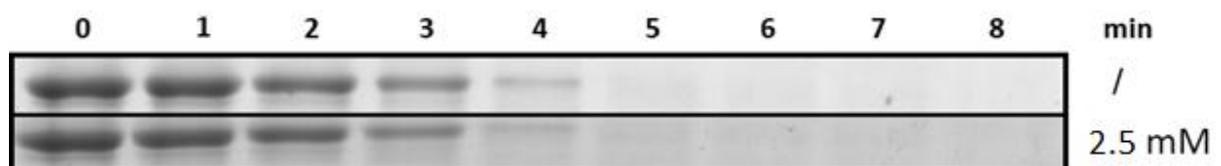
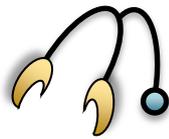


Abbildung 4.17: Vergleich von Wildtyp ohne Ligandenzugabe (oben) und Wildtyp mit Zugabe von 2.5 mM Ligand **31** beim Verdau von β -Casein. Eine Beeinträchtigung der Aktivität im Wildtyp durch den Liganden ist nicht zu beobachten.

S. 84

Die vermessenen Konzentrationen des Liganden **31** liegen bei 0.06, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 1.88 und 2.5 mM statt bei 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 und 4 mM.



31

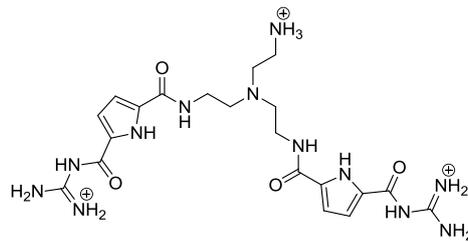
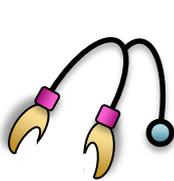
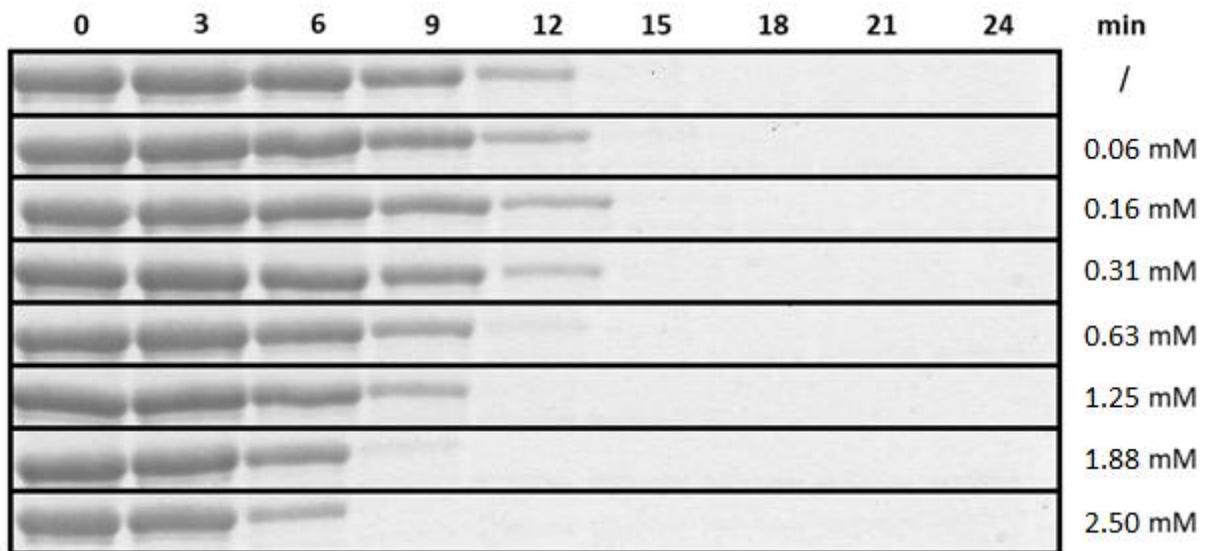


Abbildung 4.20: Vergleich von R166H-Mutante ohne Ligandenzugabe (oben) und R166H-Mutante mit Zugabe von fest definierten Konzentrationen der Verbindung **31** beim Verdau von β -Casein. Analog zur R274Q-Mutante ist eine Abhängigkeit der Aktivitätsrekonstruktion von der Konzentration zu verzeichnen. Unterschiede sind ab etwa 1.25 mM zu erkennen.

S. 88

Die vermessenen Konzentrationen des Liganden **37** liegen bei 0.06, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 1.88 und 2.5 mM statt bei 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 und 4 mM.



37

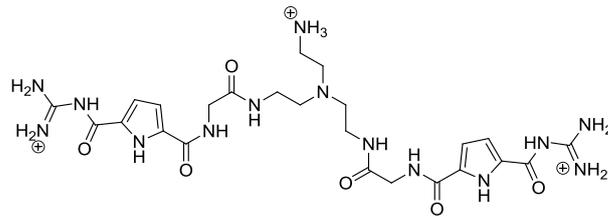


Abbildung 4.25: Vergleich von A173T-Mutante ohne Ligandenzugabe (oben) und A173T-Mutante mit Zugabe von fest definierten Konzentrationen der Verbindung **37** beim Verdau von β -Casein. Der Effekt der Aktivitätsrekonstruktion ist ein wenig stärker ausgeprägt als bei Verbindung **31**. Hier sind deutliche Unterschiede bereits ab 1.25 mM zu erkennen.

S. 90

Die vermessenen Konzentrationen des Liganden **31** liegen bei 0.06, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 1.88 und 2.5 mM statt bei 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 und 4 mM.

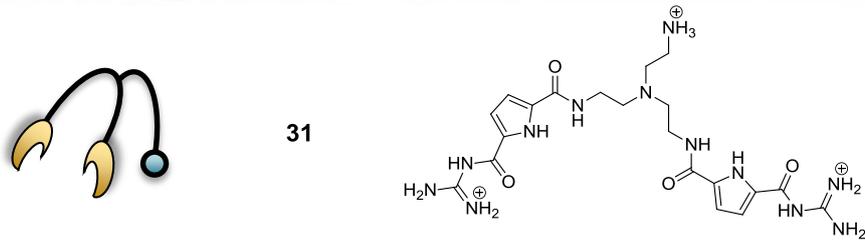
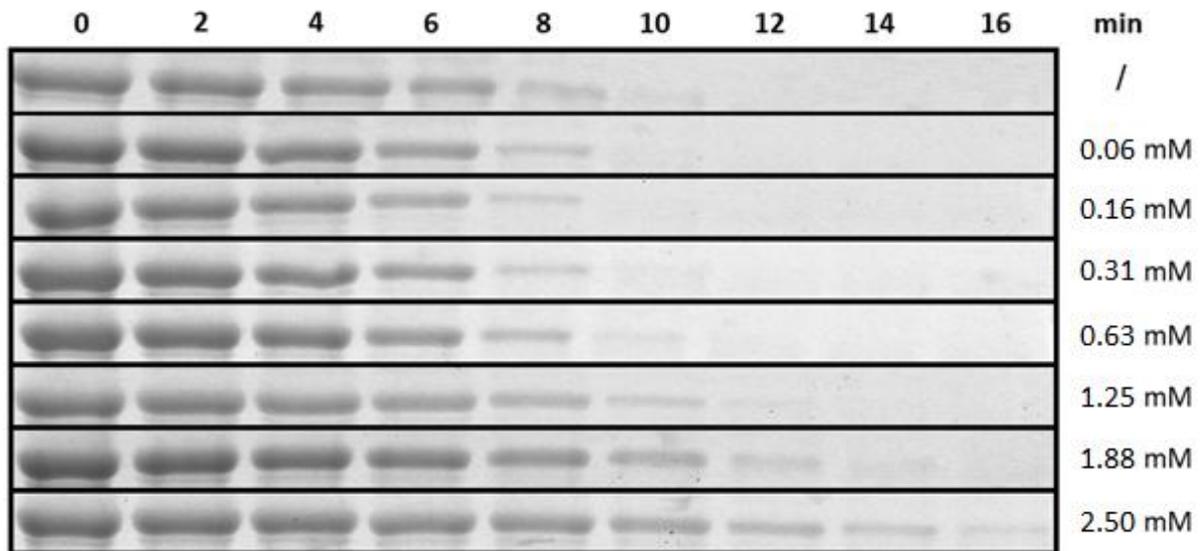


Abbildung 4.28: Vergleich von A252T-Mutante ohne Ligandenzugabe (oben) und A252T-Mutante mit Zugabe von fest definierten Konzentrationen der Verbindung **31** beim Verdau von β -Casein. Es lässt sich eine Inhibierung feststellen, welche mit einer Erhöhung der Konzentration stärker wird.

S. 100

Die vermessene Konzentration des Liganden **37** liegt bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

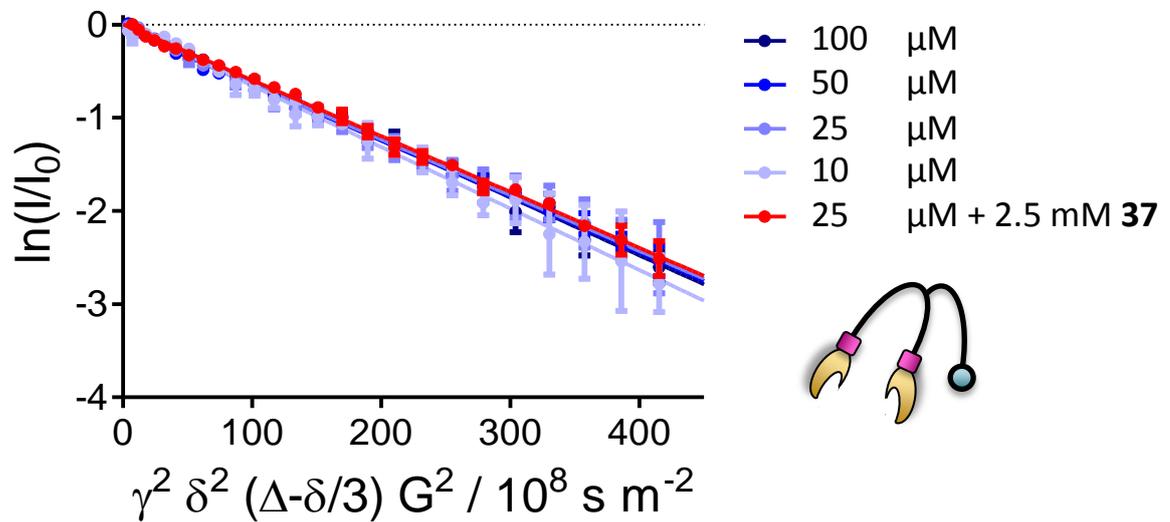


Abbildung 4.37: Auftragung der normierten gemessenen Intensität des Wildtyps gegen die quadrierte Gradientenstärke nach Gleichung 4.2. Auftragung und Anpassung erfolgten in GraphPad Prism 5 durch Dr. Christine Beuck.

(...) Zur Überprüfung wurde das Protein in Anwesenheit von 2.5 mM Ligand **37** vermessen (rot). (...)

S. 101

Die vermessene Konzentration des Liganden **37** liegt bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

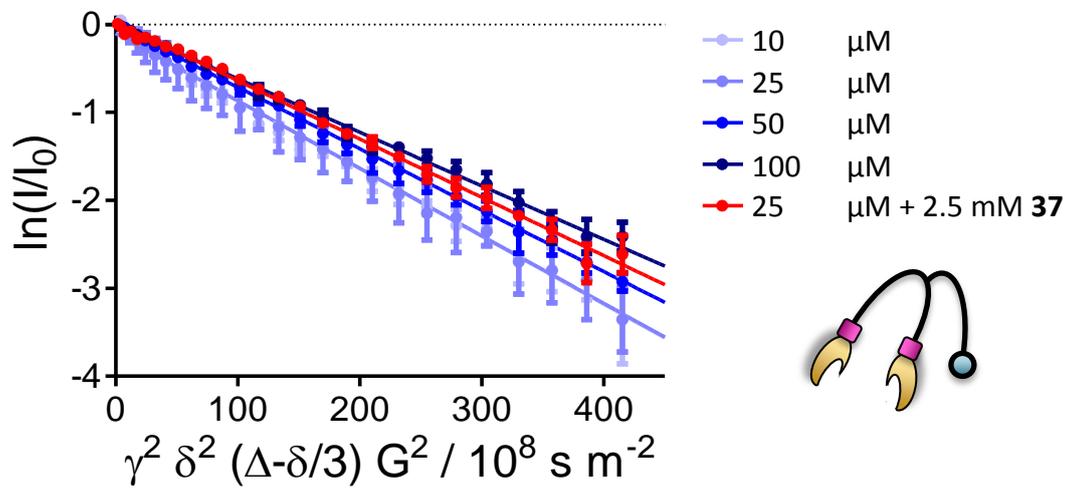


Abbildung 4.38: Auftragung der normierten gemessenen Intensität der Mutante R274Q gegen die quadrierte Gradientenstärke nach Gleichung 4.2. Auftragung und Anpassung erfolgten in GraphPad Prism 5 durch *Dr. Christine Beuck*.

S. 102

Die vermessene Konzentration des Liganden **56** liegt bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

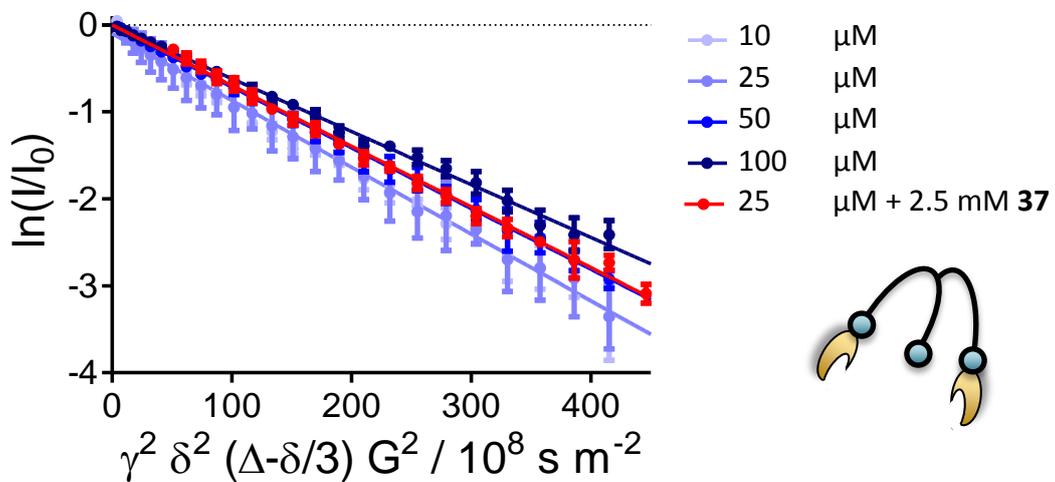
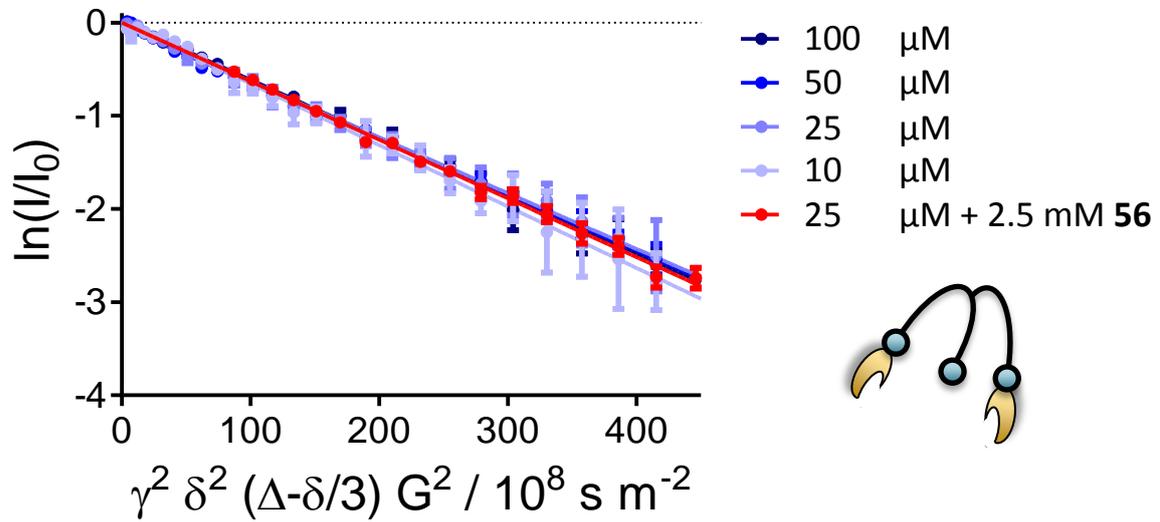


Abbildung 4.39: Auftragung der normierten gemessenen Intensität gegen die quadrierte Gradientenstärke nach Gleichung 4.2. Oben: Wildtyp mit Ligand **56**, unten: Mutante mit Ligand **56**. Auftragung und Anpassung erfolgten in GraphPad Prism 5 durch *Dr. Christine Beuck*.

S. 104

Die vermessenen Konzentrationen der Liganden **37** und **56** liegen bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

Tabelle 4.2: Diffusionskoeffizienten von Wildtyp und R274Q aufgelistet nach Konzentration sowie in Anwesenheit von 2.5 mM Ligand **37** bzw. Ligand **56**.

$c_{\text{protein}} [\mu\text{M}]$	$D_{\text{wt}} [10^{-11} \text{ s/m}^2]$	$D_{\text{R274Q}} [10^{-11} \text{ s/m}^2]$
100	6.21 ± 0.08	6.09 ± 0.07
50	6.01 ± 0.07	6.99 ± 0.04
25	5.98 ± 0.07	7.68 ± 0.09
10	6.60 ± 0.09	7.71 ± 0.10
25 + 2.5 mM 37	6.00 ± 0.06	6.63 ± 0.08
25 + 2.5 mM 56	6.29 ± 0.07	6.98 ± 0.10

S. 118

Die vermessenen Konzentrationen der Liganden **31**, **37**, **48** und **56** liegen bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

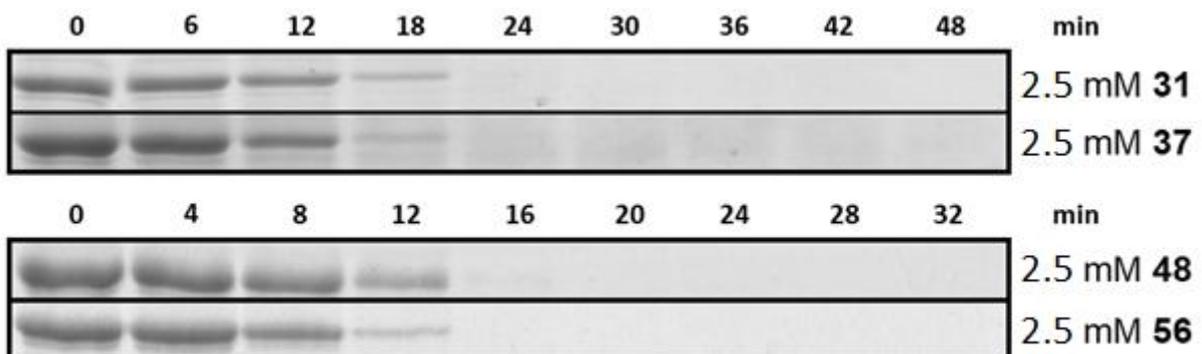


Abbildung 5.4: Aktivitätsassays der Mutante R274Q mit den dargestellten Liganden. Als Substrat, welches über die Zeit abgebaut wird, dient β -Casein.

(...) Zusätzlich ist eine deutliche Reaktivierung erst ab relativ hohen Konzentrationen von ca. 2.5 mM zu beobachten. (...)

S. 119

Die vermessenen Konzentrationen der Liganden **31** und **37** liegen bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

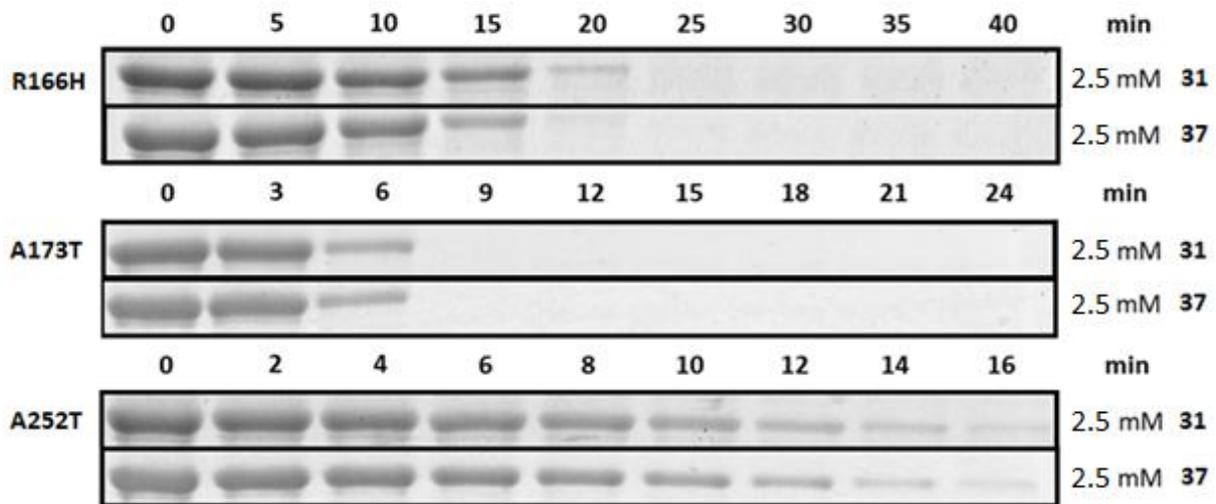


Abbildung 5.5: Aktivitätsassays der Liganden **31** und **37** bei den Mutanten R166H, A173T und A252T. Eine minimale Unterscheidung zwischen den Liganden ist nur bei R166H möglich.

S. 121

Die vermessenen Konzentrationen der Liganden **31**, **72**, **75** und **78** liegen bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

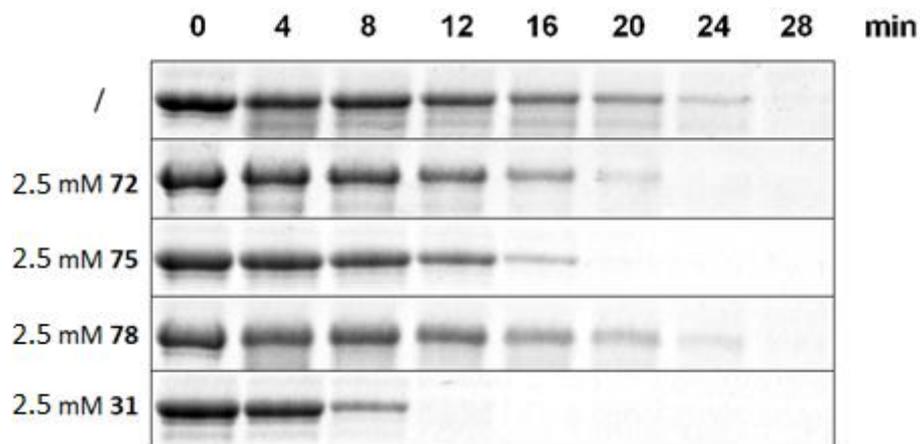


Abbildung 5.7: Vergleich von Mutante ohne Ligandenzugabe (oben) und Mutante mit Zugabe von je 2.5 mM Vergleichsligand beim Verdau von β -Casein. Während der Histidinligand keine Aktivierung zeigt, zeigen Arginin und Lysin schwache Aktivierungen. Dabei ist der Effekt bei Arginin stärker ausgeprägt. Ein Vergleich mit Ligand **31** unter denselben Bedingungen zeigt jedoch die deutliche Unterlegenheit der Naturaloga gegenüber dem GCP-Motiv.

(...) Die Präinkubation von 2.5 mM der Liganden mit 25 μM der Mutante zeigten bei der Vermessung einen deutlich erhöhten Anteil an Trimeren (Abbildung 5.8). (...)

S. 122

Die vermessene Konzentration des Liganden **37** liegt bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

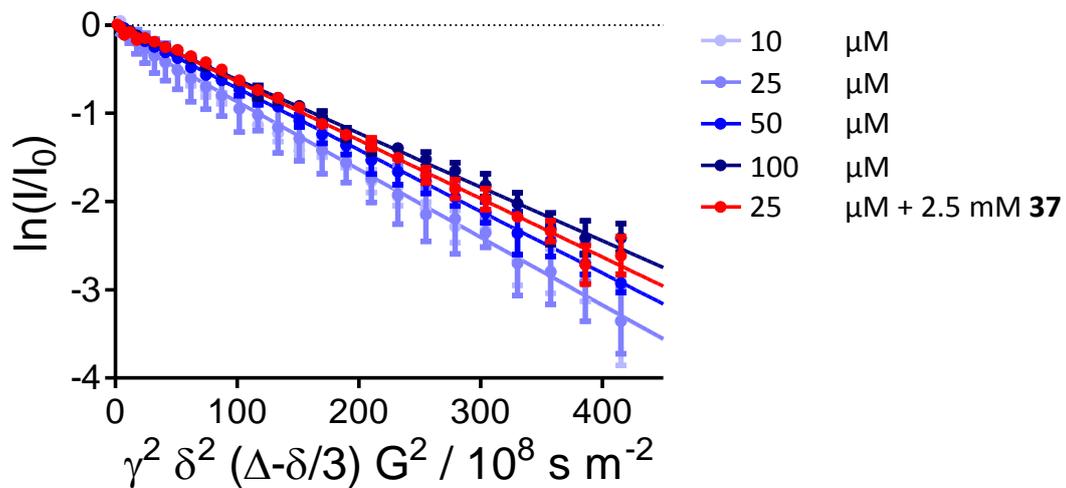
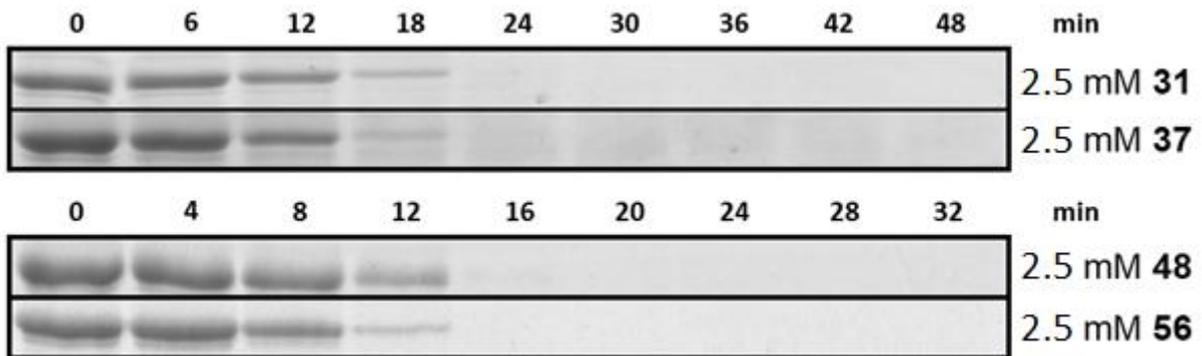


Abbildung 5.8: Auftragung der normierten gemessenen Intensität der Mutante gegen die quadrierte Gradientenstärke. Mutante und Ligand zeigen einen flacheren Graphen bei 25 μM verglichen zur Mutante ohne Ligand. Die Steigung des Trimergraphen (100 μM) ist nicht erreicht. Dies zeigt die partielle Retrimerisierung durch Ligand **37**. Auftragung und Anpassung erfolgten in GraphPad Prism 5 durch *Dr. Christine Beuck*.

S. 127

Die vermessenen Konzentrationen der Liganden **31**, **37**, **48** und **56** liegen bei 2.5 mM statt bei 4 mM.



Picture 6.4: Digest assays of R274Q with the four ligands shown in picture 6.3. β -casein acts as substrate, which is digested over time.

(...) Additionally, a clear reactivation is visible only at quite high concentrations up to 2.5 mM. (...)

S. 128

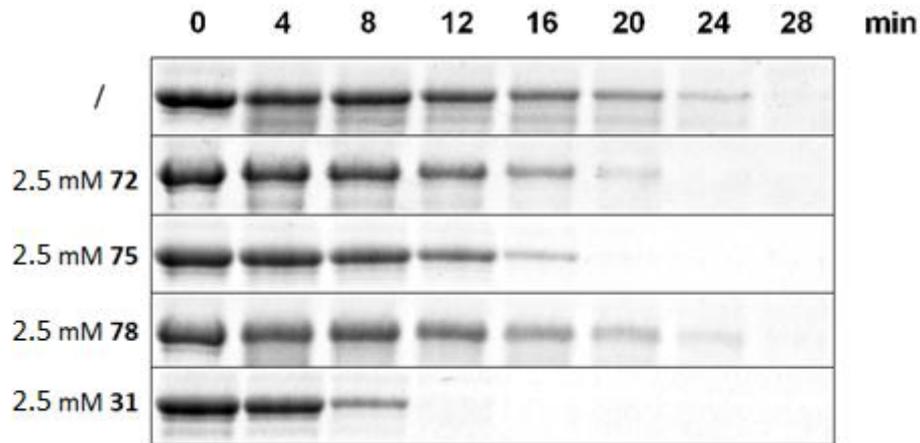
Die vermessenen Konzentrationen der Liganden **31** und **37** liegen bei 2.5 mM statt bei 4 mM.



Picture 6.5: Digest assays of R166H, A173T and A252T at the presence of the ligands **31** and **37**. A minimal discrimination is only possible at R166H.

S. 129

Die vermessenen Konzentrationen der Liganden **31**, **72**, **75** und **78** liegen bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

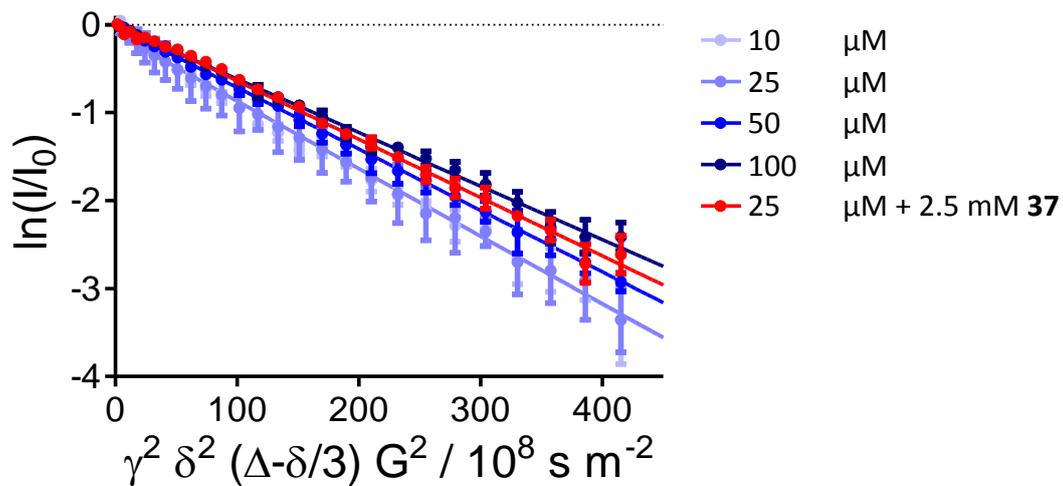


Picture 6.7: Comparison of the mutant without ligand (1st row) and of the mutant in the presence of 2.5 mM natural analogue in the digestion of β -casein. While the histidine ligand **78** shows no activation, the arginine and lysine ligands do show a weak activation. In doing so, this effect is stronger for the arginine ligand. Compared with the GCP ligand **31** under the same conditions clearly shows the strong inferiority of the natural analogues.

S. 130

Die vermessene Konzentration des Liganden **37** liegt bei 2.5 mM statt bei 4 mM.

(...) A preincubation of 2.5 mM ligand with 25 μ M mutant shows a high amount of trimers (Picture 6.8), even though complete trimerization was not observed. (...)



Picture 6.8: Application of the normalized measured intensity of the mutant as a function of the squared gradient strength. Mutant with ligand shows a flatter slope at 25 μM compared to the mutant without ligand. The slope of the trimer (100 μM) is not reached. This indicates a partially retrimmerization through ligand **37**. Application and adaption were performed in GraphPad Prism 5 by *Dr. Christine Beuck*.

S. 139

Die angesetzten Konzentration der Liganden liegen bei 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 1.88 und 2.5 mM statt bei 0.25, 0.5, 1, 2, 3 und 4 mM.

(...) 46.8 μL einer 2 μM HTRA1-Lösung (Wildtyp bzw. Mutante) in Phosphatpuffer und 36 μL einer Ligandenlösung mit unterschiedlicher Konzentration (0.16 mM, 0.31 mM, 0.63 mM, 1.25 mM, 1.88 mM und 2.50 mM) wurden zusammen für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. (...)