

Chemische Modulation der medizinisch relevanten HTRA- Proteasen DegS und HTRA1

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Jens Bongard

aus Essen

Februar 2016

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/41355

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240312-072500-0



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0) genutzt werden.

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie 2 (ZMB) der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Ehrmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Kaiser

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Peter Bayer

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juni 2016

I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS	3
II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	10
IV. TABELLENVERZEICHNIS	12
1. ZUSAMMENFASSUNG	13
1.1 ZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCHE VERSION)	13
1.2 SUMMARY (ENGLISH VERSION)	15
2. EINLEITUNG	17
2.1 ZIELSETZUNG	17
2.2 ANTIBIOTIKA	18
2.2.1 <i>Eine kurze Geschichte der antibiotischen Wirkstoffe</i>	19
2.2.2 <i>Neue Antibiotika, multiresistente Bakterien und alternative Lösungsansätze</i> ..	21
2.3 PROTEASEN	26
2.3.1 <i>Funktion und Einteilung von Proteasen</i>	26
2.3.2 <i>Serinproteasen</i>	26
2.3.3 <i>HtrA-Proteasen</i>	28
2.3.4 <i>Bakterielle HtrA-Proteasen</i>	29
DegP	29
DegS	30
2.3.5 <i>Humane HTRA-Proteasen</i>	35
HTRA1	35
HTRA2	39
HTRA3 und HTRA4	39
3. MATERIAL UND METHODEN	40
3.1 MATERIALIEN.....	40
3.1.1 <i>Puffer und Medien</i>	40
Puffer.....	40
Nährmedien für Bakterien	44
3.1.2 <i>Stämme und Plasmide</i>	45
Stämme.....	45
Vektoren.....	45
Plasmide	46
3.1.3 <i>Proteine und Peptide</i>	47
Restriktionsendonukleasen.....	47
Enzyme	47
Peptide.....	48
Protein- und Nukleinsäurestandards.....	48
Antikörper und Antiseren	49
3.2 CHEMIKALIEN UND GERÄTE	50
Komplettsysteme („Kits“).....	50
Verbrauchsmaterialien	50
Geräte	51
Software	52
Primer.....	52
3.3 METHODEN	55
3.3.1 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	55
Allgemeines	55
Polymeraskettenreaktion (PCR)	55
Oligomutagenese	55

Restriktionsverdau und Ligation.....	56
3.3.2 Mikrobiologische Methoden.....	57
Kultivierung von E. coli.....	57
Herstellung chemisch kompetenter E. coli.....	57
Transformation chemisch kompetenter E. coli.....	58
Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli.....	58
Konzentrationsbestimmung von DNA.....	58
3.3.3 Proteinbiochemische Methoden.....	59
β -Galactosidase-Assay.....	59
Gesamtproteinisolierung aus E. coli.....	60
Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	60
Proteinkonzentrationsbestimmung mit Bicinchoninsäure.....	60
Kalter osmotischer Schock.....	61
SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	61
Coomassiefärbung.....	62
Silbernitratfärbung.....	62
Western-Blot.....	62
Kolorimetrische Aktivitätsbestimmungen von DegS und HTRA1.....	64
Verdauassays zur qualitativen Aktivitätsbestimmung von Proteasen.....	65
Inhibitorscreening LDC.....	65
3.3.4 Massenspektrometrie.....	67
Probenvorbereitung für Massenspektrometrie.....	67
Massenspektrometrie (LC-MS/MS).....	68
3.3.5 Proteinreinigung.....	69
Anzucht des Überexpressionsstammes BL-21/pET21_N-Strep-DegS-dTM (bzw. Punktmutanten) ..	69
Zellaufschluss.....	69
DegS-Reinigung über Strep-Tactin, Hydroxylapatit und Gelfiltration.....	70
Reinigung von DegS-Punktmutanten mittels Protino 200 Ni-NTA Säulchen.....	71
4. ERGEBNISSE.....	72
4.1 SCREENING.....	72
DegS-Screen.....	72
HTRA1-Screening.....	73
4.2 DEGS INHIBITOREN.....	75
4.2.1 Proteinbiochemische Assays.....	75
Untersuchung der hits aus dem zweiten Screening-Abschnitt.....	75
Untersuchung von LDC043908-Derivaten.....	81
Untersuchung weiterer LDC043908-Derivate von Anna-Laura Schmitz (ALS-Compounds).....	87
Untersuchung der Inhibition von Kinasen.....	94
PNA-Assays.....	94
In-vitro Aktivitätsanalysen verschiedener DegS-Punktmutanten.....	97
RseA-Verdau Assays mit verschiedenen Aktivatorpeptiden.....	100
4.2.2 Zelluläre Assays.....	103
Wachstumskurven.....	103
Minimale inhibitorische Konzentrationen (MIC) bei klinisch relevanten Bakterienstämmen.....	105
β -Galactosidase-Assay.....	107
4.3 HTRA1 INHIBITOREN.....	110
4.3.1 Biochemische Assays.....	110
Systematische Untersuchung von Derivaten der hits aus HTRA1 Inhibitorscreen.....	110
Untersuchung der DegP-Inhibition im zellulären Assay.....	121
4.3.2 Massenspektrometrische Aufklärung des Wirkungsmechanismus von <i>Compounds</i> der Klasse A.....	122
4.4 INHIBITION DURCH AKTIVIERUNG DER AUTOPROTEOLYSE/AKTIVIERUNG.....	125
4.4.1 Entdeckung und biochemische Assays.....	125
4.4.2 Massenspektrometrische Untersuchung der Aktivatorcompounds.....	132
Massenspektrometrische Untersuchung der Modifikationen an DegS und HTRA1 durch ChemDiv #3470-5614.....	134

5. DISKUSSION	138
5.1 INHIBITION VON DEGS.....	138
Der erste potentiell spezifische Inhibitor für DegS	138
Erhöhung von Spezifität und Potenz des Inhibitors durch Derivatisierung	139
Messung von Inhibitionsstärken per pNA-Assay	141
Inhibition des Wachstums von E. coli Kulturen durch LDC043908	142
Der Inhibitor zeigt auch Wirkung auf pathogene Bakterien mit hoher Relevanz.....	144
Wachstumsinhibition kann auf die Wechselwirkung von DegS und LDC043908 <i>in-vivo</i> zurückgeführt werden	144
Analysen des Wirkmechanismus zeigen eine Inhibition der allosterischen Aktivierung von DegS durch LDC043908	145
Eingrenzung der Inhibitor-Wechselwirkung auf die Bindestelle des Aktivatorpeptides.....	146
5.2 INHIBITION VON HTRA1	149
Warum soll HTRA1 inhibiert werden?	149
HTRA1 kann inhibiert werden	149
Klasse A <i>Compounds</i> inhibieren gut, sind aber instabil.....	150
<i>Compounds</i> anderer Klassen inhibieren HTRA1 eher schlecht.....	152
<i>Compounds</i> der Klasse A gehen eine kovalente Bindung mit dem active-site Serin ein.....	154
5.3 AKTIVIERUNG VON DEGS/AKTIVIERUNG DER AUTOPROTEOLYSE VON HTRA1	155
Ein Aktivator für DegS aus dem HTRA1-Inhibitorscreen	155
Katalytische Aktivierung von DegS	155
Modifikation von Lysinen in DegS und HTRA1	156
Aussicht DegS-Aktivierung und HTRA1-Inhibition	160
6. REFERENZEN	162
7. ANHANG	171
8. DANKSAGUNG	174
V. LEBENS LAUF	175
VI. ERKLÄRUNGEN	178

II. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
α	Alpha
A	Ampere
Å	Angström
A. dest.	destilliertes Wasser (<i>aqua destillata</i>)
A ₄₀₂	Absorption bei 402 nm
A ₄₂₀	Absorption bei 420 nm
A ₆₀₀	Absorption bei 600 nm
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
kB	Kilobasenpaar
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine serum albumine</i>)
C-Terminus	Carboxylterminus
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DLS	dynamische Lichtstreuung (<i>dynamic light scattering</i>)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxynucleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>

g	Gramm; Erdbeschleunigung
Glu	Glucose
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HABA	2-(4'-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
HAP	Hydroxylapatit
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HTRA	<i>high temperature requirement A</i>
IC ₅₀	Konzentration der 50%igen Inhibition
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
k	Kilo (10 ³)
Kan	Kanamycin
KOS	kalter osmotischer Schock
Konz.	Konzentration
l	Liter
lac	Lactose
LB	Luria Bertani
M	Mol/molar
m	Milli (10 ⁻³)
mA	Milliampere
MBP	Maltose-Bindeprotein
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
n	Nano (10 ⁻⁹)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
N-Terminus	Aminoterminus
Ni-NTA	Nickel-Nitrolessigsäure
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NZA	NZ-Amine
OD	optische Dichte

OMP	Außenmembranprotein (<i>outer membrane protein</i>)
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymeraskettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDZ	PDS95/SAP90, Discs large, Zonula occludentes-1
PEG	Polyethylenglykol
pNA	para-Nitroanilin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SS	Signalsequenz
β	Beta
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TBS-T	TBS mit 0,05% Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
T_M	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	<i>transformation and storage solution</i>
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	Unit
üN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UV	ultraviolett
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
λ	Lambda
μ	Mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromolar

Aminosäuren

Aminosäuren werden entsprechend der IUPAC-Nomenklatur im Ein- oder Dreibuchstaben- Code angegeben.

III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Todesursachen weltweit und in Industrie- und Entwicklungsländern.....	19
Abb. 2: Wirkungsorte verschiedener Antibiotikaklassen	20
Abb. 3: Zeitlich Einordnung der Entdeckung neuer Antibiotikaklassen	22
Abb. 4: Allgemein anerkannter Reaktionsmechanismus klassischer Serinproteasen.....	27
Abb. 5: Segmentaler Aufbau ausgewählter HTRA Proteasen.....	29
Abb. 6: Kristallstruktur des DegS Trimer	31
Abb. 7: Strukturelle Änderungen in DegS nach Bindung eines Aktivatorpeptides.	32
Abb. 8: Der σ^E Signalweg	33
Abb. 9: Implikation von HTRA1 in wichtige zelluläre Prozesse im menschlichen Körper.	36
Abb. 10: Beziehung von Struktur und Aktivität bei HTRA1	37
Abb. 11: Bindung eines künstlichen Substrates an das aktive Zentrum von HTRA1	38
Abb. 12: Reaktionsmechanismus pNA-Assay am Beispiel von DegS	64
Abb. 13: Funktionsprinzip der AlphaScreen Technologie von Perkin-Elmer.....	66
Abb. 14: LDC043908 und seine Wirkung <i>in-vitro</i>	72
Abb. 15: Beispielhafte Darstellung RseA-Verdau durch DegS mit zu testenden <i>Compounds</i>	75
Abb. 16: Strukturzeichnung LDC043908 mit Verdeutlichung der derivatisierten Elemente.	87
Abb. 17: RseA-Verdau durch DegS mit Titration von ALS139	91
Abb. 18: RseA-Verdau durch DegS mit Titration von ALS182	91
Abb. 19: RseA-Verdau durch DegS mit Titration von LDC043908.....	92
Abb. 20: RseA-Verdau durch DegS mit Titration von ALS207 und ALS209	93
Abb. 21: pNA-Assay DegS mit verschiedenen Konzentrationen von LDC043908.....	95
Abb. 22: pNA-Assay DegP mit verschiedenen Konzentrationen von LDC043908.....	96
Abb. 23: RseA-Verdau durch DegS- Δ PDZ mit LDC043908 und LDC070404.....	97
Abb. 24: Beispielhafte Verdaureaktionen mit DegS-Punktmutanten und LDC043908.....	98
Abb. 25: RseA-Verdau durch DegS mit kurzen Aktivatorpeptiden und LDC043908.....	101
Abb. 26: RseA-Verdau durch DegS mit langen Aktivatorpeptiden und Inhibitoren	102
Abb. 27: Wachstumskurven CAG16037 (WT-Reporterstamm) und CAG33315 (Δ degS Reporterstamm) mit steigenden LDC043908-Konzentrationen.	103
Abb. 28: Vergleich des Wachstums (Endpunkt) CAG16037 und CAG33315 mit verschiedenen LDC043908 Konzentrationen.	104
Abb. 29: Wachstum von BW30270 (WT) und MM518 (<i>tolC</i> , LPS) unter Einfluss von ALS182	105
Abb. 30: Schematische Darstellung β -Galactosidase-Assay	107
Abb. 31: Expressionskontrolle mit gleichzeitiger Lokalisationskontrolle für MBP-OmpC Fusionsprotein	108
Abb. 32: Beweis der Durchführbarkeit des β -Galactosidase-Assays mit verschiedenen Stämmen	108
Abb. 33: β -Galactosidaseassay CAG16037 mit Inhibitor LDC043908.....	110
Abb. 34: Beispielhafter β -Casein-Verdau durch HTRA1 mit LDC198174	111
Abb. 35: RseA-Verdau durch HTRA1 mit <i>Compounds</i> der Klasse D.....	115

Abb. 36: Beispielhafte Darstellung RseA-Verdau durch DegS mit Klasse C <i>Compounds</i>	117
Abb. 37: DegS RseA-Verdau mit neuen Derivaten der Klasse C.....	117
Abb. 38: β -Casein-Verdau durch HTRA1 mit sinkenden Konzentrationen der untersuchten <i>Compounds</i>	119
Abb. 39: RseA-Verdau durch DegS mit sinkenden LDC198919 Konzentrationen.....	120
Abb. 40: Wachstumskurven DegP-Inhibitions-Assay mit LDC197756.....	121
Abb. 41: Vorhergesagter Reaktionsmechanismus LDC197756 und <i>active-site</i> Serin S201.....	123
Abb. 42: MASCOT Analyse der modifizierten Peptide.....	124
Abb. 43: RseA-Verdau durch DegS mit potentiellen Aktivatormolekülen.....	125
Abb. 44: Untersuchung der Eigenschaften von LDC054905.....	126
Abb. 45: RseA Verdau durch HTRA1 mit LDC054905.....	126
Abb. 46: Inkubation einzelner Proteine mit 50 μ M des <i>Compounds</i> LDC054905.....	128
Abb. 47: RseA-Verdau durch HTRA1 mit <i>Compound</i> ChemDiv #3470-5592.....	130
Abb. 48: RseA-Verdau durch DegS mit Aktivator-Compound ChemDiv #3470-5592.....	130
Abb. 49: Beispielhafte Untersuchung von LDC054905 per LC-MS.....	132
Abb. 50: Theoretische Reaktion: LDC054905, Autohydrolyse in wässriger Lösung.....	133
Abb. 51: RseA-Verdau durch DegS mit hydrolysiertem LDC054905 (24h).....	134
Abb. 52: Modifikation durch ChemDiv #3470-5614.....	135
Abb. 53 (vorherige Seite): Durch ChemDiv #3470-5614 modifizierte Peptide in DegS und HTRA1	137
Abb. 54: Strukturzeichnung LDC043908 mit Verdeutlichung der derivatisierten Elemente.....	139
Abb. 55: Darstellung K243 und K247 mit Kontakt zu E324 im inaktiven DegS.....	160
Abb. 56: Inhibition von DegS im RseA-Verdau durch ALS219 und ALS221.....	171
Abb. 57: β -Casein Verdau durch HTRA1 mit Klasse D <i>Compounds</i>	172
Abb. 58: RseA-Verdau durch DegS H198P mit <i>active-site</i> Inhibitor LDC197756.....	172
Abb. 59: Kontrolle der Autoproteolyse von HTRA1 in Puffer.....	173

IV. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primäre <i>hits</i> HTRA1 Inhibitorscreen.....	73
Tab. 2: Weitere HTRA1 <i>hits</i>	74
Tab. 3: Primäre <i>hits</i> DegS Inhibitorscreen (zweiter Abschnitt).....	76
Tab. 4: Manuell ausgesuchte <i>Compounds</i> aus DegS Inhibitorscreen (zweiter Abschnitt).....	78
Tab. 5: Testergebnisse kommerziell erhältliche Derivate von LDC043908.....	82
Tab. 6: LDC043908-Derivate von Anna-Laura Schmitz	88
Tab. 7: IC ₅₀ -Werte von LDC04390 und ALS66 gegenüber ausgewählten Kinasen	94
Tab. 8: Berechnung der relativen Aktivitäten von DegS und DegP im pNA-Assay.....	96
Tab. 9 (folgende Seite): Verzeichnis der untersuchten DegS-Punktmutanten	98
Tab. 10: Ergebnisse der Inhibitionstests mit DegS-Punktmutanten	100
Tab. 11: Minimale inhibitorische Konzentrationen (MIC) LDC043908 für klinisch relevante Bakterienstämme	106
Tab. 12: HTRA1-Inhibitor Derivate der Klasse A (3-Aryl-1-benzoyl-1H-1,2,4-triazole)	112
Tab. 13: HTRA1-Inhibitor Derivate der Klasse B (3-benzoyl-benzo(D)oxazol-2(3H)one).....	113
Tab. 14: HTRA1-Inhibitor Derivate der Klasse C (4-(Arylsulfonyl)but-2-in-1-yl Benzoate).....	113
Tab. 15: HTRA1-Inhibitor Derivate der Klasse D (2,3-Dihydrofuro(3,2-e)imidazo(1,2,-c)pyrimidin-9- carboxamide	114
Tab. 16: HTRA1-Inhibitor Derivate der Klasse E (1,8-Dioxo-2,3,4,6,7,8-hexahydro-1H-pyrido(1,2- a)pyrazin-6-carbamoyl-9-carboxylate	116
Tab. 17: Kommerziell erhältliche Derivate von LDC054905 und ihre Wirkung	129
Tab. 18: Aktivierung von DegS im Zusammenhang von Aktivatorpeptid und Aktivator-Compound	131

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung (deutsche Version)

Innerhalb der wichtigen Gruppe der Serinproteasen spielen die sog. HtrA-Proteasen (*high temperature requirement A*) in vielen medizinisch relevanten Prozessen wichtige Rollen. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit besonders hervorzuheben ist die humane HtrA-Protease HTRA1 und das bakterielle DegS.

DegS ist an einer sehr spezifischen Stressantwort auf ungefaltete Proteine im extracytoplasmatischen Raum von Bakterien maßgeblich beteiligt. In Stresssituationen liegen Außenmembranproteine in ungefalteter Form vor, das erkennt DegS über eine Motiv-spezifische Bindung und wird dadurch aktiviert, es kann dann den Antisigmafaktor RseA an einer spezifischen Stelle schneiden, sodass dieser weiter prozessiert werden kann. Durch diese Prozessierung wird der Sigmafaktor σ^E freigesetzt und initiiert die Stressantwort, wozu die höhere Expression von Faltungshelfern und Proteasen gehören um die vorhandene Last abzubauen, und ebenso die Verringerung der Expression von Außenmembranproteinen und der Proteinherstellung im Allgemeinen. Aufgrund dieser Schlüsselrolle in der Stressantwort ist DegS ein essentielles Protein für *E. coli* und viele andere Gram-negative Bakterien. Aber selbst in vielen Gram-positiven Bakterien ist DegS unerlässlich für Virulenz.

Die gezielte Suche nach einem Inhibitor und die Weiterentwicklung dieses Moleküls unter medizinisch-chemischen Gesichtspunkten kann zu einem potenten Antibiotikum führen. Dieses wäre im Hinblick auf die heutige Knappheit an neuen Antibiotika und der fortschreitenden Entwicklung von Resistenzen ein wertvoller Fortschritt in der medizinischen Bekämpfung von Infektionskrankheiten. So wurde bereits im Vorfeld ein *Screening* durchgeführt um potentielle Inhibitoren von DegS aus einer Substanzbibliothek von etwa 185 000 Molekülen zu finden. Diese Moleküle wurden dann in verschiedenen Assays weiter untersucht und charakterisiert, diese Suche führte einem spezifischen, dosis-abhängigen und potentem Inhibitor von DegS *in-vivo* und *in-vitro*, LDC043908. Die Charakterisierung des Wirkmechanismus über Mutantanalysen deutet auf eine Inhibition der allosterischen Aktivierung von DegS hin. Dabei muss nach den bisherigen Erkenntnissen aus Bindungs- und Aktivierungsstudien die Bindung des Inhibitors an die Aktivatorpeptidbindestelle angenommen werden. Derivatisierung führte zu einer noch spezifischeren und potenteren Inhibition von DegS *in-vitro* und auch *in-vivo*.

HTRA1 erfüllt diverse Aufgaben und ist an der Prozessierung verschiedener Substrate beteiligt. Durch seine diversen Aufgaben ist bei Fehlfunktion mit verschiedensten Krankheiten verknüpft. So ist es etwa bei Unterfunktion (bzw. -expression) in die

Entstehung verschiedener Krebsarten involviert, sowie erhöhter Migration und vermindertem Ansprechen auf Chemotherapeutika. Eine Überfunktion (bzw. -expression) kann zu erhöhter Zellproliferation und Tumorstadium führen, genau so ist dieser Befund oft mit Entzündungsprozessen wie in Arthritis und altersbedingter Makuladegeneration (AMD) verknüpft.

Ebenfalls über ein wie oben beschriebenes *Screening* und weiterführende orthogonale Untersuchungen sollten Inhibitoren von HTRA1 identifiziert werden. Dabei konnten 7 verschiedene Moleküle gefunden werden, die innerhalb von sechs Gruppen mit jeweils verschiedenen Derivaten charakterisiert wurden. Es konnten grundlegende Struktur-Wirkungs-Beziehungen und Spezifitätsmuster (mit anderen Serinproteasen: HTRA2/3/4, DegS, DegP, Trypsin, Chymotrypsin und Elastase) herausgearbeitet werden. Der Wirkmechanismus der größten Gruppe über Massenspektrometrie eindeutig als *active-site* Inhibition mit kovalenter Bindung an das katalytisch aktive Serin bestimmt. Aufgrund von Problemen mit der Stabilität in wässrigen Lösungen und weiterer Derivatisierung ist dieser Teilaspekt noch unter weiterer Bearbeitung.

Neben den Inhibitoren der beiden Proteasen konnte auch eine Gruppe von Molekülen gefunden werden, die eine starke, aktivierungsabhängige Steigerung der katalytischen Aktivität von DegS bewirkt. Parallel dazu haben diese Moleküle auch einen starken Einfluss auf HTRA1. Während die meisten Moleküle dieser Gruppe die Stabilität von HTRA1 negativ beeinflussen und so ein Substrat vor dem katalytischen Verdau schützen können, erreicht ein Molekül das auch ohne Destabilisierung der Protease. Die chemische Reaktion der Moleküle in Wasser und mit den Proteinen DegS und HTRA1 konnte durch Massenspektrometrie eindeutig gezeigt werden, unklar bleibt dabei aber vor Allem der Wirkmechanismus für HTRA1. Während hier einige Modifikationen festzustellen sind, bleibt zu klären wie diese Modifikationen Stabilität und Aktivität von HTRA1 beeinflussen können. Im Falle von DegS wird mit hoher Wahrscheinlichkeit eine inhibitorische Interaktion unterbrochen und so die Aktivität gesteigert. Weitere Untersuchungen der unterliegenden Mechanismen sollen Erkenntnisse über regulatorische Prozesse der Proteasen liefern und dabei helfen diese Gruppe von Molekülen zu spezifischen Aktivatoren und/oder Inhibitoren von DegS und HTRA1 weiterzuentwickeln.

1.2 Summary (English Version)

Within the important group of Serine-proteases, HtrA (high temperature requirement A) proteases play important roles in several medically important scenarios. In connection to this work, the roles of human HTRA1 and bacterial DegS protease should be emphasized. DegS is very important for a specific stress response for unfolded proteins in the extracytoplasmic space of bacteria. If folding stress is indicated, unfolded outer membrane proteins (OMPs) will be available for binding to DegS via specific motifs which are usually not present in correctly folded proteins. This binding process initiates activation of DegS which can now cleave one specific bond in anti-sigma factor RseA which in turn is enabled for further processing. This leads to free σ^E and the stress reaction. The reaction consists of downregulated expression of OMPs, upregulated expression of folding catalysts and proteases, and many other regulations. Based on this key role in stress response, DegS is considered an essential protein in *E. coli* and many other gram negatives, but further more it is very important for virulence even in many gram positives.

Directing screening for an inhibitor of DegS and further development of the compound(s) under medicinal chemical aspects can lead to a potent antibiotic. With regard to today's shortage of new antibiotics and further developing resistances in bacteria this would represent an important progress in fighting infectious diseases. To this end, a compound library of about 185.000 different small molecules was screened in advance of this work. Detected molecules were further analyzed and characterized to reveal one compound, LDC043908, that was a potent, dose dependent, and specific inhibitor of DegS *in vitro* and *in vivo*. Further investigation by analysis of several DegS mutants hints at a mechanism of action by inhibiting allosteric activation of DegS. It is very likely that LDC043908 binds to the same motif specific activating peptides would also bind to, which was determined by binding and activation studies *in-vitro*. Derivatization and further investigation lead to more specific and even more potent inhibitors of DegS.

HTRA1 performs several tasks and is involved in the processing of many different substrates. From this diversity, malfunction of HTRA1 is easily connected to many kinds of diseases. Downregulated function or expression is involved in emergence of several cancers, as well as elevated migration of cancer cells and decreased susceptibility to chemotherapeutic substances. Upregulated function or expression of HTRA1 can lead to elevated proliferation of cells and tumor growth, furthermore it is found in several inflammation processes like arthritis and age-related macular degeneration.

Likewise, to the DegS screening, one was performed for HTRA1 inhibitors and further assays were carried out. Seven molecules could be found thereby and further characterization within six groups with many derivatives took place. Essential relationships

for structure, activity and specificity (within HTRA2/3/3, DegS, DegP, Trypsin, Chymotrypsin, and Elastase) were established for all groups of inhibitors. The mechanism of action for the biggest group was determined by mass spectrometry and localized to covalent binding of inhibitors to the active-site serine. Due to stability issues of the compounds in aqueous solvents and further derivatization this sub-project is on going with our partner LDC in Dortmund.

In parallel to finding and developing inhibitors for both proteases, one group of molecules was found that had very different influence on DegS and HTRA1. While compounds of this class elevated the activator-peptide dependent activity of DegS, they negatively influenced stability of HTRA1 and thereby inhibited substrate digestion by the protease. One compound inhibited HTRA1 from processing its substrate without destabilizing the protease. Chemical reactions of the molecules with water and with DegS and HTRA1 could be determined by mass spectrometry, whereas the exact mechanism of action remains unclear for HTRA1. While several modifications of HTRA1 can be found it is still to be elucidated which of them important and how they influence activity and stability of HTRA1. In case of DegS it is very likely that compounds destroy an inhibitory interaction between two distinct domains of the protease and thereby elevated catalytic activity of DegS.

Further investigations of underlying mechanisms shall shed light on some more regulatory processes within the proteases and help developing specific activators and/or inhibitors of both DegS and HTRA1 from these compounds as starting points.

2. Einleitung

2.1 Zielsetzung

Auf der Grundlage voran gegangener Forschungsarbeiten zu dem Thema der periplasmatischen Stressantwort, konnte ein Protein, DegS, im Periplasma vieler Bakterienarten identifiziert werden, das als ein ideales Ziel für ein neuartiges Antibiotikum erscheint. Zu den Vorteilen dieses Proteins gehören die gute Erreichbarkeit des Periplasmas für kleine chemische Moleküle, die Essentialität des Proteins und zusätzlich die besondere Bedeutung des Proteins in der Virulenz vieler Bakterien (z.B. (Brown & Gulig 2009)). Aufgrund dieser günstigen Ausgangslage war es das erklärte Ziel dieser Arbeit ein kleines chemisches Molekül zu finden, das DegS zuverlässig und spezifisch inhibiert um auf dieser Grundlage weitere Entwicklung in Richtung eines antibakteriellen Wirkstoffes zu betreiben. Dazu wurde bereits vor dem Beginn dieser Arbeit eine Kooperation mit dem *Lead Discovery Center* (LDC, Dortmund) geschlossen und in einem *in-vitro Screeningsystem* eine Bibliothek verschiedener Moleküle auf die Inhibition von DegS getestet. Erste potentielle Inhibitoren konnten identifiziert und näher charakterisiert werden. Grundlage dieser Arbeit ist ein weiteres Durchtesten vieler Moleküle, die Derivatisierung vorhandener Inhibitoren und die genauere Charakterisierung der Moleküle sowie ihrer Wirkungsweise. Außerdem wurde ein sehr ähnliches System für die Inhibition der humanen HtrA Protease HTRA1 verwendet. Es handelt sich, wie bei DegS, um eine in vielerlei Hinsicht medizinisch relevante Protease (mehr Informationen dazu unter Abschnitt 2.3). Auch hier wurde mittels eines maschinenbasierten Assays die große Substanzbibliothek des LDC (ca. 185 000 Substanzen) durchgetestet und Moleküle, die Inhibition über einem gewissen Schwellenwert erreichten und einige qualitative Ansprüche erfüllten wurden in orthogonalen Assays im Rahmen dieser Arbeit getestet. Es sollten außerdem viele Derivate getestet werden um eine Struktur-Wirkungs-Beziehung für die Moleküle aufbauen zu können und spezifitätsbestimmende Faktoren abschätzen zu können. Weitere wichtige Faktoren sind Löslichkeit und Stabilität der Moleküle in wässrigen Lösungen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Charakterisierung einer Reihe von Molekülen, die als spezielle Inhibitoren von HTRA1 in einem Screen gefunden wurden. Es handelte sich um *Compounds*, welche den RseA-Verdau durch HTRA1 verhindern, jedoch wird der Selbstverdau der Protease augenscheinlich beschleunigt. Gibt man diese Moleküle zu einem RseA-Verdau durch DegS, wird die katalytische Aktivität von DegS gegenüber seinem Substrat erhöht, nicht jedoch ein Selbstverdau. Es sollte daher geklärt werden, wie die Moleküle auf die Proteasen wirken und wie es zu den unterschiedlichen Auswirkungen kommen kann. Auf dieser Grundlage wäre es außerdem möglich die Eigenschaften der Moleküle so zu verändern, dass sie gute und spezifische Inhibitoren von HTRA1 werden.

2.2 Antibiotika

Auch wenn in der öffentlichen Wahrnehmung Krankheiten wie Krebs und Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems eine übergeordnete Rolle zu spielen scheinen, stehen Infektionskrankheiten immer noch an zweiter Stelle der häufigsten Todesursachen weltweit (Abb. 1 (A) und (WHO 2013)).

Besonders deutlich wird die Bedeutung von Infektionskrankheiten als Todesursache bei der vergleichenden Betrachtung in Industrie- und Entwicklungsländern (Abb. 1 (B)). In den Entwicklungsländern stellen Infektionskrankheiten mit knapp 35 % der Todesfälle sogar die häufigste Todesursache da. In diesen Regionen spielen besonders mangelnde Hygiene (Kanalisation, sauberes Trinkwasser und Lebensmittel), fehlendes Wissen (Infektionsvermeidung) aber auch fehlender Zugriff auf medizinische Versorgung (Medikamente, Impfschutz, Fachpersonal) eklatante Probleme da. Aber auch in den Industrieländern wächst der Einfluss antibiotika-resistenter Keime, vor allem durch multiresistente Krankenhauskeime wie MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*).

Diese Entwicklung ist vielen verschiedenen Einflüssen geschuldet, dazu dürften aber vor Allem der verantwortungslose Umgang mit den vorhandenen Antibiotika in der Humanmedizin und Tierzucht, aber auch die besonderen Eigenschaften der Bakterien (hohe Anpassungsfähigkeit, kurze Generationszeit) zählen. Neben dem richtigen Umgang mit den vorhandenen Antibiotika, ist also auch die Entwicklung immer neuer Antibiotika (AB), welche bestehenden Resistenzen durchbrechen könnten, zwingend erforderlich. Interessant dafür sind vor allem völlig neue Ziele, an denen Antibiotika ansetzen um Bakterien zu inhibieren (bakteriostatische AB) oder zu töten (bakterizide AB).

Als Antibiotika (griechisch: αντί- anti- „gegen“ und βίος bios „Leben“) werden ganz generell Stoffe verschiedener Arten bezeichnet, die in der Lage sind Mikroorganismen negativ zu beeinflussen

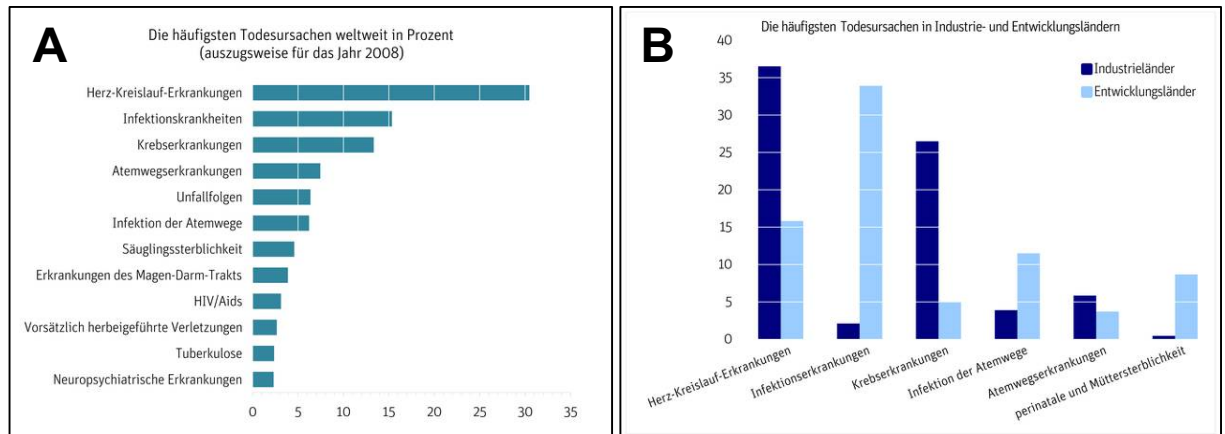


Abb. 1: Todesursachen weltweit und in Industrie- und Entwicklungsländern

(A) Aufschlüsselung der weltweit häufigsten Todesursachen und (B) vergleichende Aufschlüsselung der häufigsten Todesursachen in Industrie- und Entwicklungsländern. Alle Angaben Prozentual nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO). (Quelle: Berlin-Institut, Datengrundlage: WHO 2008)

2.2.1 Eine kurze Geschichte der antibiotischen Wirkstoffe

Schon seit etwa 2000 Jahren versuchen Menschen Bakterien zu bekämpfen und bakterielle Infektionen, zumeist in Wunden, zu heilen (Lindblad 2008). Schon die alten Griechen und Ägypter nutzen Extrakte aus speziellen Pilzen und Pflanzen um Wundinfektionen zu heilen (Forrest 1982; Wainwright 1989). Deutlich später, 1877, entdeckten Louis Pasteur und Robert Koch, dass sich verschiedene Stämme der Gattung *Bacillus* nachteilig beeinflussen können (Landsberg 1949).

Die Entdeckung antibiotischer Wirkstoffe wird vielfach Alexander Fleming, einem schottischen Mikrobiologen, zugesprochen. Dieser machte im September 1928 eher zufällig die Entdeckung, dass ein Schimmelpilz der Gattung *Penicillium* das Wachstum von Bakterien der Gattung *Staphylococcus* hemmte. Ähnliche Beobachtungen wurden allerdings bereits etwa 30 Jahre vorher durch andere Wissenschaftler beschrieben. Bereits 1983 isolierte der Italiener Bartolomeo Gosio den Stoff Mycophenolsäure aus einem Schimmelpilz der Gattung *Penicillium* und war damit in der Lage das Wachstum des Milzbranderreger (*Bacillus anthracis*) einzudämmen. Der französische Militärarzt Ernest Duchesne reichte 1897 seine Doktorarbeit ein, darin beschrieb er die Bekämpfung von *Salmonella typhi* (Typhuserreger) und *Escherichia coli* durch den Schimmelpilz *Penicillium notatus*, sowohl in Reinkulturen als auch in Tierversuchen mit Meerschweinchen. Die Arbeit wurde allerdings durch das Institut Pasteur abgelehnt. Tragischer Weise starb Duchesne wenig später an Tuberkulose. Fleming konnte dann aber in Kollaboration mit einigen Chemikern den Wirkstoff Penicillin zuerst charakterisieren und isolieren (Fleming; Sykes 2001).

Die Entdeckung der ersten synthetischen Antibiotika wird Paul Ehrlich zugeschrieben, welcher herausfand, dass mit bestimmten Farbstoffen menschliche, tierische und

bakterielle Zellen differentiell angefärbt werden können. Er postulierte, dass aufgrund dieses Mechanismus Stoffe zu finden seien müssten, die speziell an Bakterien binden und diese hemmen oder töten. Im Jahre 1910 wurde Salvarsan (heute: Arsphenamin) (Limbird 2004; Bosch & Rosich 2008) auf dem Markt eingeführt, ein Schmalspur-Antibiotikum, welches die damals verheerende Syphilis wirksam bekämpfte. Eine vermeintliche Struktur und seine Beobachtungen dazu veröffentlichte Ehrlich erst 1912 (Ehrlich & Berthelm 1912), dabei ging er zunächst von einer trimeren Struktur der Arsenverbindung aus. Das erste kommerziell erhältliche Antibiotikum wurde 1932 von einem Team um Gerhard Domagk in den späteren Laboratorien von Bayer (damals: IG Farben) entwickelt. Es handelte sich gleichzeitig um das erste Sulfonamid Prontosil, 1939 erhielt Domagk den Nobelpreis für seine Verdienste rund um die Entdeckung von Prontosil. Man sieht diese Entdeckung heute als Beginn des antibiotischen Zeitalters an, in den folgenden Jahren wurden sehr viele antibiotische Wirkstoffe und Wirkstoffklassen entdeckt und immer mehr der bis dahin verheerenden bakteriellen Infektionen bekam man durch den medizinischen Einsatz der neuen Wirkstoffe in den Griff.

Heute zählen Antibiotika zu den weltweit am häufigsten verschriebenen Medikamenten, es sind etwa 8000 verschiedene Wirkstoffe mit antibiotischen Eigenschaften bekannt, von denen allerdings nur etwa 80 auch medizinischen Einsatz finden. Das Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) zählte 2005 genau 2775 zugelassene Antibiotikapräparate.

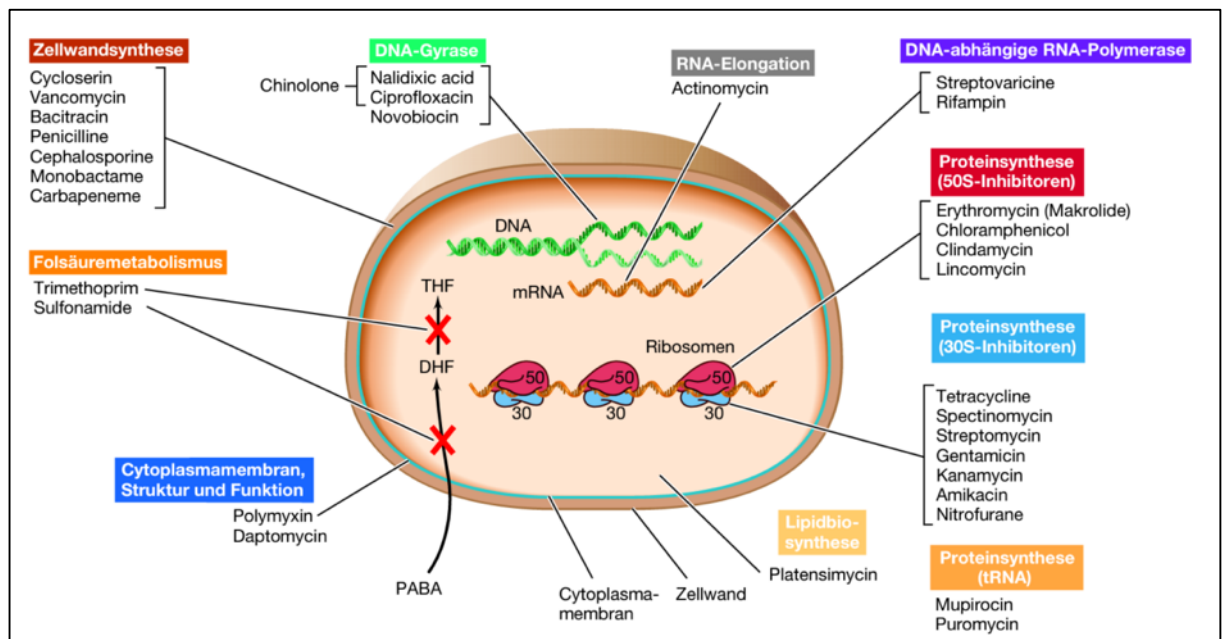


Abb. 2: Wirkungsorte verschiedener Antibiotikaklassen

Darstellung der Ansatzpunkte der verschiedenen Wirkstoffklassen antibiotischer Präparate (aus: Brock, Microbiology of Microorganisms 11/e, 2006 Pearson Prentice Hall)

Abb. 2 zeigt die Ansatzpunkte der bisher bekannten und zugelassenen Wirkstoffklassen von Antibiotika. Es lässt sich erkennen, dass die eingesetzten Antibiotika wenige distinkte Ziele in der bakteriellen Maschinerie haben. So werden etwa häufig die Zellhülle (Zellwandsynthese oder –integrität), der Folsäuremetabolismus oder die Proteinproduktion (DNA Gyrase, RNA Elongation, Polymerasen, beide Untereinheiten der Ribosomen oder Proteinsynthese) attackiert. Die geringe Zahl an Zielen heutiger Antibiotika ist dabei sehr auffällig.

2.2.2 Neue Antibiotika, multiresistente Bakterien und alternative Lösungsansätze

Auch wenn es sich zunächst sehr gut anhört, dass heute 80 verschiedene antibiotische Substanzen in über 2775 Präparaten für die medizinische Behandlung bakterieller Infektionen zugelassen sind, kann gerade heutzutage keine Entwarnung in Sachen bakterieller Infektionen gegeben werden.

Fischbach und Walsh haben schon 2003 festgestellt und weiter ausgeführt (Fischbach & Walsh 2009; Walsh 2003), dass zwischen 1962 und 2000 keine völlig neuen Klassen von antibiotischen Wirkstoffen eingeführt wurden, und bezeichnen diesen Zeitraum als „*innovation void*“. Abb. 3 zeigt eine zeitliche Einordnung der Entdeckung neuer Antibiotikaklassen, dabei wird der genannte Zeitraum besonders deutlich. Ebenfalls gut zu erkennen ist die Hochzeit der antibiotischen Entwicklung zwischen 1940 und 1980.

Zwar wurden in den letzten 15 Jahren etwa 10 neue antibiotische Wirkstoffe zugelassen, jedoch handelt es sich um neue Vertreter altbekannter Klassen. So etwa Linezolid (2007), welches zu den Lipopeptiden gehört, diese wurden bereits 1987 beschrieben (Debono et al. 1987). Aber auch Kombinationspräparate bewährter Antibiotika mit zusätzlichen Wirkstoffen wurden zugelassen. In den letzten Jahren wurden zum Beispiel einige β -Lactamase-Inhibitoren entwickelt, die zusammen mit β -lactam-Antibiotika (wie Penicillinen oder Carbapenemen) gegeben werden, gegen die sich bereits Resistenzen, etwa in Form von β -Lactamasen oder Carbapenemasen, entwickelt hatten. Diese Resistenzen beruhen auf veränderten Enzymen, die β -lactam-Ringe spalten und die Antibiotika so unschädlich machen konnten. Um die (makro-) Lebensdauer dieser Antibiotika zu erhöhen, wurden spezifische Inhibitoren für die Resistenzenzyme entwickelt, so kommt es zu den Kombipräparaten (Boucher et al. 2013). Zum Beispiel wurde das Kombipräparat Ceftolozane/Tazobactam im Dezember 2014 in den USA zugelassen, weitere Präparate wie Ceftazidime/Avibactam, Ceftaroline/Avibactam und Imipenem/MK-7655 befinden sich in der klinischen Erprobung (Stand: 08.01.2016).

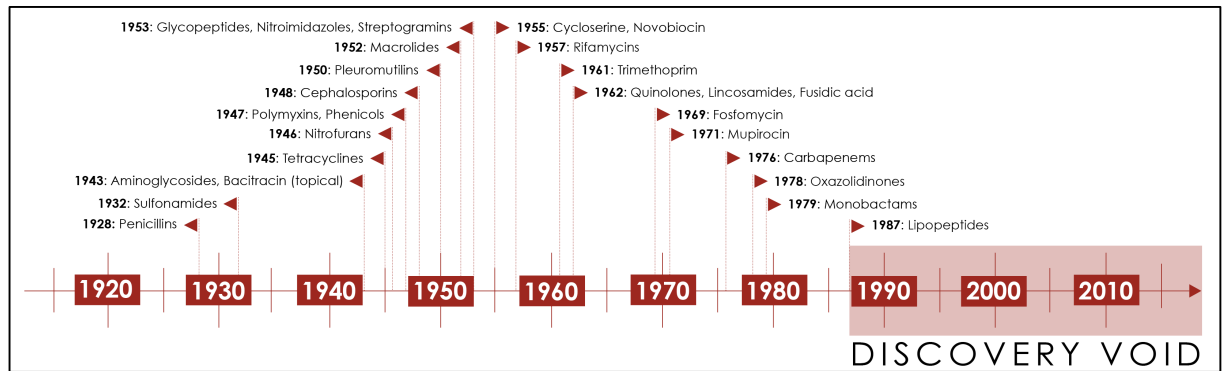


Abb. 3: Zeitlich Einordnung der Entdeckung neuer Antibiotikaklassen

Die Abbildung zeigt die zeitliche Einordnung der Entdeckung neuer Antibiotikaklassen, beginnend mit dem Penicillin (1928) und endend mit den Lipopeptiden (1987). Adaptiert von (Silver 2011).

Bereits 1977, als die Zahl der neuen Antibiotikazulassungen anfang zu sinken, erkannte und formulierte Cohen das Problem (Cohen 1977). Er führte das Ende des sog. goldenen Zeitalters der Antibiotika-Entwicklung darauf zurück, dass die „niedrig hängenden Früchte“ (*low-hanging fruits*) schon gepflückt wären, also diejenigen Antibiotika aus der Natur, welche leicht zu finden und zu isolieren sind, schon entdeckt wurden. Als Lösung schlägt Cohen vor, rationale und spezifische Assays zu entwerfen mit denen spezielle Enzyme inhibiert werden können, die vorher durch Grundlagenforschung als geeignete Ziele zu identifizieren sind. Dieser Ansatz in Kombination mit neuen Möglichkeiten der Molekularbiologie, wie die gentechnische Veränderung von Bakterienstämmen und die Aufreinigung von Enzymen für *in-vitro* Assays, trieb die Entwicklung immer mehr in die genannte Richtung (Silver 2011). Silver beschreibt aber auch, dass diese Anstrengungen lange Zeit von wenigen Erfolgen gekrönt wurden, was viele große Pharmaunternehmen zu bewog sich aus diesen Entwicklungen zurück zu ziehen, weil sie sich wirtschaftlich als wenig gewinnbringend erwiesen. Weiterhin beschreibt sie wichtige Kriterien, die ein geeignetes enzymatisches Ziel für ein Bakterium haben sollte. Diese Kriterien umfassen (i) die Essentialität des zu blockierenden Enzyms, sodass die Inhibition zur Nichterfüllung einer lebensnotwendigen Aufgabe innerhalb des Organismus führen würde und somit Stillstand oder Tod zur Folge hätte. Außerdem sollte (ii) das entsprechende Enzym „*drugable*“ sein, also Strukturen aufweisen an die ein Inhibitor wirksam binden könnte, und noch dazu sollten diesen Strukturen (iii) konserviert sein, damit nicht nur der Modellorganismus bekämpft werden kann. Das letzte wichtige Kriterium (iv) ist die Abgrenzung der avisierten Struktur zu anderen Organismengruppen, sodass Nebenwirkungen und Kreuzreaktivitäten von vorne herein weitestgehend ausgeschlossen werden können.

Zusammen mit dem Wissen um die äußerst hohe Anpassungsfähigkeit von Bakterien, ist es leicht zu erkennen, dass auch in Zukunft niemals eine endgültige Lösung für dieses

Problem erlangt werden kann. Bakterien werden so immer in der Lage sein, Resistenzen gegen die verwendeten Wirkstoffe zu erlangen. Es wird zwischen endogenen und exogenen Resistenzmechanismen unterschieden. Während die endogenen Mechanismen durch Mutation und Selektion im evolutionären Sinne heranreifen, werden exogene Mechanismen durch horizontalen Gentransfer aus anderen Organismen (z.B. aus Antibiotikaproduzenten) übertragen (Bryan 1989; Cohen 1977; Davies 1994; D'Costa et al. 2007; Hamilton-Miller 1990; Martinez & Baquero 2000; Martínez et al. 2007; Silver & Bostian 1993). Zu den wichtigsten mechanistischen Methoden für eine Resistenz gehören die (enzymatische) chemische Veränderung oder Zerstörung des antibiotischen Wirkstoffes, der Schutz des molekularen Ziels, Efflux (also gerichteter Export des Wirkstoffes aus der Zelle) und direkte Veränderung des molekularen Ziels, die Gesamtheit dieser Mechanismen wird Resistom genannt (D'Costa et al. 2007). Aufbauend darauf, kann argumentiert werden, dass vollsynthetische Wirkstoffe, die neuartige molekulare Ziele inhibieren sollen, die bessere Wahl wären. Zu diesen neuen Antibiotika bestünden innerhalb der Natur noch keine geeigneten Resistenzmechanismen und müssten erst durch die angesprochenen Mechanismen entwickelt werden (endogene Resistenzen). Zusammen würden diese Faktoren zu einer Verlängerung der klinischen Einsatzfähigkeit dieser Wirkstoffe führen (Allsop 1998; Barker 2006; Brötz-Oesterhelt et al.; Cassell & Mekalanos 2001; Hughes 2003; Miesel et al. 2003). Allerdings zeigte sich, dass auch gegen vollsynthetische Fluoroquinolone (D'Costa et al. 2007) und Sulfonamide (Davies 1994) bereits vor der Markteinführung Resistenzen in der Natur vorliegen können. Einschränkend muss dazu gesagt werden, dass es sich hier jeweils auch nur um neue Vertreter einer natürlichen Klasse von Wirkstoffen handelt. Bei der Betrachtung der zeitlichen Abstände, die zwischen der Markteinführung einer neuen Antibiotikaklasse und dem Auftreten erster Resistenzen gegen diese liegen, scheint sich die These zu bestätigen, dass besser neue molekulare Ziele durch synthetische Wirkstoffe adressiert werden sollten. So zeigten sich bei natürlichen Antibiotika wie Penicillin erste Resistenzen schon wenige Monate nach Einführung in der Klinik (Kirby 1944), bei Vancomycin wurde die ersten Resistenzen in Enterokokken allerdings erst etwa 33 Jahre nach der Markteinführung gefunden (Leclercq et al. 1989). Es muss allerdings dazu gesagt werden, dass Vancomycin zunächst nur sehr verhalten und auch später nur bei Staphylokokken eingesetzt wurde, eine direkte Vergleichbarkeit ist also nicht gegeben. Bei vollsynthetischen Wirkstoffen dauerte es meist länger, so etwa 23 Jahre bei Sulfonamiden (Kitamoto, O., N. Kasai 1956), elf Jahre bei Fluoroquinolonen (Martínez-Martínez et al. 1998) und sechs Jahre bei Oxazolodinonen (Long et al. 2006). Es zeigt sich also, dass die bisher kürzeste gemessene Zeit von sechs Jahren bei Fluoroquinolonen eine deutliche Verlängerung dieses Zeitraumes im Vergleich zu den natürlich vorkommenden AB darstellt.

Und tatsächlich, Berechnungen einer Studie, die durch die britische Regierung in Auftrag gegeben wurde (O'Neill 2014), sagen einen Anstieg der Todesfälle durch bakterielle Infektionen von derzeit 700 000 pro Jahr auf etwa 10 Millionen im Jahre 2050 voraus, falls die Entwicklung der Resistenzen weiter so voran schreitet wie bisher. Das hätte auch wirtschaftliche Folgen, die Studie sagt eine Reduktion des Bruttosozialproduktes um 2 bis 3,5 % und weltweite Kosten von bis zu 100 Milliarden Dollar voraus. Dabei werden vor Allem die sechs sog. ESKAPE Organismen (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter spp.*) betrachtet, welche für einem großen Teil der Infektionen in menschlichen Organen verantwortlich sind (Rice 2008). Außerdem ist bei diesen Spezies ein vermehrtes Auftreten von Resistenzen zu beobachten, was oft auch bereits jetzt zu fehlenden Alternativen in der antimikrobiellen Behandlung führt. Zu großen Problemen führen immer wieder Resistenzen gegen β -Lactam Antibiotika (Penicilline, Carbapenemene), in manchen Entwicklungsländern zeigen sich Resistenzquoten von bis zu 50 % gegen Reserveantibiotika, welche die letzte Möglichkeit zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen darstellen. In den letzten 40 Jahren ist so ein 100-facher Anstieg der bekannten Carbapanemasen (β -Lactam zerstörende Enzyme) zu verzeichnen (Coates & Hu 2014).

Heute gehören die sog. Antibiotika-Resistenz-Brecher (ARBs) zu den aussichtreichsten mittelfristigen Lösungsansätzen für dieses Problem. Dabei handelt es sich um Substanzen, die zusammen mit bereits verwendeten Antibiotika gegeben werden sollen um vorhandene Resistenzen zu durchbrechen. Dieses kann entweder in einem direkten Mechanismus oder indirekt, etwa durch synergistische Effekte, geschehen. Zu der ersten Gruppe gehören auch die bereits beschriebenen und seit einigen Jahren verwendeten Inhibitoren von β -Lactamasen und Carbapanemasen. Auch andere Mechanismen sind denkbar, etwa Störung der Membranintegrität oder die Inhibition von Efflux-Pumpen (Blair et al. 2014), hier ist etwa der Wirkstoff Phe-Arg- β -naphthylamide zu nennen (Marquez 2005). Wie erwähnt sind das aber auch nur mittel- und keine langfristigen Lösungen. Für die Zukunft bleibt unter den aktuellen Gesichtspunkten nur der forschungsintensive Weg über die ziel- und strukturbasierte Entwicklung neuartiger Inhibitoren.

Daneben sind auch alternative Methoden denkbar, um die Last der bakteriellen Infektionen zu reduzieren, so ist etwa die Therapie mit Phagen immer wieder im Gespräch (Sulakvelidze et al. 2001), und spätestens seitdem die Phagentherapie 2014 auch im Bericht des Nationalen Zentrums für Allergien und Infektionskrankheiten der USA (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID)) aufgeführt wurde (Infectious National Institute of Allergy and Diseases 2014), formiert sich auch hier wieder eine breitere Front, sowohl im akademischen Bereich als auch bei kleineren Pharmaunternehmen. Es bleibt zu

erwähnen, dass die Phagentherapie in osteuropäischen Ländern schon seit langer Zeit im breiten Maßstab angewandt wird (Thiel 2004). Trotz alledem ist die Phagentherapie bisher wenig erforscht und wird kontrovers diskutiert.

2.3 Proteasen

2.3.1 Funktion und Einteilung von Proteasen

Proteasen sind Enzyme, die Peptidbindungen hydrolysieren können. Der genaue Reaktionsmechanismus unterscheidet sich nach ihrem aktiven Zentrum aufgrund dessen sie auch in verschiedene Gruppen unterteilt werden können. Man unterscheidet Serin-, Threonin-, Cystein-, Aspartat-, Glutamat- und Metalloproteasen. Proteasen mit unbekanntem aktiven Zentrum sind seltener. Die sog. *MEROPS*-Datenbank (Rawlings et al. 2014) unterscheidet Proteasen außerdem in Familien und Clans. Die Unterteilung in eine der über 250 Familien geschieht dabei über Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz, während die Einordnung in einen der etwa 50 Clans über die dreidimensionale Struktur erfolgt und so z.B. über eine funktionelle Ähnlichkeit.

Proteasen sind in allen Lebewesen an einer Vielzahl essentieller Prozesse beteiligt, so können sie protektive, regulatorische oder digestive Wirkungen aufweisen. Sehr prominente Proteasen sind z.B. an Verdauungsprozessen im menschlich Körper beteiligt, wo sie große aufgenommene Proteine in immer kleinere Untereinheiten zerlegen, sodass diese resorbiert und zum Aufbau neuer Proteine oder als Energiequelle weiterverwendet werden können. Protektive Proteasen können falsch gefaltete, falsch lokalisierte oder aggregierte Proteine teilweise oder ganz degradieren. Somit schützen sie Zellen z.B. vor Fehlfunktionen oder dem Zelltod durch das Verklumpen von Proteinen. Regulatorische Proteasen sind ihrerseits an einer großen Zahl von zellulären Prozessen beteiligt, wobei sie andere Proteine aktivieren oder inaktivieren können und so in Signaltransduktion eingebunden sind (Gottesman 2003; Ehrmann & Clausen 2004).

Bei allen genannten Prozessen spielen oftmals Serinproteasen eine entscheidende Rolle, nicht nur, weil sie die zahlenmäßig größte Gruppe der Proteasen darstellen.

2.3.2 Serinproteasen

Wie schon durch den Namen verdeutlicht, tragen Serinproteasen einen nukleophilen Serinrest im aktiven Zentrum. Sie konnten in Eukaryoten, Prokaryoten und Viren gefunden werden und stellen etwa ein Drittel aller bekannten Proteasen da (Hedstrom 2002). Die vier klassischen Clans der Serinproteasen zeichnen sich alle durch eine Ser-His-Asp Triade im katalytischen Zentrum aus und werden nach den jeweiligen bekannten Vertretern Chymotrypsin, Subtilisin, Carboxypeptidase Y und Clp Protease benannt. Die wiederum größte Gruppe machen die Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen mit etwa 310 Mitgliedern aus (Rawlings et al. 2014). In den letzten zwanzig Jahren wurden allerdings auch einige nicht-klassische Serinproteasen beschrieben (Dodson & Wlodawer 1998). Alle in dieser Arbeit behandelten Proteasen zählen jedoch zu den Serinproteasen mit einem

Chymotrypsin-ähnlichen Aufbau. Im Folgenden ist der allgemein anerkannte Reaktionsmechanismus der Proteolyse einer Peptidbindung am Beispiel von Chymotrypsin beschreiben, alle Positionsangaben beziehen sich daher auch auf Chymotrypsin. Neben der katalytischen Triade Ser195, His57 und Asp102 und ihrer richtigen räumlichen Orientierung, die vor allem durch ein Netzwerk an Wasserstoffbrücken im aktiven Zentrum erreicht wird (Gandour 1981; Gandour et al. 1990), ist auch das sog. *oxyanion-hole* sehr wichtig für die korrekte Funktion der Protease. Es wird durch die NH-Gruppen des Peptidrückgrates von Gly193 und Ser195 geformt und weist eine positive Ladung auf. Durch diese hilft es bei der Aktivierung des Carbonyls und stabilisiert das negativ geladene Oxyanion des tetrahedralen Intermediates (Henderson 1970).

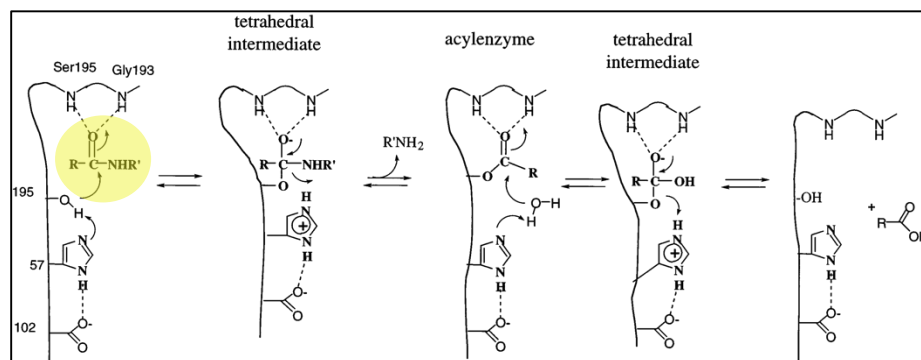


Abb. 4: Allgemein anerkannter Reaktionsmechanismus klassischer Serinproteasen

Der Reaktionsmechanismus ist beispielhaft für Chymotrypsin dargestellt, das Substrat ist schematisch dargestellt und gelb hinterlegt (nach (Hedstrom 2002)).

Über ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk (*charge relay system*) aktivieren His57 und Asp102 Ser195 für eine nukleophile Attacke auf die Amid-Bindung des Substrat-Proteins. Es kann dann zur nukleophilen Attacke des Ser195 auf das Carbonyl des Substrates kommen, wobei His57 als generelle Base assistiert (Protonenakzeptor). Es kommt zu einem tetrahedralen Übergangszustand, welcher wie oben beschrieben durch das *Oxyanion-hole* stabilisiert wird. Das resultierende His57- H^+ wird durch eine Wasserstoffbrücke mit Asp102 stabilisiert. Der Übergangszustand zerfällt dann wieder unter Abgang der sog. Abgangsgruppe ($R-NH_2$) unter Hilfe von His57- H^+ , welches nun als generelle Säure agiert (Protonendonor), es kommt zum Acylenzym-Übergangszustand. Im weiteren attackiert Wasser den erneuten Übergangszustand unter Hilfe von His57, welches wieder als generelle Base agiert (Protonenakzeptor). Auch hier kommt es zu einem tetrahedralen Übergangszustand der zusätzlich durch das *Oxyanion-hole* stabilisiert wird. Schlussendlich zerfällt auch dieser Übergangszustand wieder und hinterlässt das native Ser195 und ein Carboxylsäureprodukt (Abb. 4). Der beschriebene Vorgang ist zunächst universell anwendbar und kann durch eine beliebige Protease auf eine jede Peptidbindung (und ähnliche Bindungstypen) angewandt werden.

Wichtig für die Spezifität einer jeden Protease ist die spezifische Interaktion zwischen Protease und Substrat über die sog. Substraterkennungsstelle. Nach einer einheitlichen Nomenklatur (Schechter & Berger 1967) bezeichnet man die jeweiligen Positionen auf der Proteasen-Seite mit P1, P2, P3 usw. (C-terminal) bzw. P1', P2', P3' usw. (N-terminal) und die jeweiligen Positionen des Substrates als S1, S2, S3 bzw. S1', S2', S3'. In Chymotrypsin formen Ser189, Gly216 und Gly226 eine tiefe hydrophobe Tasche. Diese bestimmt die Substratspezifität entscheidend und macht einen Bindungsvorzug von z.B. S1-Phenylalanin gegenüber Alanin mit einem Faktor von 50000 aus (Huber et al. 1974; Dorovska et al. 1972). Bei Chymotrypsin ist diese P1-S1 Interaktion besonders wichtig für die Spezifität. Eine Besonderheit von Chymotrypsin ist, dass auch Wasserstoffbrücken zwischen Ser214 und dem -NH von P1, dem -NH von Trp215 und dem Carbonyl von P3, sowie dem Carbonyl von Gly216 und dem -NH von P3 nicht untergeordnete Rollen bei der Substratbindung und -umsetzung spielen (Hedstrom 2002).

2.3.3 HtrA-Proteasen

Eine interessante Gruppe innerhalb der S1-Familie der Serinproteasen (wie Trypsin und Chymotrypsin) sind die HtrA (*high-temperature-requirement*) - Proteasen. Es handelt sich um eine Gruppe konservierter Proteasen, deren Vertreter in einer Vielzahl ein- und mehrzelliger Organismen gefunden werden können (Page & Di Cera 2008). Die Proteine dieser Gruppe (Abb. 5) zeichnen sich sowohl durch ihren homo-oligomeren Zustand wie auch durch den Aufbau aus Protease-Domäne und ein bis zwei PDZ-Domänen aus (Clausen et al. 2011).

Diese charakteristischen PDZ-Domänen wurden 1991 zum ersten Mal beschrieben (Woods & Bryant 1991) und erhielten ihren Namen nach den ersten Proteinen, in denen PDZ-Domänen gefunden wurden. Nämlich dem synaptische Protein PSD95/SAP90 dem Septate junction-Protein Discs large aus *Drosophila melanogaster* und das Tight junction-Protein Zonula occludentes-1. PDZ-Domänen befähigen Proteine zu sonst nicht möglichen Protein-Protein-Interaktionen und sind somit ein wichtiger Faktor in der Signaltransduktion. HtrA Proteasen übernehmen wichtige Aspekte der Proteinqualitätskontrolle, bakteriellen Virulenz, Erhaltung des Photosynthese-Apparates, Proliferation, Zellmigration und Zellschicksals-Entscheidungen (Huesgen et al. 2009; Clausen et al. 2002; Chien, Ota, et al. 2009). In Säugetieren ist der Verlust der enzymatischen Aktivität einer HTRA-Protease mit schweren Krankheiten assoziiert, wie etwa Krebs, Arthritis, altersbedingte Makuladegeneration (Yang et al. 2006), Parkinson sowie Alzheimer (Grau et al. 2005; Poepsel et al. 2015). Die meisten bekannten HtrA Proteasen weisen eine extra-cytoplasmatische Lokalisation auf, also in der Zellhülle Gram-negativer Bakterien, im

extrazellulären Raum Gram-positiver Bakterien und in Mitochondrien, Chloroplasten, Nuklei und extrazellulärer Matrix bei Eukaryonten (Clausen et al. 2011).

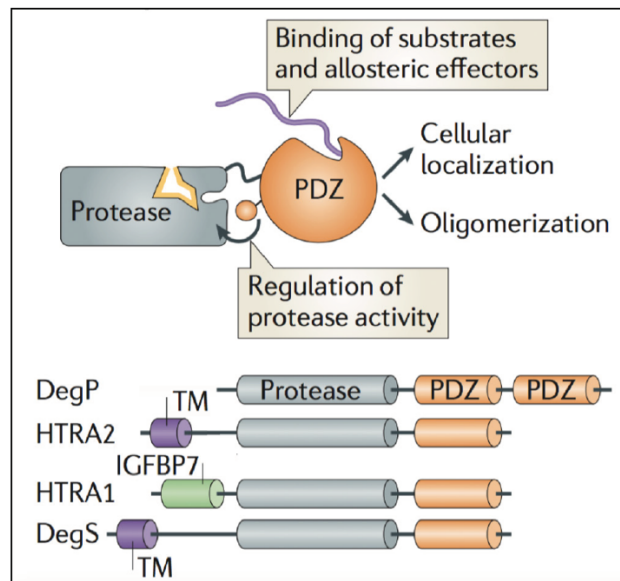


Abb. 5: Segmentaler Aufbau ausgewählter HTRA Proteasen.

Schematische Darstellung des segmentalen Aufbaus von HTRA Proteasen, dabei nehmen die PDZ Domänen wichtige Aufgaben bei der Bindung von Proteinen ein, sowohl von Substraten als auch Interaktionspartnern. Ebenso zu sehen ist eine Übersicht über den ähnlichen segmentalen Aufbau wichtiger HTRA Proteasen. Aufbau TM: Transmembrandomäne, IGFBP7: Insulinwachstumsfaktor bindende Domäne (*insulin growth factor binding domain*), Protease: Protease-Domäne, PDZ: PDZ-Domäne (verändert nach (Clausen et al. 2011)).

2.3.4 Bakterielle HtrA-Proteasen

Für den Modellorganismus *E. coli* sind bisher drei HtrA-Proteasen beschrieben worden: DegS, DegP und DegQ. Dabei sind DegP und DegS recht gut erforscht und es ist viel über ihre Struktur, Funktion und Regulation bekannt. Über DegQ hingegen ist sehr wenig bekannt, es weist eine sehr hohe Sequenzhomologie (etwa 60%) zu DegP aus und scheint auch sonst eher homologe Aufgaben zu erfüllen (Kolmar et al. 1996). Bei Überexpression kann es einige der Aufgaben von DegP übernehmen.

DegP

DegP wurde zuerst beschrieben und spielt eine wichtige Rolle in der extracytoplasmatischen Stressantwort, indem es, abhängig von der Umgebungstemperatur, als Chaperon oder ATP-unabhängige degradierende Protease tätig ist (Spiess et al. 1999; Clausen et al. 2002). DegP besteht aus einer Protease-Domäne und zwei PDZ-Domänen, in seiner inaktiven Form liegt es als homo-Hexamere in der Zelle vor. Höhere oligomere Strukturen (12-, 15-, 18- und 24-mere) sind mit dem aktivierten Zustand verknüpft. In seiner degradierenden Funktion bindet DegP mittel PDZ-Domäne 1 an das Substrat und führt es zur Proteasedomäne. Als Chaperon kann DegP

Außenmembranproteinen die Passage durch das Periplasma erleichtern, bei der Bildung wichtiger Disulfidbrücken unterstützen und Aggregationen falsch gefalteter Proteine durch seine Haltefunktion unterbinden (Krojer et al. 2008; Spiess et al. 1999; Spiess et al. 1997; Shen et al. 2009; Iwanczyk et al. 2007).

DegS

DegS nimmt eine völlig andere Rolle ein, indem es eine einzige regulatorische Aufgabe übernimmt. Stark vereinfacht gesagt interagiert es mit C-Termini ungefalteter Außenmembranprotein (*outer membrane proteins* - OMPs) auf und wird durch deren Bindung aktiviert. Das aktivierte DegS vollzieht einen einzigen proteolytischen Schnitt an seinem einzigen bekannten *in-vivo* Substrat RseA und setzt so den Beginn der Stressantwort auf ungefaltete Proteine (*unfolded protein response* – UPR).

Bakterien müssen in der Lage sein auf verschiedene Arten von Stress in ihrer Zellhülle reagieren zu können. Im Modellorganismus *E. coli*, aber auch in vielen anderen Gram-negativen Bakterien, übernehmen vor Allem die beiden Signalwege σ^{32} und σ^E die Wahrnehmung und Reaktion auf verschiedene Stressarten (Raivio 2005). Während σ^{32} eher auf Hitze induzierten Stress spezialisiert ist (Yura 1996), übernimmt σ^E die Stressantwort auf Proteinfaltungstress. Bereits 1993 wurde zum ersten Mal der Zusammenhang zwischen der Expression von Außenmembranproteinen (OmpC, OmpT, OmpF und OmpX) und der Hochregulation der σ^E -Stressantwort beschrieben (Mecsas et al. 1993). Außenmembranproteine haben hydrophobe C-Termini, die normalerweise im Inneren des korrekt gefalteten Proteins vom umgebenden wässrigen Medium abgeschlossen sind. Kommt es zu Faltungstress (z.B. zu hohe Produktion an OMPs, Störungen in der äußeren Membran, Fehlfaltungen) liegen diese hydrophoben C-Termini frei im Periplasma vor und können so als Signal/Indikator für den Faltungstress dienen. Da die C-Termini dieser Proteine recht konserviert sind (Tyr-x-Phe Motiv), können sie sehr spezifisch an eine bestimmte Region in der PDZ-Domäne von DegS binden (Walsh et al. 2003; Wilken et al. 2004). Dabei binden Tyrosin- und Phenylalaninrest an die PDZ-Domäne von DegS, der mittlere (variable) Rest interagiert jedoch mit Loop L3 der Proteasedomäne (Meltzer et al. 2009). Loop L3 besitzt C- und N-terminal zwei eher rigide Elemente (Stammelemente) und ein bewegliches Element dazwischen (Hasenbein et al. 2010), dieses wird je nach Eigenschaft des gebundenen OMP-Motivs bewegt (Abb. 7).

Allgemein bildet natives DegS Trimere, die Protease-Domänen interagieren miteinander und bilden eine tunnelförmige Struktur aus, die von der Cytoplasmamembran weg in das Periplasma deutet. Dabei fixieren N-terminale Membrananker die Position von DegS in der Cytoplasmamembran (Wilken et al. 2004).

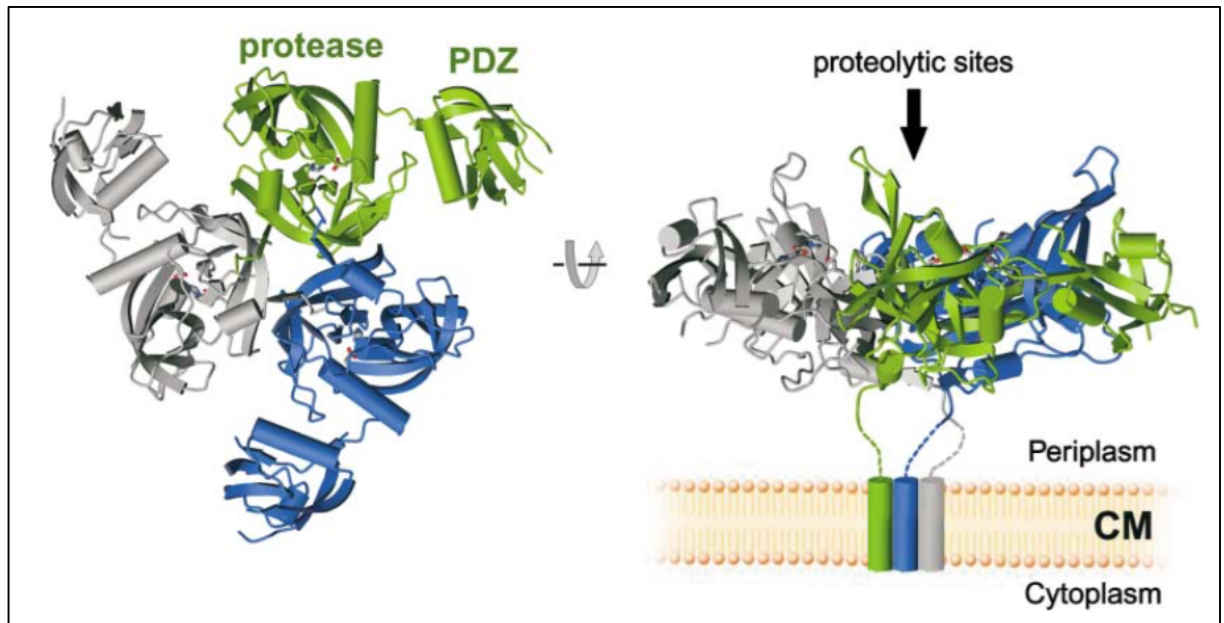


Abb. 6: Kristallstruktur des DegS Trimer

Die Abbildung zeigt die Aufsicht und Seitenansicht eines DegS Trimer inkl. der Verankerung in der Cytoplasmamembran. Jedes Monomer ist in einer Farbe kenntlich gemacht. Abbildung verändert nach (Wilken et al. 2004)

Im inaktiven Zustand sind PDZ- und Protease-Domäne in einem eher fixierten Zustand zueinander zu finden, dieser Zustand wird durch mehrere Interaktionen zwischen den Domänen stabilisiert. So kommt es etwa zu van-der-Waals Kontakten zwischen Tyr351 (PDZ) und Leu124, Pro183, Arg256, Tyr258 und einer Salzbrücke zwischen Glu350 und Arg253 (Wilken et al. 2004). Bei der Bindung eines aktivierenden Peptides gehen Positionen 0, -2 und -3 des Peptides spezifische Wechselwirkungen mit der PDZ-Domäne von DegS ein, so etwa das Phe an Position 0 mit einer hydrophoben Tasche aus Ile259, Thr318, Met319 und Val322. Der Rest an Position -1 (in dem Komplex aus DegS und einem -VYQF Peptid z.B. Glutamin) aber interagiert mit Thr184 aus Loop L3 der Protease-Domäne (Wilken et al. 2004).

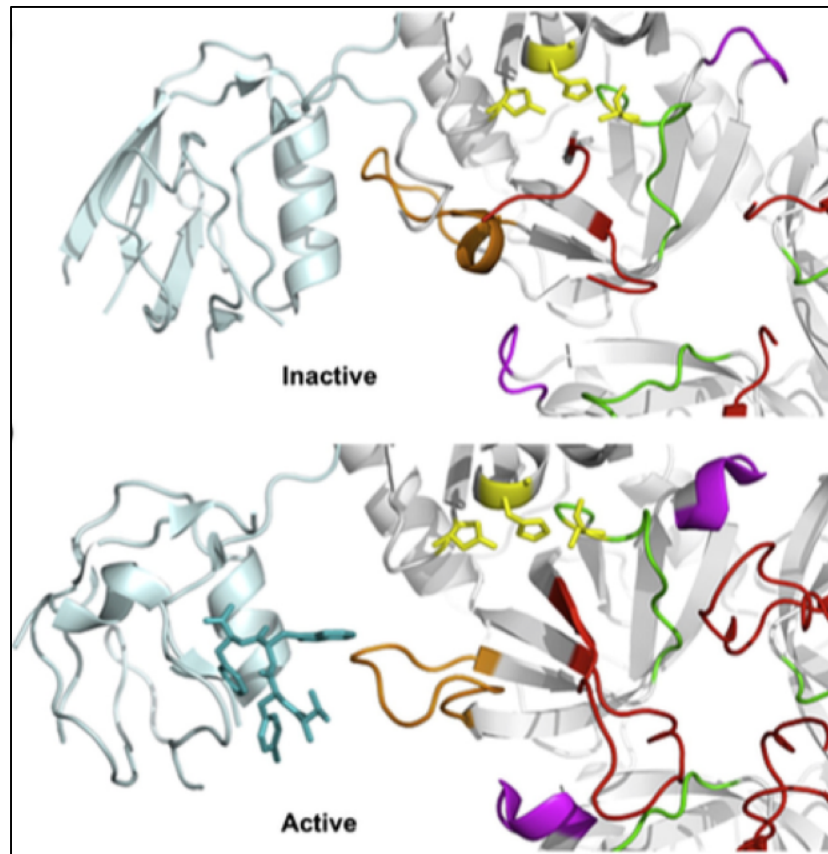


Abb. 7: Strukturelle Änderungen in DegS nach Bindung eines Aktivatorpeptides.

Im inaktiven Zustand (oben) weisen PDZ- und Protease-Domäne eine recht fixierte Anordnung zueinander aus, die durch ein Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen erhalten wird. Bei Bindung eines Aktivatorpeptides (hier VYWF, cyan) wird der C-Terminus der PDZ-Domäne aus der Furche verdrängt und Loop L3 (braun) wird durch seine Interaktion mit dem Peptid deutlich aus seiner ursprünglichen Position abgelenkt. Daraufhin ändert sich auch die Position von Loop L2 (rot), L1 (grün) und LD (lila). Diese Positionsänderungen führen sukzessive zur korrekten räumlichen Anordnung der katalytischen Triade (His96, Asp126, Ser201) und der Ausformung des *oxyanion-hole*. Dadurch liegt DegS in einem katalytisch aktiven Zustand vor (unten). Abbildung modifiziert nach (Hasenbein et al. 2010).

Durch diese Interaktion wird Loop L3 etwa 15 Å aus seiner ursprünglichen Position heraus gezogen, diese strukturelle Veränderung zieht eine ganze Kettenreaktion anderer Loop-Umlagerungen nach sich (siehe Abb. 7) und führt schließlich zur korrekten räumlichen Anordnung der katalytischen Triade His96, Asp126 und Ser201. Loops L2, L1 und LD bilden die Trypsin-ähnliche Proteasen typische Aktivierungsdomäne (Huber & Bode 1978). Auch die Position und Orientierung von His198 wird deutlich verändert, sodass sich das *oxyanion-hole* ausbilden kann. Die hydrophobe S1 Tasche (Substratspezifität) aus Ile196, Leu218 und Ser219, die in der inaktiven Form durch Leu218 blockiert ist, wird durch die Veränderungen ebenfalls frei. All diese Veränderungen zusammen bewirken die Aktivierung von DegS (Wilken et al. 2004).

Aktiviertes DegS weist eine sehr hohe Substratspezifität auf, indem es genau eine Peptidbindung in einem Substrat, nämlich RseA, zwischen Val148 und Ser149 (Walsh et al. 2003) hydrolysiert. Diese äußerst hohe Substratspezifität kann nicht alleine durch die

kleine hydrophobe S1 Tasche erklärt werden, es gibt Vermutungen, dass auch die oligomere Struktur und die Struktur des Substrates zusammen als eine Art „molekulares Lineal“ zusätzliche Spezifität bewirken (Wilken et al. 2004).

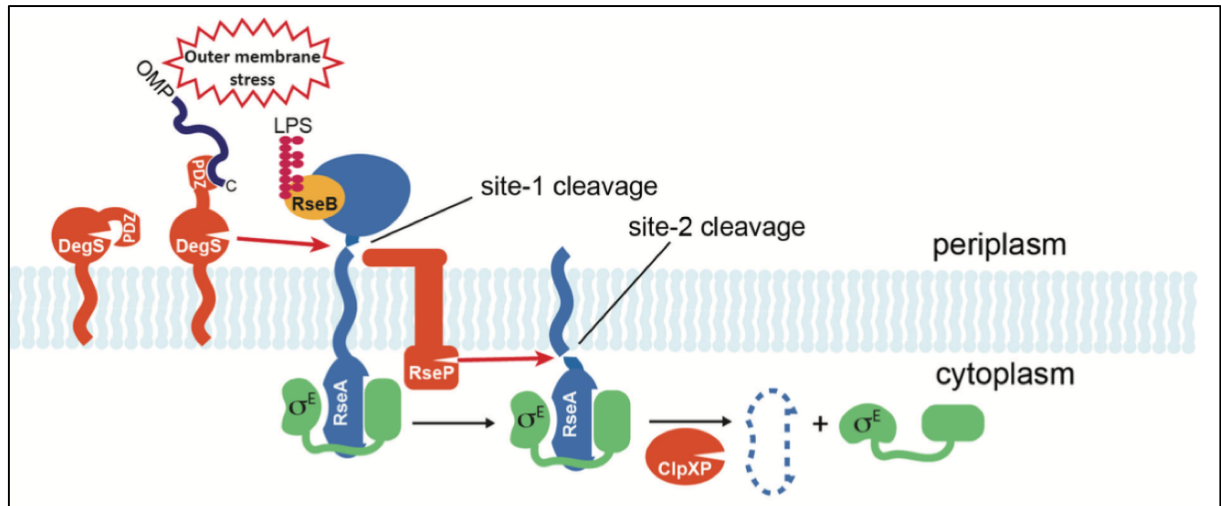


Abb. 8: Der σ^E Signalweg

Mit Implikationen von DegS, RseA, RseP, σ^E und ClpXP. Modifiziert nach (Paget 2015).

Der oben beschriebene „erste Schnitt“ (*site-1 cleavage*) durch DegS wird verhindert, solange RseB an RseA gebunden ist. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass bei Bindung von Lipopolysacchariden (LPS) an RseB die inhibierende Bindung aufgehoben wird und somit zwei verschiedene Stresssignale integriert werden müssen, damit der Signalweg aktiviert werden kann (Lima et al. 2013). Durch den ersten Schnitt ist die Erkennung des prozessierten RseA als Substrat von RseP gewährleistet (Abb. 8) und so kann der „zweite Schnitt“ (*site-2 cleavage*) durch RseP auf der cytoplasmatischen Seite durchgeführt werden (Kanehara et al. 2002; Alba et al. 2002). Bei diesem Mechanismus handelt es sich um eine sehr wichtige und anerkannte Art Signale über Membranen zu „transportieren“, man spricht von regulierter Intramembranproteolyse (RIP, *regulated intramembrane proteolysis*) (Brown et al. 2000). Auch wenn der eigentliche Sigmafaktor σ^E nun nicht mehr an die Membran gekoppelt ist, kann er trotzdem nicht seiner Aufgabe nachgehen und an die RNA-Polymerase (RNAP) binden um diese zu komplementieren, da er noch an die anti-Sigmafaktor-Domäne von RseA (RseA-ASD Komplex) gebunden ist. Das ATP-abhängige ClpXP-System ist jedoch in der Lage RseA-ASD vollständig zu degradieren und damit σ^E zu entlassen (Flynn et al. 2004).

Bakterielle Sigmafaktoren beeinflussen die Proteinproduktion innerhalb der Zelle, während σ^{70} etwa die Transkription der normalen Haushaltsgene steuert, sind alternative Sigmafaktoren wie σ^E für die Reaktion auf besondere Situationen und Stressantworten

verantwortlich. Zusammen mit den RNA Polymerasen bilden sie sog. Holoenzyme, welche dann mit der Transkription von Genen beginnen können. Dabei sind Sigmafaktoren die bestimmenden Elemente in der DNA-Bindung und steuern über ihre spezifische Interaktion mit -35bp und -10bp Elementen welche Gene abgelesen werden (Review-Artikel: (Saecker et al. 2011; Zhang & Buck 2015)). Wenig überraschend bezieht sich die Spezifität von σ^E auf Gene periplasmatischer Chaperone und Proteasen, wichtige Namen sind hier *rseA*, *degP* und *rpoE* (σ^E) selbst. Aber auch Gene biosynthetischer Enzyme werden abgelesen, die wichtige Rollen in Synthese und Transport von Lipopolysacchariden, Fettsäuren, Oligosacchariden und anderen Proteinen der Zellhülle einnehmen (Rhodius et al. 2006; Dartigalongue et al. 2001; Rezuchova et al. 2003). Weiterhin wurden Gene gefunden, deren Produkte Transkription und Translation im Allgemeinen kontrollieren. Aber auch Gene für kleine RNAs (*small RNAs*) wurden mit σ^E in Verbindung gebracht, die spezifisch die Produktion und den Transport von Außenmembranproteinen und LPS hemmen können, sodass das Stress-auslösende Signal verringert wird (Johansen et al. 2006; Thompson et al. 2007; Udekwu & Wagner 2007).

Bei Betrachtung dieser Informationen erscheint es wenig verwunderlich, dass die Funktion des σ^E Signalweges eine essentielle Aufgabe für die Lebensfähigkeit und Virulenz von *E. coli* aber auch vieler anderer Gram-negativer (und sogar einiger Gram-positiver) Bakterien übernimmt. Aufgrund seiner entscheidenden Aufgabe in dieser Signaltransduktion wird auch DegS als ein essentielles Protein vieler Bakterien angesehen. Allein schon aus diesem Grund stellt es ein geeignetes Ziel für einen antibiotischen Wirkstoff da. Seine Beschränkung auf das bakterielle Reich, die gute Erreichbarkeit im Periplasma und seine wichtige Funktion in der Virulenz von Bakterien (Brown & Gulig 2009; Redford & Welch 2006; Redford et al. 2003; Raivio 2005; Thompson et al. 2007; Sohn et al. 2009; Singh et al. 2011) wirken unterstützend für diese These.

2.3.5 Humane HTRA-Proteasen

Die vier humanen HtrA-Proteasen können aufgrund ihrer Domänen-Struktur in zwei Gruppen unterteilt werden. HTRA2 besitzt als einzige innerhalb dieser ein Transmemsegment und ist damit in der mitochondrialen Membran verankert. HTRA1, HTRA3 und HTRA4 besitzen keinen Transmembrananker, aber prozessierbare Signalpeptide (Clausen et al. 2002). Die unterschiedlichen N-terminalen Regionen der HTRA Proteasen bestimmen auch deren subzelluläre Lokalisation. In ihrem restlichen Aufbau ähneln sich die humanen HTRA Proteasen jedoch sehr stark, ihre Protease-Domänen nehmen jeweils eine Chymotrypsin-ähnliche Struktur ein und sie treten zumeist als Trimere auf. In der trimeren Struktur bilden die Protease-Domänen im Inneren eine Art Trichter aus und die PDZ-Domänen sind eher beweglich verbunden in der Peripherie zu finden. Ähnlich wie DegS liegt auch HTRA2 aufgrund seiner Membrananker ständig in der trimeren Struktur vor, HTRA1 erinnert in der oligomeren Organisation eher DegP, es bildet nach Aktivierung höhere oligomere Strukturen aus, welche den katalytisch aktiven Zustand definieren (Krojer et al. 2008).

HTRA1

HTRA1 ist wohl die am besten untersuchte humane HTRA Protease, da sie an zahlreichen medizinisch relevanten Prozessen im menschlichen Körper beteiligt ist (Abb. 9). Die Herabregulation der HTRA1 Expression ist bisher in vielen verschiedenen Arten von Krebserkrankungen nachgewiesen worden, der Verlust von HTRA1 geht mit einem verringerten Ansprechen auf Chemotherapeutika und erhöhter Migration der Krebszellen einher (Chien, Ota, et al. 2009; Chien, Campioni, et al. 2009; Chien et al. 2006). Die Hochregulation der HTRA1 Expression führte zu erhöhter Zellproliferation *in-vitro* und Tumorwachstum *in-vivo* (Baldi et al. 2002; Oka et al. 2004; Hou et al. 2005; Launay et al. 2008; Campioni et al. 2010). Seine degradierende Wirkung auf viele sekretierte Proteine in der extrazellulären Matrix (Grau et al. 2005; Grau et al. 2006; An et al. 2010; Oka et al. 2004; Tsuchiya et al. 2005) und seiner Hochregulation in vielen Patientenuntersuchungen verknüpfen HTRA1 außerdem mit Arthritis, wo es an der Degradation von Knorpelgewebe und Entzündungsprozessen beteiligt sein könnte (Milner et al. 2008).

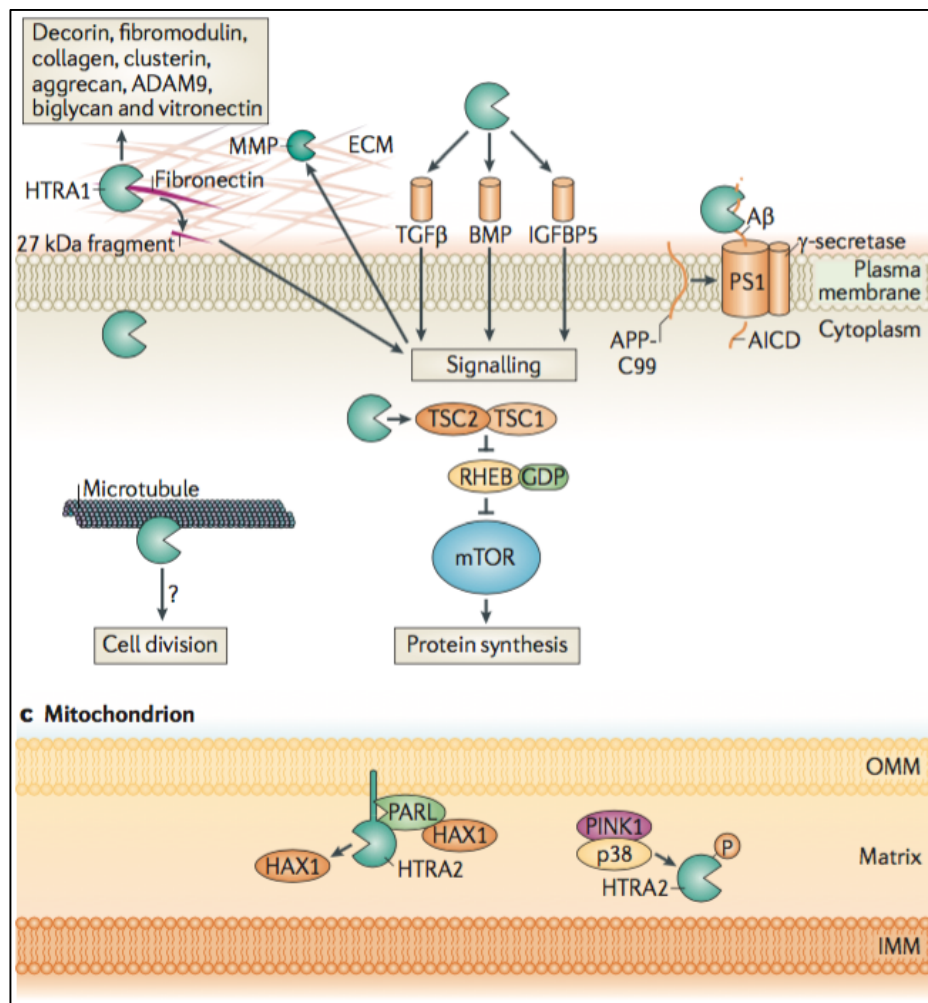


Abb. 9: Implication von HTRA1 in wichtige zelluläre Prozesse im menschlichen Körper.
Modifiziert nach (Clausen et al. 2011).

Diese Studien zeigen auch, dass HTRA1 zumindest zwei zelluläre Lokalisationen haben kann, dabei sind nur etwa 20 % des zellulären HTRA1 cytoplasmatisch verortet, größtenteils wohl an Mikrotubuli oder die Cytoplasmamembran gebunden, das restliche HTRA1 wird sekretiert. Die Regulation der subzellulären Lokalisation ist bisher unbekannt. HTRA1 liegt normalerweise als Trimer vor, die Ausbildung des Trimer wird wohl hauptsächlich durch einige N-terminale Reste der Protease-Domäne vermittelt (Truebestein et al. 2011).

Anders als die meisten anderen HtrA-Proteasen wird HTRA1 nicht über die Interaktion der PDZ-Domäne mit einem aktivierenden Peptid in den katalytisch aktiven Zustand überführt, es zeigt sich, dass das Substrat direkt mit Loop L3 interagiert (Truebestein et al. 2011), die Position von L3 verändert und sie so zusammen die Aktivierungsdomäne komplementieren (siehe Abb. 10).

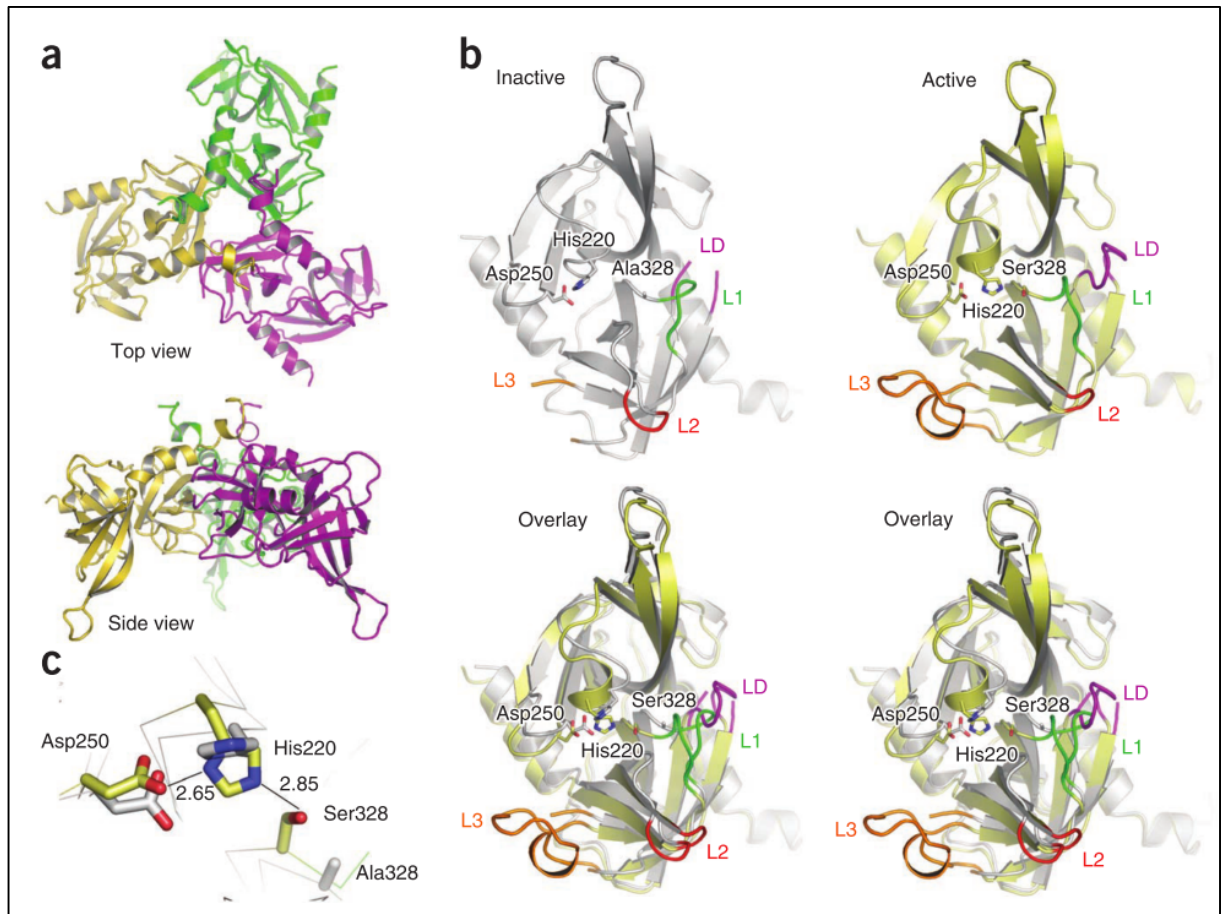


Abb. 10: Beziehung von Struktur und Aktivität bei HTRA1

(a) HTRA1 Trimer aus der Aufsicht und Seitenansicht, die Protomere (inaktive Konformation) sind in lila, grün und gelb dargestellt. Die PDZ-Domänen sind nicht dargestellt. (b) zeigt die aktive (gelb) und inaktive (grau) Konformation von HTRA1 mit den Resten des aktiven Zentrums in molekularer Darstellungsform und gefärbten funktionellen Domänen. (c) Darstellung des aktiven Zentrums in Überlagerung des aktiven (gelb) und inaktiven (grau) Zustandes. Ser328 wurde für die inaktive Konformation zu Ala328 mutiert. Abbildung entnommen aus (Truebestein et al. 2011). Die unterliegenden Strukturen können unter den *accession codes* 3NUM (inaktiv) und 3NZI (aktiv) abgerufen werden. (Truebestein et al. 2011)

Truebestein *et al.* konnten zeigen, dass die Protease-Domäne von HTRA1 aus zwei tonnenförmigen Strukturen (aus β -sheets bestehend) aufgebaut ist, und außerdem eine N-terminale und eine C-terminale Helix aufweist (Truebestein et al. 2011). Die Furche des aktiven Zentrums aus His220, Asp250 und Ser328 befindet sich zwischen den tonnenförmigen Strukturen. Die für die Aktivität wichtigen Loops L1, L2, L3 und LD weisen in der inaktiven Konformation einen sehr ungeordneten Zustand auf, was eine korrekte räumliche Anordnung von katalytischer Triade, *oxyanion hole* und S1 Substratspezifitätstasche verhindert. So wird auch, ähnlich wie in anderen HtrA-Proteasen, die Ausbildung einer katalytisch aktiven Konformation von HTRA1 verhindert. Beim Übergang in die aktive Konformation konnte ein *disorder-to-order* Übergang der Loops L1, L2, L3 und LD beobachtet werden, was zur räumlich korrekten Anordnung der katalytischen Triade führte. Ebenso konnte sich das *oxyanion hole* aus 325-327 (Positionen in der HTRA1

Peptidkette) ausbilden, nachdem die Peptidbindung zwischen Position 325 und 326 einen Konformationswechsel durchlaufen hatte. Auch wurde die Ausbildung der S1 Substratspezifitätstasche aus den Resten von Lys346 und Ile323 beschrieben, was für eine Spezifität gegenüber aliphatisch-hydrophoben Aminosäuren wie Valin oder Leucin spricht (Abb. 11).

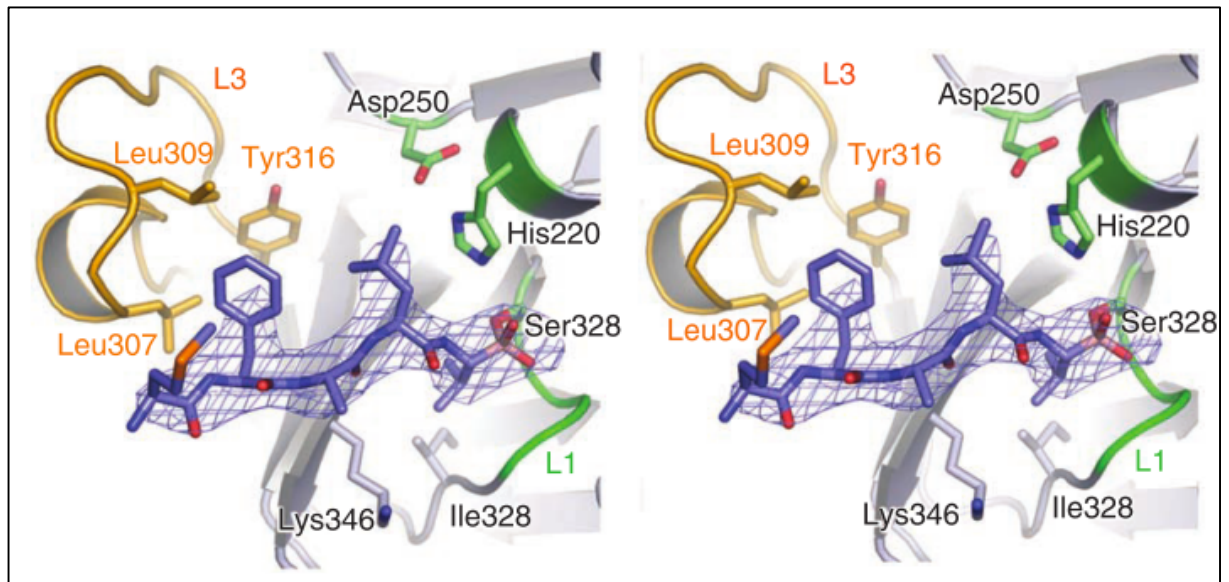


Abb. 11: Bindung eines künstlichen Substrates an das aktive Zentrum von HTRA1

Ein synthetisches (inhibitorisches) Substrat (blau, mit Elektronendichte) bindet an das aktive Zentrum von HTRA1. Die Reste der katalytischen Triade sind in grün dargestellt und Reste aus Loop L3, die hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Substrat eingehen in gelb. Verändert nach (Truebestein et al. 2011)

Weitere Daten zeigen, dass die PDZ-Domäne von HTRA1 keine direkte Rolle in der Aktivierung oder Prozessierung eines Substrates zu spielen scheint, aber doch involviert ist, evtl. um das Substrat in der richtigen Position zu halten und zur weiteren Prozessierung zu präsentieren. Wie auch schon für DegP gezeigt (Krojer et al. 2008), scheint HTRA1 über positiv geladene Reste an Liposomen zu adhären und die PDZ-Domäne könnte durch Membranadhäsion eine wichtige physiologische Rolle bei der Zellmigration übernehmen (Ajayi et al. 2008).

Poepsel *et al.* konnten kürzlich außerdem nachweisen, dass HTRA1 neben der Degradation von A β auch entscheidend in den Abbau von fibrillärem Tau eingebunden ist (Poepsel et al. 2015). Es zeigt sich, dass neben der klassischen Proteolyse von löslichem Tau auch eine von der Proteolyse unabhängige Desintegration der unlöslichen Fibrillen durch HTRA1 vermittelt wird. Es ist wahrscheinlich, dass die PDZ-Domäne auch an dieser Funktion entscheidend beteiligt ist. A β ist von entscheidender medizinischer Relevanz, etwa (neuro-)degenerativen Proteinfaltungskrankheiten.

HTRA2

HTRA2 ist ein wichtiger Faktor der Qualitätskontrolle im Intermembranbereich von Mitochondrien (Vande Walle et al. 2008; Winklhofer & Haass 2010). Obwohl viele Studien zeigen, dass HTRA2 in apoptotischen Zellen prozessiert und ins Cytoplasma entlassen wird um dort die Apoptose durch den Verdau von *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP), einem Apoptose-Inhibitor, zu unterstützen, ist die physiologische Rolle dieses Prozesses umstritten. Außerdem wird HTRA2 mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson verknüpft, diese basieren auf der Aggregation von Proteinen oder Proteinfragmenten. Entscheidende Hinweise liefern die erhöhte Expression von HTRA2 bei Proteinfaltungstress (Gray et al. 2000) und die Verknüpfung von HTRA2 mit dem Metabolismus des Amyloid β (A β) (Huttunen et al. 2007; Park et al. 2006). A β akkumuliert im Zuge der Alzheimer'schen Krankheit in Zellwänden betroffener Blutgefäßen und in senilen Plaques im Gehirn (Selkoe 2001).

Noch dazu wird die Aktivität von HTRA2 über Phosphorylierung positiv reguliert. Genauer gesagt durch den p38 Stress-Signalweg nach Interaktion mit dem mitochondrialen Protein *PTEN- induced putative kinase 1* (PINK1), welches einen direkten Bezug zur Parkinson'schen Krankheit hat (siehe Abb. 9 und Review-Artikel (Winklhofer & Haass 2010)). Die Deletion von HTRA2 in humanen Neuronen führt zur Akkumulation falsch- oder gänzlich ungefalteter mitochondrialer Proteine, erhöhter Konzentration von Sauerstoffradikalen und zu Defekten der mitochondrialen Respiration (Moiso et al. 2009).

HTRA3 und HTRA4

HTRA3 und HTRA4 sind die humanen HTRA Proteasen, über die am wenigsten bekannt ist, über die Funktion von HTRA4 gibt es sogar keinerlei wirkliche Erkenntnisse.

Funktionell scheint HTRA3 ähnlich wie HTRA1, es verdaut Komponenten der Extrazellulärmatrix, wie etwa Biglycan und Decorin (Tocharus et al. 2004), ist wichtig für die Zytotoxizität von Chemotherapeutika und in vielen Krebsarten zeigt sich eine verringerte Expression von HTRA3 durch epigenetisches *silencing* (Beleford, Rattan, et al. 2010; Beleford, Liu, et al. 2010). Andere Untersuchungen zeigen auch einen Einfluss von HTRA3 auf Schwangerschaften und bei Gebärmutterkörper- sowie Ovarialkarzinomen.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Puffer und Medien

Puffer

Western-Blot	
Transferpuffer	15 mM Tris-HCl, pH 8.3 120 mM Glycin 20 % Methanol
TBS	20 mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl
NET-G	50 mM Tris-HCl, pH 7.4 150 mM NaCl 5 mM EDTA 0,05 % Triton X-100 0,25 % Gelatine
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 9.5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Färbelösung	AP-Puffer 0,33 mg/ml NBT 0,165 mg/ml BCIP
SDS-PAGE	
MES-Laufpuffer	50 mM MES, pH 7.3 50 mM Tris 0,1 % SDS (w/v) 20 mM EDTA
Standardlaufpuffer	192 mM Glycin 33,3 mM Tris-HCl 0,1 % SDS
5 x SDS Probenpuffer	300 mM Tris-HCl, pH 6.8 10 % SDS (w/v) 40 % Glycerol (v/v) 0,4 % Bromphenolblau (w/v)
Coomassie-Lösung A	25 % Isopropanol 10 % Essigsäure 0,05 % Coomassie R250

Coomassie-Lösung B	10 % Isopropanol 10 % Essigsäure 0,005 % Coomassie R250
Coomassie-Lösung C	10 % Essigsäure 0,002 % Coomassie R250
Coomassie-Lösung D	10 % Essigsäure
Puffer A	1,5 M Tris-HCl, pH 8.8 0,4 % SDS (w/v)
Puffer B	0,5 M Tris-HCl, pH 6.8 0,4 % SDS (w/v)

Agarosegelelektrophorese

TAE	40 mM Tris-Acetat, pH 8.0 1 mM EDTA
6 x Probenpuffer	30 % Glycerol 150 mM EDTA, pH 8.0 0,3 mg/ml Bromphenolblau

Mikrobiologie

2 x TSS	20 % PEG-600 (v/v) 10 % DMSO (v/v) 100 mM MgSO ₄ in NZA-Medium
RF1-Lösung	100 mM RbCl, pH 6.8 (Essigsäure) 50 mM MnCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 30 mM CH ₃ CO ₂ K 15 % Glycerin (v/v)
RF2-Lösung	10 mM MOPS, pH 6.8 (Essigsäure) 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin (v/v)
Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0 40 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄

KOS-Puffer 1	10 mM Tris-HCl, pH 7.3 30 mM NaCl
KOS-Puffer 2	30 mM Tris-HCl, pH 7.3
KOS-Puffer 3	30 mM Tris-HCl, pH 7.3 500 μ M EDTA 40 % Saccharose (w/v)
KOS-Puffer 4	500 μ M MgCl ₂

FPLC

LEW	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0 300 mM NaCl
Ni-NTA Elutionspuffer	25 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0 150 mM NaCl 100 mM Imidazol
Ni-NTA Reinigungspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0 1 M NaCl
Gelfiltrationspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0 150 mM NaCl
Strep-Tactin Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0 1 M NaCl
Strep-Tactin Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0 300 mM NaCl 2,5 mM Desthiobiotin
Strep-Tactin Lagerungspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8.0 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Strep-Tactin Regenerationspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0 300 mM NaCl 1 mM HABA
HAP-Puffer A	50 mM HEPES 50 mM NaCl
HAP-Puffer B	29 mM KH ₂ PO ₄ , pH 8.0 471 mM K ₂ HPO ₄ 50 mM HEPES 50 mM NaCl

HAP Waschpuffer	1 M NaCl
HAP Lagerungspuffer	10 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0 10 µM CaCl ₂

Assaypuffer

DegS-Aktivitätspuffer	150 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.3 380 mM NaCl 10 % Glycerin (v/v)
Standard-Assaypuffer	150 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.3 380 mM NaCl

Massenspektrometrie

Denaturierungspuffer	8 M Urea 100 mM NH ₄ HCO ₃ in MS-Wasser
STSA	MS-Wasser 0,5 % (v/v) Ameisensäure
STSB	0,5 % (v/v) Ameisensäure in 80 % Acetonitril/MS-Wasser

Nährmedien für Bakterien

NZA	10 g/l NZ-Amine 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl
LB	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl
10 x M9-Salze	33,7 mM Na ₂ HPO ₄ 22 mM KH ₂ PO ₄ 8,55 mM NaCl
M9-Medium	1 x M9-Salze 1 mM MgSO ₄ 0,3 mM CaCl ₂ 0,05 % Casaminsäuren (w/v) (0,2 % Glucose/Lactose)

3.1.2 Stämme und Plasmide

Stämme

Name	Relevanter Genotyp	Herkunft
BW30270	rph ⁺	Datsenko und Wanner, 2002 (nicht veröffentlicht)
DH5α	<i>supE44, ΔlacU169, [Φ80lacZΔM15], hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, (res-, mod+), deo^R</i>	(Hanahan 1983)
BL21 (DE3)	<i>hsdS gal ompT_B - m_B -</i> (DE3 PlacUV5::T7 polymerase)	(Studier & Moffatt 1986)
CAG16037	MC1061 Φλ[<i>rpoH</i> P3:: <i>lacZ</i>]	(Mecsas et al. 1993)
CAG33315	MC1061 Φλ[<i>rpoH</i> P3:: <i>lacZ</i>] Δ <i>degS</i>	(Ades et al. 1999)
CAG22968	CAG16037 Δ <i>rseA nadB51::Tn10, Tet^R</i>	(Alba et al. 2002)
MC1061	<i>araD Δ(ara-leu)7697 lacX74 galU galK hsr hsn strA</i>	(Casadaban & Cohen 1980)
MM518	MC1000 (F- <i>araD139 Δ(ara-leu)7697 ΔlacYZI74 galE galK rpsL</i>)	

Vektoren

Name	Relevanter Genotyp	Herkunft
pCS19	pEQ60 mit <i>lacI^q, Amp^R</i>	Christoph Spiess (1999)
pJB001	ColA ori, T5 Promotor/lacO, Kan ^R , <i>lacI^q</i> ,	diese Arbeit
pJB002	ColA ori, pTRC-Promotor, <i>lacI^q, Kan^R</i>	diese Arbeit
pColA-Duet1	ColA ori, Kan ^R mit Amp ^R -Promotor, <i>lacI^q, T7-Promotor, 6 x His-Tag</i>	Novagen
pTRC99a	pBR322 ori, Amp ^R , trc-Promotor, <i>lacI^q</i>	(Amann et al. 1988)
pENTRY-IBA51	StarGate Klonierungssystem „Entry Vector“, Kan ^R ,	IBA, Göttingen
pCFUSE-IBA11	StarGate Klonierungsvektor für downstream GOI, Amp ^R	IBA, Göttingen
pNFUSE-IBA-LINK11	StarGate Klonierungssystem, Fusionsvektor mit 10 Aminosäuren (GSGSGSGSGS) Verbindung zwischen den GOIs, Amp ^R	IBA, Göttingen
pASG-IBAw2	StarGate Klonierungssystem „Acceptor-Vector“ für bakterielle Expression, Tet-Promotor, Amp ^R , ColE1 ori, f1 ori, <i>ompA</i> Signalsequenz	IBA, Göttingen
pASK-IBA6C	Cam ^R , Tet-Promotor, ColE1 ori, Strep-Tag II, Factor Xa site, <i>ompA</i> Signalsequenz, f1 ori	IBA, Göttingen

Plasmide

Name	Relevanter Genotyp	Herkunft
pET21_N-Strep_DegSdTM	pET21 Vektor mit <i>degS</i> ohne Transmembrandomäne und N-terminalem Strep-Tag	Melisa Merdanovic
pCFUSE_ompC_WT	pCFUSE-IBA11 mit den 50 n-terminalen Aminosäuren von OmpC (wildtypisch)	diese Arbeit
pCFUSE-ompC_mut	pCFUSE-IBA11 mit den 50 n-terminalen Aminosäuren von OmpC (mutiert, YFF)	diese Arbeit
pNFUSE_malE	pNFUSE-IBA-LINK11 mit <i>malE</i>	diese Arbeit
pENTRY_fused_WT	pENTRY-IBA51 mit Fusionsgen aus <i>malE</i> und <i>ompC</i> (wildtypisch)	diese Arbeit
pENTRY_fused_mut	pENTRY-IBA51 mit Fusionsgen aus <i>malE</i> und <i>ompC</i> (mutiert, YFF)	diese Arbeit
pASG-IBAw2_malE_ompC_WT	pASG-IBAw2 Akzeptorvektor mit Fusionsgen aus <i>malE</i> und <i>ompC</i> (wildtypisch)	diese Arbeit
pASG-IBAw2_malE_ompC_mut	pASG-IBAw2 Akzeptorvektor mit Fusionsgen aus <i>malE</i> und <i>ompC</i> (mutiert, YFF)	diese Arbeit
pLamB	pASK-IBA6C mit <i>lamB</i> (ohne Signalsequenz), CamR	Yvonne van Bürk
pOmpW	pASK-IBA6C mit <i>ompW</i> (ohne Signalsequenz), CamR	Yvonne van Bürk
pFhuA	pASK-IBA6C mit <i>fhuA</i> (ohne Signalsequenz), CamR	Yvonne van Bürk
pASK-IBA6C_MBPompCYQF	pASK-IBA6C Vektor mit <i>malE-ompC</i> WT Fusionsgen aus pASG-IBAw2_malE_ompC_WT	diese Arbeit

3.1.3 Proteine und Peptide

Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme, Puffer und benötigte Pufferzusätze wurden von der Firma New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

Enzyme

Name	Herkunft
Trypsin	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
Chymotrypsin	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
Elastase	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
DegS	diese Arbeit
DegP	Melisa Merdanovic
HtrA1	Melisa Merdanovic/Maike Breiden
RseA	Melisa Merdanovic
DNase I	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
Lysozym	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
β -Casein	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
α -Casein	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
Rinderserumalbumin (<i>Bovine serum albumin</i> , BSA)	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
Milchpulver	Roth, Karlsruhe

Peptide

Sequenz	Bedeutung	Herkunft
FFF	Aktivatorpeptid für DegS	AG Kaiser, ZMB, Essen
DNRDGNVYQF	Aktivatorpeptid für DegS	CGC, Dortmund
IVALGLVYQF	Aktivatorpeptid für DegS	IMP, Wien
GAERQVVATATRF	Aktivatorpeptid für DegS	CGC, Dortmund
ITTAGLKYTF	Aktivatorpeptid für DegS	CGC, Dortmund
VFMFSAGYRF	Aktivatorpeptid für DegS	CGC, Dortmund
QVLDRKALF	Aktivatorpeptid für DegS	CGC, Dortmund
RVKKGEFELL	Aktivatorpeptid für DegS	CGC, Dortmund
VFMFSAGYRF	Aktivatorpeptid für DegS	CGC, Dortmund
SNILPYQNTL	Aktivatorpeptid für DegS	CGC, Dortmund
DNRLGLVYQF	Aktivatorpeptid für DegS	Intavis, Tübingen
DNRLGLGYRF	Aktivatorpeptid für DegS	Intavis, Tübingen
DNRLGLVYWF	Aktivatorpeptid für DegS	Intavis, Tübingen
VYQF	Aktivatorpeptid für DegS	AG Kaiser, ZMB Essen
VYWF	Aktivatorpeptid für DegS	AG Kaiser, ZMB Essen
VFNTLPMMGKASPV-pNA	pNA Substrat für DegS	AG Kaiser, ZMB Essen
DPMFKLV-pNA	pNA-Substrat für DegP	AG Kaiser, ZMB Essen

Protein- und Nukleinsäurestandards

Name	Herkunft
Prestained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München
Unstained SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München
Blue Protein Standard Broad Range	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Protein Ladder	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Quick-Lead 2-Log DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA

Antikörper und Antiseren

Ziel des Antikörpers	Wirtsorganismus	Herkunft
Penta-His	Maus	Qiagen, Hilden, Deutschland (#34660)
Strep II-Tag	Maus	Qiagen, Hilden, Deutschland (#34850)
DegS	Kaninchen	Laborsammlung
MBP	Kaninchen	Laborsammlung
MBP-DegP	Kaninchen	Laborsammlung
OmpC	Kaninchen	Laborsammlung
RseA	Kaninchen	Laborsammlung
G6PDH	Kaninchen	Laborsammlung
GroEL	Kaninchen	Laborsammlung
DsbA	Kaninchen	Laborsammlung
SkpA	Kaninchen	Laborsammlung
SurA	Kaninchen	Laborsammlung
anti-Mouse AP	Ziege	Sigma-Aldrich, München
anti-Rabbit AP	Ziege	Dako Agilent Technologies, Glostrup, Dänemark

3.2 Chemikalien und Geräte

Die für Puffer und Lösungen benötigten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), und Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA) bezogen. Für die Puffer und Lösungen wurde hochreines Milli-Q-Wasser (vollentsalztes Wasser mit nachgeschaltetem *water purification system* (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) verwendet.

Komplettsysteme („Kits“)

Name	Hersteller
QIAprep Miniprep	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction and PCR Clean Up Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Roti-Nanoquant	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
SilverQuest Silver Staining Kit	Novex Life Technologies (Invitrogen), Carlsbad, USA
StarGate Fusion Reagent Set	IBA Lifesciences, Göttingen, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Assay Platten 96 well (transparent, schwarz mit transparentem Boden, schwarz opaque)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Deoxynucleotide Solution Mix	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Hydroxyapatite Bio-Gel HAT	Bio-Rad, München, Deutschland
NuPAGE Novex Midi Gel	Novex Life Technologies (Invitrogen), Carlsbad, USA

PVDF Membran	Amersham, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
SFCA bottle top filters 500 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Strep Tactin Superflow	Iba Lifesciences, Göttingen, Deutschland
Superdex200 26/60 prep grade	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Vivaspin (20 ml, 2 ml und 0,5 ml Volumen mit 3 – 100 kDa Größenausschluss)	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Zellulosemembran Whatman	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK

Geräte

Absaugpumpe Typ N811KM.18 KNF	Neuberger, Freiburg, Deutschland
Autoklav	BeliMed, Mühlheim am Inn, Österreich
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
DNA-Gelelektrophoresekammer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad, München, Deutschland
Feinwaage XS105 Dual Range	Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA
FPLC BioLogic Duo Flow	Bio-Rad, München, Deutschland
FPLC Äkta Explorer	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
FPLC NGC Chromatographic System	Bio-Rad, München, Deutschland
French Press	Thermo, Schwerte, Deutschland
Geldokumentation	Intas, Göttingen, Deutschland
Heizblock 1202	Alpha Industries, Cambridge, UK
Horizontalschüttler	Grant Böckler, Cambridge, UK
Inkubationsschüttler Innova 44	New Brunswick, New Jersey, USA
Magnetrührer RH basic 2	IKA, Staufen, Deutschland
Massenspektrometer Orbitrap Elite 1000	Thermo, Schwerte, Deutschland
pH-Meter	Schott, Mainz, Deutschland
PCR Cycler TPersonal	Biometra, Göttingen, Deutschland
Plattenleser Genios Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Standzentrifuge Avanti J-E	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Spektrometer Smart Spec Plus	Bio-Rad, München, Deutschland

Spektrometer Spectramax M5	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Tischzentrifuge Centrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer C mit ThermoTop	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Laborwaagen	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
Western Blot Apparaturen	Bio-Rad, München, Deutschland
Western Blot Apparaturen NuPage XCell4 Midi	Invitrogen, Carlsbad, USA

Software

Name	Hersteller
ImageJ	Wayne Rasband, NIH, USA
Photoshop CC	Adobe, San José, USA
InDesign CC	Adobe, San José, USA

Primer

Name	Interne ID	Sequenz	Zweck
ASG-Primer-for	IBA	GAGTTATTTTACCACTCCCT	Sequenzierungsprimer StarGate System
ASG-Primer-rev	IBA	CGCAGTAGCGGTAAACG	Sequenzierungsprimer StarGate System
DegS-colony-forw	554	ATGTTTGTGAAGCTCTTACGTTCCGT TGC	Kolonie-PCR auf DegS (volle Länge)
DegS-colony-rev	555	TTAATTGGTTGCCGATATTCCTGAA TGGT	Kolonie-PCR auf DegS (volle Länge)
DegS-D320A-forw	476	GCTCTGGAGACGATGGCTCAGGTGG CGGAAATTC	DegS Oligomutagenese auf Grundlage von pET21d_N-Strep-DegS-DTM
DegS-D320A-rev	477	GAATTTCCGCCACCTGAGCCATCGTC TCCAGAGC	DegS Oligomutagenese auf Grundlage von pET21d_N-Strep-DegS-DTM
DegS- Δ TM-forw-EcoR1	446	TTTTTTGAATTCAGCCTTAACCCGCTT TC	Klonierung von DegS-dTM in pASK-IBA32 über EcoR/ und Xho/ Schnittstellen
DegS- Δ TM-rev-Xho1	447	TTTTCTCGAGTTAATTGGTTGCCGGA TATT	Klonierung von DegS-dTM in pASK-IBA32 über EcoR/ und Xho/ Schnittstellen

DegS-ΔTM-SS-forw-Bgl2	449	TCTCAGATCTATGAAAAAGACAGCTA TCG	Klonierung von DegS-dTM mit ompA-SS in pJB002 über BglIII und HindIII
DegS-ΔTM-SS-forw-Sac1	448	TTTTGAGCTCATGAAAAAGACAGCTA TCG	Klonierung von DegS-dTM mit ompA-SS in pJB001 über SacI und HindIII
DegS-ΔTM-SS-rev-HindIII	450	AAGCTTTTCCTTAATTGGTTGCCGGA TAT	Klonierung von DegS-dTM mit ompA-SS in pJB001/002 über SacI/BglIII und HindIII
DegS-H198P-forw	478	GATGCTTCCATTAACCCCGGTAAGTC TGGCGG	DegS Oligomutagenese auf Grundlage von pET21d_N-Strep-DegS-DTM
DegS-H198P-rev	479	CCGCCAGAGTTACCGGGGTTAATGG AAGCATC	DegS Oligomutagenese auf Grundlage von pET21d_N-Strep-DegS-DTM
DegS-HindIII-rev	427	TCTTTTAAGCTTTTAATTGGTTGCCG G	Amplifikation von DegS aus genomischer DNA mit Schnittstellen
DegS-K243D-forw	480	CCTTTCCAGTTAGCAACCGACATTAT GGATAAGCTGATCC	DegS Oligomutagenese auf Grundlage von pET21d_N-Strep-DegS-DTM
DegS-K243D-rev	481	GGATCAGCTTATCCATAATGTGCGTT GCTAACTGGAAAGG	DegS Oligomutagenese auf Grundlage von pET21d_N-Strep-DegS-DTM
DegS-NcoI-ΔTM-forw-NEU	426	TTTTTCCATGGATGTTTGTGAAGCTC T	Amplifikation von DegS aus genomischer DNA mit Schnittstellen
DegS-NcoI-full-forw	425	TTTTCCATGGATGTTTGTGAAGCTCT	Amplifikation von DegS aus genomischer DNA mit Schnittstellen
DegS-Y162F-forw	474	GATCGGTAACCCGTTCAACCTCGGG CAGAC	DegS Oligomutagenese auf Grundlage von pET21d_N-Strep-DegS-DTM
DegS-Y162F-rev	475	GTCTGCCCGAGGTTGAACGGGTTAC CGATC	DegS Oligomutagenese auf Grundlage von pET21d_N-Strep-DegS-DTM
ENTRY-Primer-for2	IBA	GCGAAACGATCCTCGAAGC	Sequenzierungsprimer StarGate System
ENTRY-Primer-rev2	IBA	CCCCTGATTCTGTGGATAACCG	Sequenzierungsprimer StarGate System
FUSION-Primer-for	IBA	GGAATAAGGGCGACACGG	Sequenzierungsprimer StarGate System
FUSION-Primer-rev	IBA	GAGCGTCGATTTTTGTGATGC	Sequenzierungsprimer StarGate System
IBA6C-Primer-for	IBA	GAGTTATTTTACCACTCCCT	Sequenzierungsprimer pASK-IBA6C
IBA6C-Primer-rev	IBA	CGCAGTAGCCGGTAAACG	Sequenzierungsprimer pASK-IBA6C
malE_ΔSS_forw	413	AGCGGCTCTCAATGAAAATCGAAGA AGGTAAACTGGTA	Amplifikation von malE ohne Signalsequenz und STOP-Codon
malE_ΔSTOP_rev	414	AGCGGCTCTCTCCCCTTGGTGATAC GAGTCTG	Amplifikation von malE ohne Signalsequenz und STOP-Codon
OmpC_50_forw	410	AGCGGCTCTCAATGTATGTTGATGT TGGTGCTACCTACTAC	Amplifikation der letzten 50 AS von OmpC
OmpC_wt_rev	411	AGCGGCTCTTCTCCCTTAGAACTGGT AAACCAGACC	Amplifikation der letzten 50 AS von OmpC, mit wildtypischen YQF N-Terminus
OmpC_YFF_rev	412	AGCGGCTCTTCTCCCTTAGAAGAAGT AAACCAGACC	Amplifikation der letzten 50 AS von OmpC, mit mutierten YFF N-Terminus
pColA-pCS19-forw	428	CCCCTTTCATATGAATTCTTAGAAAAA CTCA	Konstruktion der Vektoren pJB001 und pJB002
pColA-pCS19-rev	429	TTTTTCTCGAGTGGTGTGCGGAATC	Konstruktion der Vektoren pJB001 und pJB002

pColA-pTRC99a-forw	430	TTTTTAAGCTTCCGCTCATGAATTAA	Konstruktion der Vektoren pJB001 und pJB002
pColA-pTRC99a-rev	431	TTTTCATATGTTGGTGTCTCGGGAAT	Konstruktion der Vektoren pJB001 und pJB002
pJB001-forw-neu	441	CCAACTGACTTAACCTTCGA	Sequenzierungsprimer für pJB001
pJB001-rev-mitInsert	445	AGGAGTCCAAGCTCAGCT	Sequenzierungsprimer für pJB001 mit Insert
pJB001-rev-neu	442	AATTAAGCTTAGTGATGGTGAT	Sequenzierungsprimer für pJB001
pJB002-DegS-forw2014	556	AAGCTGTGGTATGGCTGTGC	Sequenzierungsprimer pJB002 für ALLE Inserts, vergrößerter Read
pJB002-DegS-rev2014	557	CATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAA T	Sequenzierungsprimer pJB002 für ALLE Inserts, vergrößerter Read
pJB002-forw-neu	443	CAAACCGCCTCTCCCC	Sequenzierungsprimer für pJB002
pJB002-rev-neu	444	TTTTTCTAAGAATTAATTCATGAGC	Sequenzierungsprimer für pJB002

3.3 Methoden

3.3.1 Molekularbiologische Methoden

Allgemeines

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Methoden dieser Arbeit nach Standardmethoden (Sambrook J Maniatis T 1989) bzw. Angaben der Hersteller der jeweiligen Enzyme oder Komplettsysteme durchgeführt.

Polymeraskettenreaktion (PCR)

Für alle PCR-Reaktionen wurden Oligonukleotide von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) synthetisiert und nach firmeninternem Standard aufgereinigt. Die entsprechenden Protokolle wurden für jede Reaktion einzeln etabliert, ausgehend von den Herstellerangaben der benutzten Polymerase (*Phusion High Fidelity Polymerase*, New England Biolabs) und einer Standardanlagerungstemperatur von drei Grad Celsius unter der niedrigsten Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide. Ein typischer PCR-Ansatz bestand dabei aus ca. 10 pg *template*-DNA (z.B. Plasmid), 200 µM dNTPs und 200 nM jedes Primers. Je nach Verwendungszweck konnte das Endvolumen der Reaktion zwischen 30 und 100 µl variieren. Es wurde jeweils der mitgelieferte Puffer für die Polymerase genutzt. Die Reaktionen wurden dann in einem *Biometra T Personal Cycler* durchgeführt. Ein beispielhaftes Reaktionsschema sieht so aus:

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	zurück zu	Wiederholungen	Zweck
1	98	2'			initiale Denaturierung
2	98	15''			Denaturierung
3		20''			Anlagerung d. Primer
4	72	20''	2	30	Elongation (Polymerase)
5	72	5'			finale Elongation
6	4	∞			Lagerung

Die entstandenen Produkte aus der PCR wurden mittels Agarosegelelektrophorese (0,8-1,5% Agarose (w/v) in TAE Puffer) überprüft und konnten dann nach einer Aufreinigung mittels Komplettsystem (siehe Abschnitt 3.2) entsprechend weiterverwendet werden.

Oligomutagenese

Zur Einführung von ortsspezifischen Mutationen in ein Gen wurden zwei komplementäre Oligonukleotide (siehe Abschnitt 3.2) so generiert, dass sie im mittleren Bereich die

veränderten Nukleotide enthielten. So wurde, trotz nicht vollständig übereinstimmender Sequenz, eine Bindung an den gewünschten Sequenzabschnitt des *template*-Plasmids erreicht. In einer PCR-Reaktion wurde der DNA-Strang von diesem Primer ausgehend dann soweit erweitert, dass sich wieder ein ganzes Plasmid ergab.

Die PCR-Reaktion wurde nach Herstellerangaben (*Pfu Ultra Polymerase*, Stratagene) durchgeführt. Nach der PCR-Reaktion wurden dem Ansatz 2 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (20000 U/ml) zugesetzt, um die methylierte Ausgangs-DNA zu verdauen. Der Verdau wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Transformation kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock. Nach zweifacher Selektion entsprechend resistenter Klone und Präparation der Plasmide, wurden diese durch Kontrollverdaue (siehe Abschnitt 3.3) und Sequenzierung kontrolliert.

Restriktionsverdau und Ligation

Aufgereinigte Produkte aus PCR-Reaktionen wurden zur weiterführenden Klonierung mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Wenn es sich um DNA-Abschnitte handelte, die in einen Zielvektor eingebracht werden sollten, wurden die Vektoren ebenfalls mit Restriktionsendonukleasen verdaut, sodass komplementär überhängende Enden (*sticky ends*) entstanden. Diese *sticky ends* konnten dann mittels *Rapid Ligase* der Firma Roche zu einem erneut zirkulären DNA-Strang ligiert werden. Alle dazu verwendeten Enzyme wurden nach Herstellerangaben und mit den mitgelieferten Puffern verwendet.

In den Fällen, in denen das Komplettsystem StarGate der Firma IBA (Göttingen, Deutschland) benutzt wurde, ist auch dieses nach Herstellerangaben und mit den enthaltenen Puffern verwendet worden. Die dazu benutzten Primer sind in Abschnitt 3.3 nachzulesen.

Analog dazu konnten Restriktionsendonukleasen auch zur Überprüfung von Klonierungen per PCR und Oligomutagenesen eingesetzt werden. Hierbei wird die entsprechende DNA auch nach Herstellerangaben verdaut und die entstandenen Fragmente auf korrektes Molekulargewicht mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Neu klonierte Plasmide oder Oligomutagenesen wurden zusätzlich immer per Sequenzierung durch die Firma GATC (Köln, Deutschland) oder Seqlab (Göttingen, Deutschland) überprüft.

3.3.2 Mikrobiologische Methoden

Kultivierung von E. coli

Zu unterschiedlichen Zwecken wurden *E. coli* Kulturen in verschiedenen Nährmedien (siehe Abschnitt 3.1) angezogen. Dazu wurden zunächst kleinere Kulturen (meist 5 ml in Glasröhrchen) aus einem Transformationsansatz oder mit einer sterilen Impföse von einer Einzelkolonie angeimpft. Je nach Bedarf wurden dieser Kultur entsprechende Antibiotika (siehe Abschnitt 3.1.2) zur Selektion hinzugefügt. Diese Kulturen wurden dann über Nacht (ÜNK) bei der entsprechend beschriebenen Temperatur angezogen und dabei geschüttelt oder gedreht, um eine gute Vermischung und gleichmäßige Versorgung mit Sauerstoff in der Kultur zu gewährleisten. Am nächsten Tag konnte die ÜNK dann für den jeweiligen Versuch auf die gewünschte Zelldichte verdünnt werden. Zur Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt, da bei dieser Wellenlänge die Absorption des Nährmediums am geringsten ist. Dabei entspricht eine OD_{600} von 1 einer Zellzahl von 5×10^8 Zellen pro ml (Miller 1972).

Zur Selektion korrekter Transformanden, z.B. nach einer Klonierung, wurden Bakterien auch auf Nährmedien-Platten (entsprechendes Nährmedium mit 1,5 % (w/v) Agar und Antibiotikum, ausgehärtet) mit einem sterilen Drigalski-Spatel ausgestrichen und dann über Nacht bei einer definierten Temperatur bebrütet.

Herstellung chemisch kompetenter E. coli

Damit *E. coli* Bakterien in der Lage sind fremde DNA (z.B. ein rekombinantes Plasmid) durch die Hitzeschock-Methode aufzunehmen, mussten sie zunächst künstlich kompetent gemacht werden. Das wurde hier durch die Rubidiumchlorid-Methode erreicht.

Dazu wurden zunächst 5 ml einer Vorkultur des jeweiligen Bakterienstammes über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag wurde damit ein definiertes Volumen NZA Medium auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft. Diese Hauptkultur wurde bei 37°C bis zu einer OD_{600} von etwa 0,5 angezogen und anschließend für 10 min auf Eis abgekühlt. Diese Kultur wurde dann bei 3000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde vorsichtig in einem Drittel des ursprünglichen Kulturvolumens an eiskalter RF1-Lösung aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Bakterien abermals bei 3000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in 1/12,5 Anteil des ursprünglichen Kulturvolumens resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis konnten die nun chemisch kompetenten *E. coli* zu 50 µl aliqoutiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden.

Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* wurde ein Aliquot der benötigten Bakterien auf Eis langsam aufgetaut und mit DNA vermischt. Dazu konnten Ligationsansätze (Abschnitt 3.3.1), PCR Produkte aus Oligomutagenesen (Abschnitt 3.3.1) oder isolierte Plasmide (Abschnitt 3.3.1) benutzt werden. Der Transformationsansatz wurde dann für etwa 30 min auf Eis inkubiert, der Hitzeschock erfolgte für 1 min bei 42°C in einem Thermoblock. Daraufhin wurde das Gemisch für 2 min auf Eis abgekühlt und mit 900 µl NZA Medium versetzt, es erfolgte eine Inkubation bei 37°C und 300 rpm im Thermoblock für mindestens eine Stunde. Diese phänotypische Expression erlaubt den transformierten *E. coli* die Expression der selektionsrelevanten Antibiotikaresistenz. Die Selektion der positiven Transformanden erfolgte dann mittels Antibiotika in flüssigen oder festen Nährmedien und Inkubation über Nacht bei der gewünschten Temperatur.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit dem entsprechenden Komplettsystem der Firma Qiagen (siehe Abschnitt 3.2) oder Macherey + Nagel in der gewünschten Größenordnung nach Herstellerangaben durchgeführt.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte durch photometrische Messung der optischen Dichte einer DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm, welche dem Absorptionsmaximum von DNA entspricht. Als Referenz (*blank*) wurde das entsprechende Lösungsmittel der DNA benutzt. Als Maß für die Reinheit der DNA gilt der Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm, da bei 280 nm das Absorptionsmaximum von Proteinen und von z.B. Verunreinigungen durch Phenol liegt. Wenn der Quotient unter einem Wert von 1,8 lag, wurde die gemessene Probe als sauber angesehen.

3.3.3 Proteinbiochemische Methoden

β-Galactosidase-Assay

Zur Bestimmung der Aktivität von DegS in *E. coli* Bakterien und dem Einfluss von bestimmten *Compounds* auf diese, wurde die spezifische β-Galactosidase-Aktivität im Lysat behandelter Bakterien gemessen (Miller JH 1972).

Dazu wurden *E. coli* CAG16037 Bakterien (Reporterstamm) frisch am Vortag eines jeden Experimentes mit dem entsprechenden Stressplasmid (siehe Abschnitt 3.1.2) transformiert. Dieser Reporterstamm besitzt eine Kopie des Genes für β-Galactosidase unter Kontrolle eines σ^E spezifischen Promotors. So ist die Menge der produzierten β-Galactosidase proportional zur Aktivität des σ^E -Signalweges und so auch zur Aktivität von DegS. Nach der phänotypischen Expression in NZA-Medium wurden die Bakterien zentrifugiert (3000 x g, 10 min bei RT) und das Pellet in 5 ml M9-Minimalmedium (mit 0,05 % Casaminoäuren und 0,2 % Glucose) mit der halben Standardkonzentration des entsprechenden Antibiotikums aufgenommen. Die Bakterien wurden dann über Nacht bei 30°C rollend inkubiert und selektioniert. Am folgenden Tag wurden Hauptkulturen mit den ÜNK auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und im Rundschüttler bei 230 rpm und 30°C inkubiert. Je nach Experiment wurde den Kulturen nach 90 min eine definierte Menge des zu untersuchenden *Compounds* zugegeben und nach 30 min weiterer Inkubation Stress durch Induktion des Stressplasmides mit 10 ng/ml (Endkonzentration) Anhydrotetracyclin (AHT) ausgelöst. Nach 90 min weiterer Inkubation konnte die Messung der β-Galactosidase-Aktivität durchgeführt werden.

Dazu wurde zunächst die OD₆₀₀ aller Kulturen bestimmt. Dann wurden in Dreifachansätzen jeweils 40 µl der Kulturen in Reaktionsgefäße überführt. Dann wurden jeweils 460 µl Z-Puffer (siehe Abschnitt 3.1), 25 µl Chloroform und 25 µl SDS (0,1 % w/v) hinzugegeben und mittels Vortex sehr gut vermischt. Nach 10 min Inkubation bei RT hatte eine Lyse der Bakterien stattgefunden und es wurden jeweils 100 µl eines künstlichen Substrates der β-Galactosidase (ONPG-Lösung; 4 mg/ml) zugegeben. Die Ansätze wurden dann bei 37°C und 300 rpm im Thermoblock inkubiert. Je nach Verfärbung des Ansatzes wurde die Reaktion nach 10 bis 120 min durch Zugabe von 250 µl eiskalter Na₂CO₃-Lösung (1 M) gestoppt und die Intensität des Farbumschlages durch Messung der Extinktion bei 420 nm gegenüber einer Pufferreferenz bestimmt.

Die spezifische β-Galactosidase-Aktivität in nmol/min x ml ergibt sich aus der folgenden Formel:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\Delta E_{420} \times \text{Vol}_{\text{End}}}{OD_{600} \times t \times d \times \varepsilon \times \text{Vol}_{\text{Zellen}}}$$

ΔE_{420} : gemessene Extinktionsänderung der Reaktionslösung bei 420 nm

OD_{600} : optische Dichte der Bakterienkultur bei 600 nm

Vol_{End} : Endvolumen des Reaktionsansatzes

Vol_{Zellen} : eingesetztes Volumen der Kultur

t: Reaktionszeit in Minuten

d: Schichtdicke der Küvette (1 cm)

ϵ : Extinktionskoeffizient von o-Nitrophenol ($0,0045 \text{ ml} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

Gesamtproteinisolierung aus E. coli

Ein Volumen, welches 1 ml bei OD_{600} von 0,5 entspricht, wurde aus einer Kultur entnommen und für 5 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 80 μl *A. dest.* aufgenommen und mit 20 μl 5 x SDS-Probenpuffer mit 30 mM DTT versetzt, gut gemischt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Im Anschluss konnte die Probe als SDS-Proteinprobe verwendet werden und etwa durch gelelektrophoretische Auftrennung analysiert werden.

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Proben wurde das kolorimetrische Verfahren nach Bradford angewandt (Bradford 1976). Dieses beruht auf einer Absorptionsänderung des Farbstoffes Coomassie Blau bei Bindung an Proteine. Daraus ergibt sich eine Veränderung der Absorption, proportional zu der Proteinkonzentration in Lösung.

Hier wurde dazu das Reagenz Roti-Nanoquant (Carl Roth GmbH) verwendet. In einer 96-well Platte wurden dazu 50 μl des verdünnten Proteins mit 200 μl des Reagenzes vermischt. Nach kurzer Inkubation wurde die Absorption bei 450 und 590 nm bestimmt. Eine lineare Beziehung ergibt sich dann aus dem Quotienten OD_{590}/OD_{450} und der Proteinkonzentration. Als Standard wurde eine Reihe Lösungen von Rinderserumalbumin (BSA) in bekannten Konzentrationen verwendet.

Proteinkonzentrationsbestimmung mit Bicinchoninsäure

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösung konnte außer der Bradford-Methode eine weitere Methode über die kolorimetrische Quantifizierung von Bicinchoninsäure-Komplexen (engl. *bicinchoninic acid*, BCA), 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure, verwendet werden (Smith et al. 1985; Wiechelman et al. 1988; Stoscheck 1990; Anon 1987). Dabei reagieren zweiwertige Kupfer-Ionen in der der Lösung mit Proteinen zu einwertigen Ionen. Diese einwertigen Ionen führen dann zu einer Komplexbildung von Bicinchoninsäure-Molekülen zu einem violetten Farbstoff, dessen Absorption kann bei 562 nm bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde ein Komplettsystem der Firma Thermo Scientific (BCA Protein Assay Kit) nach Herstellerangaben verwendet.

Kalter osmotischer Schock

Der kalte osmotische Schock (Neu & Heppel 1964) wurde durchgeführt um periplasmatische Extrakte zu gewinnen und diese dann in weiteren Verfahren zu untersuchen.

Dazu wurden z.B. 50 ml der zu untersuchenden Kultur zentrifugiert (4000 x g, 10 min, RT) und das Pellet daraufhin in einem Zehntel des ursprünglichen Kulturvolumens an KOS-Puffer I gewaschen (siehe Abschnitt 3.1). Nach erneuter Zentrifugation wurde das gewonnene Pellet in einem Zwanzigstel des ursprünglichen Kulturvolumens KOS-Puffer II vorsichtig aufgenommen und unter kontinuierlicher Durchmischung für 15 min inkubiert. Dann wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zügig in einem Zwanzigstel des ursprünglichen Kulturvolumens KOS-Puffer III aufgenommen, 10 weitere min auf Eis gerührt und dann erneut zentrifugiert. Nun enthielt der Überstand die periplasmatischen Bestandteile und konnte abgenommen werden, bis zur weiteren Verwendung wurde die Probe aliquotiert und bei -80°C gelagert.

SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Zur größenabhängigen Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde das von Laemmli eingeführte Verfahren der SDS-PAGE verwendet (Laemmli 1970). Dabei werden Proteine durch Aufkochen nach Behandlung mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert, zusätzlich können Disulfid-Brücken durch die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) reduziert werden. Die entstandenen Aminosäureketten werden aufgrund der Überlagerung mit negativen Ladungen in einem elektrischen Spannungsfeld nach ihrer Größe aufgeteilt, was auf ihrem Migrationsverhalten innerhalb der Polyacrylamid-Matrix beruht.

Ein dazu genutztes Gel bestand aus zwei Teilen, einem Trenngel mit 10-15% Polyacrylamid und einem Sammelgel mit 6% Polyacrylamid. Die Gele unterscheiden sich maßgeblich in ihren pH-Werten und der Ionenzusammensetzung. Die Auftrennung von Proteinproben erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150 V.

Je nach den experimentellen Voraussetzungen konnten entstandene Proteinbanden darauf folgend per Coomassiefärbung (siehe Abschnitt 3.3.3), Silbernitratfärbung (siehe Abschnitt 3.3.3) oder Western-Blot mit anschließender Immundetektion sichtbar gemacht werden. Unabhängig vom Detektionsmechanismus wurden die Gele dann mit einem handelsüblichen Scanner und mitgelieferter Software digitalisiert und zur übersichtlicheren Darstellung mit Photoshop (Adobe) und InDesign (Adobe) weiterverarbeitet.

Coomassiefärbung

Bei dieser Methode werden Proteinbanden in einem SDS-Gel gleichzeitig fixiert und blau gefärbt. Dazu wurde das Gel zunächst 1 min in Lösung A (siehe Abschnitt 3.1.1) in der Mikrowelle erhitzt (400 W) und darauf folgend für 5 – 10 min bei RT schüttelnd inkubiert. Dann wurde es für jeweils 1 min in den Lösungen B, C und D aufgekocht und dann zum Entfärben weiter in Lösung D geschwenkt bis der Hintergrund wieder transparent und die Proteinbanden blau zu erkennen waren.

Silbernitratfärbung

Die Silbernitratfärbung kam immer dann zum Einsatz, wenn die Proteinkonzentration in den Proben unterhalb der Nachweisgrenze für Coomassie lag (Kerényi & Gallyas 1973; Merrill et al. 1979; Switzer et al. 1979; Rabilloud et al. 1988). Die Nachweisgrenze der Silbernitratfärbung liegt bei 0,1 ng bis 1 ng pro Bande. Das Verfahren beruht auf der Anlagerung von Silber Ionen an negativ geladene Seitenketten der Proteine. Nach mehreren Waschschritten werden die Ionen durch Zugabe von Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert, dieses fällt aus und bildet schwarze, gut sichtbare Banden. Zur Silbernitratfärbung wurde hier das Komplettsystem SilverQuest (siehe Abschnitt 3.2) nach Herstellerangaben verwendet.

Western-Blot

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Immundetektion wurden diese von einem Gel nach SDS-PAGE mit Hilfe einer *Blotting* Apparatur in einem elektrischen Spannungsfeld auf eine PVDF Membran übertragen (Renart et al. 1979; Towbin et al. 1979). Zuvor wurden Gel, *Whatman* Filterpapiere und die PVDF Membran in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF Membran wurde zusätzlich noch durch eine Inkubation in 100% Methanol für eine Minute aktiviert. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte durch *Tankblot* oder *Semidry Blot*. Im Fall des *Tankblot* wurden dem Transferpuffer 20% Methanol (v/v) zugesetzt und der Transfer bei 100 V für eine Stunde durchgeführt. Für den *Semidry Blot* wurden 10% Methanol (v/v) im Transferpuffer benötigt. Der Transfer erfolgte hier mit 18 V pro Gel über 18 min oder 70 mA über 45 min. Der Erfolg des Transfers ließ sich anhand eines transferierten vorgefärbten Proteinstandards erkennen. Die PVDF Membran wurde anschließend mit 3% BSA (w/v) bzw. 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C schüttelnd blockiert, um nicht abgesättigte Bindestellen der Membran zu besetzen. Welches Transfersystem und Blockierungsreagenz am besten verwendet wird, unterscheidet sich für jeden Antikörper und musste einzeln ermittelt werden.

Nach Transfer und Blockierung der ungesättigten Bindestellen der Membran wurde diese mit dem Primäantikörper gegen das zu detektierende Protein inkubiert. Dieses erfolgte in

einer spezifischen Verdünnung in TBS-T mit 3% BSA (w/v) oder 5% Milchpulver (w/v). Die Primärantikörperlösung konnte mehrfach verwendet werden, dazu wurde sie mit 0,05% Natriumazid versetzt und bei 4°C gelagert. Die Inkubation der Membran in der Primärantikörperlösung erfolgte für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Horizontalschüttler. Dann wurde die Membran drei Mal für fünf min in TBS-T gewaschen und dann für eine Stunde in einer Sekundärantikörperlösung inkubiert, der Sekundärantikörper war hierbei mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert. Wieder wurde die Membran drei Mal für fünf Minuten in TBS-T gewaschen und dann in AP-Puffer äquilibriert. Die Entwicklung erfolgte durch Zugabe der AP-Färbelösung (siehe Abschnitt 3.1.1) und schüttelnder Inkubation. Dabei setzt die Alkalische Phosphatase 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) zusammen mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zu einem violetten bis blauen Farbstoff um: Das Tetrazolium-Salz oxidiert Indoxyl zum blauen Indigo-Farbstoff. Dabei wird das Tetrazolium-Salz zum blauen Formazan-Farbstoff reduziert. Dieser schlägt sich an der entsprechenden Stelle auf der Membran nieder. Bei ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch Waschen mit *A. dest.* abgestoppt und die Membran getrocknet. Eine getrocknete Membran konnte wie oben digitalisiert und das Abbild weiterverarbeitet werden.

Kolorimetrische Aktivitätsbestimmungen von DegS und HTRA1

Zur Aktivitätsbestimmung von Proteasen konnten kolorimetrische Assays auf Basis von para-Nitroanilin (pNA) - Absorption durchgeführt werden. Dazu wird die Entwicklung der Gelbfärbung zeitlich aufgelöst verfolgt. In der Abb. 12 ist der Reaktionsmechanismus am Beispiel von DegS dargestellt.

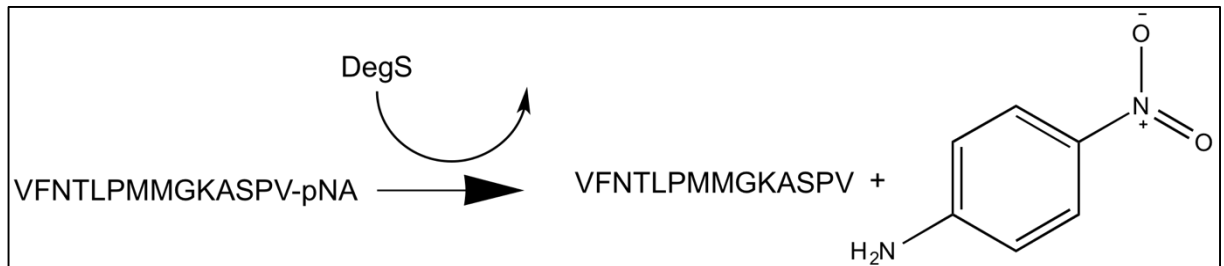


Abb. 12: Reaktionsmechanismus pNA-Assay am Beispiel von DegS

In der Reaktion wird ein spezifisches Substrat so durch die Protease (hier DegS) geschnitten, dass para-Nitroanilin (pNA) frei wird. Dieses kann durch die Absorption bei 405 nm quantifiziert werden.

Dazu muss in dem pNA-Substrat die Sequenz des natürlichen Substrates so nachempfunden werden, dass durch die spezifische Hydrolyse einer Peptidbindung (hier: zwischen Val148 und Ser149 RseA bzw. zwischen V14 und pNA im Substrat) freies para-Nitroanilin entsteht. Die Absorption von freiem pNA bei 405 nm ist in einem gewissen Bereich proportional zur Konzentration und kann so als Maß für die Menge des bereits umgesetzten Substrates angesehen werden.

In der Praxis wurden zunächst, ähnlich wie im Verdauassay, alle Komponenten (bis auf das Substrat) im jeweiligen Puffer vermischt und für etwa zehn Minuten bei 37°C in einer transparenten 96-well Platte mit planarem Boden vorinkubiert. Dann wurde das Substrat hinzugefügt und der ganze Reaktionsansatz durch Schütteln bei 1000 rpm für etwa 30 sec gut durchmischt. Daraufhin wurde die Platte möglichst schnell in das Plattenlesegerät (Tecan Genios Pro) überführt und die Reaktion für zwei bis vier Stunden bei 37°C und minütlichem Auslesen der OD₄₀₅ verfolgt. Aus den linearen OD-Steigungen zu Beginn der Reaktionen konnte V₀ nach der folgenden Formel bestimmt werden.

$$V_0 = \frac{\Delta E_{405} \times Vol_{End}}{c \times \epsilon \times t} \times \frac{1}{0.35 \text{ cm}}$$

ΔE_{405} : Extinktionsänderung bei 405 nm über den Messungszeitraum

Vol_{End}: Endvolumen des Reaktionsansatzes (ml)

c: Konzentration des zu untersuchenden Proteins im Reaktionsansatz (mg/ml)

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient des pNAs (8.800 M⁻¹ x cm⁻¹)

t: Messzeit in Minuten

Verdauassays zur qualitativen Aktivitätsbestimmung von Proteasen

Um die Aktivität von Proteasen möglichst unter physiologisch relevanten Bedingungen zu testen, wurden jeweils Substrate gewählt, welche dem *in-vivo* Substrat der jeweiligen Protease möglichst ähnlich waren. Dazu wurde z.B. bei DegS der periplasmatische, also lösliche, Anteil von RseA (Aminosäuren 121 – 216; N-terminaler His-Tag und C-terminaler FLAG-Tag) benutzt. Es handelte sich um das gleiche Protein, das auch für den *High-Throughput-Screen* bei LDC (Dortmund) eingesetzt wurde, und von M. Merdanovic kloniert und aufgereinigt wurde.

Für den Versuch wurden zunächst die indizierte Menge Protein, Puffer und evtl. ein potentieller Inhibitor/Aktivator vermischt und für etwa zehn Minuten bei 37°C vorinkubiert. Im Falle von DegS musste außerdem ein Aktivatorpeptid hinzugefügt werden. In Ausnahmefällen, oder wenn zwei *Compounds* parallel verwendet werden sollten, konnte sich die Reihenfolge der Komponentenzugaben ändern, dies ist dann entsprechend gekennzeichnet. Nach der Vorinkubation wurde das Experiment durch Zugabe des Substrates gestartet und sofort eine Probe des Ausgangszustandes entnommen. Im Normalfall wurde eine Probe von 15 µl entnommen und sofort in einem frischen Reaktionsgefäß mit 5 µl bereits vorgelegtem 5 x SDS-Probenpuffer und 1 µl DTT (1M) vermischt und dann etwa zehn Minuten bei 95°C zur Denaturierung inkubiert. Zur Analyse wurden die Proben dann auf ein 10 % Bis-Tris Polyacrylamid Gel aufgetragen und im elektrischen Spannungsfeld elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt. Nach Coomassie- oder Silbernitratfärbung (siehe Abschnitt 3.3.3) konnten die Gele weiter analysiert werden.

Inhibitorscreening LDC

Das Screening auf inhibitorische Substanzen für HTRA1 und DegS wurde auf einer automatisierten Plattform am *Lead Discovery Center* (LDC GmbH, Dortmund) durchgeführt. Dazu kam die AlphaScreen Technologie von Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts, USA) zum Einsatz. Das Funktionsprinzip dazu ist in Abb. 13 zu sehen.

An das intakte Substrat (hier RseA) werden *donor*- und *acceptor bead* gekoppelt, diese sind mit Fluorophoren ausgestattet. Durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 680 nm wird der *donor bead* angeregt, bei räumlicher Nähe zum *acceptor bead* wird die eingestrahlte Energie über Sauerstoff-Radikale übertragen und durch den *acceptor bead* wieder als Licht einer bestimmten Wellenlänge ausgestrahlt. Wurde das Substrat zuvor durch das zu untersuchende Enzym hydrolysiert, ist die erforderliche räumliche Nähe für die Energieübertragung nicht gegeben und es kann keine Emission von Licht ausgelesen werden. Die Technologie misst also die Integrität eines Moleküls über räumliche Nähe.

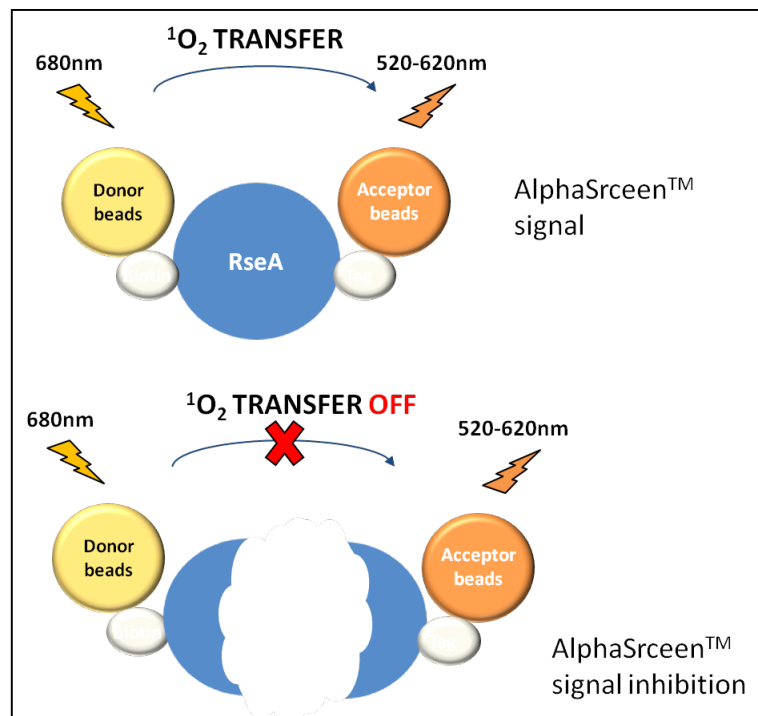


Abb. 13: Funktionsprinzip der AlphaScreen Technologie von Perkin-Elmer.

Das Substrat (hier RseA) wird mit einem *Donor*- und einem *Acceptor-bead* markiert. Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 680 nm kommt es zur Anregung des *Donor-beads*, bei räumlicher Nähe zum *Acceptor-bead* kommt es zur Signalübertragung per $^1\text{O}_2$ wodurch das *Acceptor-bead* wiederum Licht einer definierten Wellenlänge ausgibt. Ist die räumliche Nähe (etwa durch Degradation des Substrates) nicht gegeben, findet keine Signalübertragung statt. (Quellen: LDC, Perkin-Elmer)

Das Assay wurde mit 37,5 μM Boc-FFF-OH, 18 nM His-RseA-FLAG2 und 75 nM DegS (Strep-Tag II) in 150 mM NaH_2PO_4 (pH 8,3), 380 mM NaCl, 0,05% Triton X-100 durchgeführt. Die AlphaScreen *beads* wurden auf 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt. Insgesamt wurden etwa 185 000 *Compounds* der Firmen Polyphor Ltd., Vichem Chemie Ltd., BioFocus DPI und einer hauseigenen Bibliothek getestet. *Compounds* die zu einer DegS-Restaktivität von weniger als 70 % führten wurden zur manuellen Überprüfung ausgesucht. So wurden insgesamt 54 primäre *hits* aus dem *Screen* zum ZMB überführt und diese in den beschriebenen Assays getestet. Von aktiven *Compounds* wurden weitere Derivate (siehe Teil Ergebnisse) übergeben und getestet um Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufbauen zu können und die aktivsten Verbindungen bestimmen zu können.

3.3.4 Massenspektrometrie

Probenvorbereitung für Massenspektrometrie

Je nach Applikation mussten Proben für die weitere Analyse per Massenspektrometrie auf unterschiedliche Weisen vorbereitet werden. Die Probenvorbereitung und Durchführung der Messungen wurde unterstützt durch Dr. Farnusch Kaschani und Svenja Blaskowski (beide AG Kaiser, ZMB, Essen).

Zur Feststellung des genauen Ortes einer kovalenten Modifikation eines Proteins durch einen *Compound* wurde zunächst das entsprechende Protein mit einem molaren Überschuss des *Compounds* (10 -100 x) in dem indizierten Puffer bei 37°C für 10 Minuten vorinkubiert, sodass sich eine kovalente Modifikation ausbilden konnte. Daraufhin wurde das Protein durch die Zugabe von 8 M Urea in 100 mM Ammoniumbicarbonat und DTT (20 mM) denaturiert (30 min, 37°C und 800 rpm). Es erfolgte eine weitere Behandlung mit 25 mM Indol-3-essigsäure und weitere Inkubation für 30 min. Zu den Proben wurden dann jeweils 2 ng des Enzyms LysC gegeben, um das denaturierte Protein soweit vor zu verdauen, dass es bei einer Verdünnung des Ureagehaltes nicht mehr zu einer spontanen Renaturierung kommen konnte. Diese Behandlung erfolgte bei 37°C und 500 rpm für etwa drei Stunden. Darauf folgend wurde der Ureagehalt mit 100 mM Ammoniumbicarbonat auf eine Konzentration von 1 M herunter verdünnt und der Verdau durch 2 ng Trypsin konnte über Nacht (mindestens 17 h) bei 37°C und 500 rpm erfolgen.

Nach dem Verdau mussten die entstandenen Peptide für die Auftrennung per Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometer noch weiter aufgereinigt werden. Dazu wurden sie auf sogenannte *StageTips* (Material: Empore™ Octadecyl C18 47mm Extraction Discs 2215, Firma 3M, Minnesota, USA) gebunden und im gewünschten Lösemittel eluiert. Zunächst wurden die StageTips jedoch mit 50 µl Methanol (100 %, höchst reine Qualität) äquilibriert, der Durchfluss wurde durch Zentrifugation für etwa 10 min bei 1000 rpm erreicht. Eine weitere Äquilibration erfolgte durch Zugabe von 50 µl STSB und 50 µl STSA (siehe Abschnitt 3.1). Dann konnte die Probe auf die StageTips aufgetragen werden, die Peptide wurden dann durch Zentrifugation auf das Material gebunden und der Durchfluss aufgefangen. Es folgte ein Waschschriff mit 50 µl STSB, auch dieser Durchfluss wurde aufgefangen. Die Elution erfolgte mit 50 µl STSA und Zentrifugation. Die so eluierten Proben wurden in einer SpeedVac (Firma Eppendorf) eingedampft und auf einheitliche 12 µl aufgefüllt (0,1 % Ameisensäure in höchstem MS-Wasser), bei 37°C und 1000 rpm für 7 min gelöst und dann in die Platte für den AutoSampler am Massenspektrometer überführt.

Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Für die massenspektrometrischen Analysen wurden, je nach Experiment, unterschiedliche Einstellungen der benutzten Geräte verwendet. Alle Experimente wurden auf einer OrbiTrap Elite (Thermo Scientific) durchgeführt. Vorgeschaltet war jeweils eine Thermo Easy-nLC 1000 Flüssigkeitschromatographie mit selbstgepackten Säulen mit einer Länge von 23 bis 25 cm. Diese beinhalteten Reprosil-Pur 120 C18-AQ (Dr. Maisch GmbH) Material mit einer Porengröße von 120 Å und einem Partikeldurchmesser von 3 µm. Die Säule wurde in einem PRSO-V1 (Sonation GmbH) Säulenofen auf einer konstanten Temperatur von 30°C gehalten, für die Untersuchung der Modifikationen durch ChemDiv #3470-5614 betrug die Säulentemperatur während des Laufes 45°C. Die Elution der Peptide vom Säulenmaterial erfolgte meist mit einem langen Gradienten (etwa 120 min) von 0,1 % Ameisensäure in ultra-reinem Wasser zu 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril.

Die Auswertung der Messdaten wurde kleinschrittig über verschiedene Software-Programme vorgenommen. Dabei erfolgte die Aufzeichnung und Verarbeitung der Rohdaten über die herstellereigene Spektrometer-Software, Vergleiche großer Datenmengen und Abgleich mit Peptiddatenbanken über MASCOT Software (Matrix Science, Boston, USA) und die Qualität der gewonnenen Daten wurde mittels *Raw Meat* (VAST Scientific) überprüft. Die MASCOT Datenbank wurde im Normalfall mit den folgenden Parametern durchsucht; Typ der Suche: MS/MS Ion Source, Enzyme: Trypsin, Variable Modifikationen: Oxidation (M) + experimentabhängige Modifikation, Mass values: monoisotopic, Protein mass: unrestricted, Peptide mass tolerance: +/- 10 ppm, Fragment mass tolerance: +/- 0,35 Da, Instrument type: ESI-TRAP. In einigen Experimenten wurde die Auswertung auch alternativ in der Software MaxQuant (Cox & Mann 2008) durchgeführt, Ergebnisse wurden dann vergleichend diskutiert. Ebenso wurden manche Auswertungen auch in der Software Andromeda (Cox et al. 2011) parallel ausgeführt.

LC-MS Analysen (wie Reinheits- und Stabilitätsbestimmungen von *Compounds*) wurden an einem LC-MS-System von Thermo Scientific mit einer Eclipse XDB-C18-Säule (Partikelgröße 5 µm) von Agilent (Signaldetektion bei 210 nm) und einem Thermo Scientific LCQ Fleet™ ESI-Spektrometer durchgeführt. Für die hier angewandten Messungen wurde ein linearer Gradient von Lösungsmittel B (0.1 % Ameisensäure in Acetonitril) und Lösungsmittel A (0.1 % Ameisensäure in Wasser) bei einer Flussrate von 1 mL/min verwendet (0 min / 10 % B -> 1 min / 10 % B -> 10 min / 100 % B -> 12 min / 100 % B -> 15 min / 10 % B).

3.3.5 Proteinreinigung

Anzucht des Überexpressionsstammes BL-21/pET21_N-Strep-DegS-dTM (bzw. Punktmutanten)

Für die Anzucht des Überexpressionsstammes wurde zunächst ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* Zellen des Stammes BL-21 mit 2 µl des entsprechenden Plasmides per Hitzeschock-Methode (siehe Abschnitt 3.3.2) transformiert und auf einem Selektivmedium ausgestrichen. Nach Bebrütung über Nacht bei 37°C wurde mit einer Einzelkolonie eine Vorkultur mit einem Volumen von etwa 200 ml des entsprechenden Selektivmediums (meist NZA + Ampicillin) angeimpft und wiederum über Nacht auf einem Rundschüttler (innova 44; New Brunswick Scientific) bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde dann die Hauptkultur 1:100 angeimpft. In den meisten Fällen handelte es sich um 3 x 2 L Medium in je 5 L Schikane Kolben, so wurde eine bessere Durchmischung und Sauerstoffversorgung gewährleistet. Die Inkubation erfolgte weiterhin wie oben beschrieben, bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,5 erreicht war. Die Induktion der Überexpression durch Zugabe von 20 µM IPTG (Endkonzentration) in das Medium erfolgte dann für fünf Stunden. Vor und nach Ende des Überexpression sollte Proben der einzelnen Kulturen zur Überprüfung der Überexpression entnommen werden. Die Bakterien wurden dann per Zentrifugation bei 8000 x g, 4 °C für 10 Minuten (Avanti J-E, Beckman-Coulter) geerntet und das Pellet, welches alle Bakterien mit dem überexprimierten Protein enthalten sollte wurde dann entweder in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Zellaufschluss

Zur Aufreinigung des überexprimierten DegS aus den Bakterien musste zunächst das bakterielle Pellet in 50 ml LEW-Puffer (siehe Abschnitt 3.1) aufgenommen und nach Zugabe von RNase I, Lysozym und DNase durch rollende Inkubation bei 4°C für den Zellaufschluss vorbereitet werden. Diese Vorbereitung erleichtert den Zellaufschluss und beugt einer Schleimbildung durch den Abbau von RNA und DNA in der Probe vor.

Der eigentliche Zellaufschluss erfolgte dann per French-Press (FA-032, Firma Thermo Electron Company; jetzt Thermo Scientific) in fünf bis zehn Durchgängen bzw. bei kleineren Volumina per Sonifikation. Die Trennung der löslichen Proteine von den Zelltrümmern erfolgte durch Zentrifugation bei 50000 x g, 4°C für 45 Minuten (Avanti J-E, Beckman-Coulter). Der Überstand enthielt dann das Proteinrohextrakt und konnte weiter aufbereitet werden. Auch vom Proteinrohextrakt wird eine Probe für spätere Analysen entnommen

DegS-Reinigung über Strep-Tactin, Hydroxylapatit und Gelfiltration

Zur Reinigung von Proteinen wurde die automatisierte FPLC-Anlage Äkta von GE Healthcare verwendet. Als Leersäule zum Packen von Strep-Tactin Superflow Material der Firma IBA Lifetechnologies wurde eine Laborsäule XK-16/20 der Firma GE Healthcare (Bettvolumen: 24 ml) verwendet. Für Hydroxylapatit-Läufe wurde eine XK-26/20 Säule der Firma GE Healthcare (Bettvolumen: 30 ml) mit Hydroxylapatit der Firma Biorad beladen. Für Gelfiltrationen wurde eine XK-26/600 Säule (Bettvolumen: 325,5 ml) der Firma GE Healthcare mit vorgepackter Dextran/Agarose Matrix verwendet.

Für die Reinigung wird zunächst das gesamte Proteinrohextrakt über einen SuperLoop auf die frisch in LEW äquilibrierte Strep-Tactin Säule aufgetragen (Flussrate 3,0 ml/min) und die nicht bindenden Proteine werden mit 200 ml Waschpuffer (LEW + 1 M NaCl) bei einer Flussrate von 4,0 ml/min heruntergewaschen. Die Elution erfolgte mit 200 ml Elutionspuffer (LEW + 2.5 mM Desthiobiotin) bei einer Flussrate von 2,0 ml/min und einer Fraktionierung zu 5 ml. Anhand des UV-Profiles der eluierten Fraktionen wurden interessante Fraktionen zur weiteren Analyse per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung ausgewählt und auf den Gehalt an DegS und seine Reinheit untersucht. Fraktionen mit guter Reinheit und hohem DegS-Gehalt wurden dann ausgewählt, zusammengeführt und bis auf etwa 20 ml einkonzentriert (Vivaspin Röhrchen, 50.000 MWC).

Die aufkonzentrierte Probe wurde dann bei niedriger Flussrate (0,3 ml/min) auf die Hydroxylapatit (HAP) Säule aufgetragen. Wegen des ungewissen Auftrennungsverhaltens wurde der Durchfluss während des gesamten Säulenlaufes aufgefangen und fraktioniert. Nach dem Auftrag wurde die Säule mit 90 ml HAP Puffer A (Flussrate 1,0 ml/min) gewaschen. Die theoretische Elution erfolgte mit 120 ml HAP Puffer B (Flussrate 1,0 ml/min). DegS eluierte allerdings bereits mit dem Übergang auf HAP Puffer A in einem deutlichen Peak. Nach Kontrolle der Fraktionen wie oben beschrieben wurden auch hier die interessanten Fraktionen auf unter 5 ml aufkonzentriert (Vivaspin-Röhrchen, 50.000 MWC).

Für eine gute Auftrennung mittels Gelfiltration ist es wichtig, dass die Probe in einem möglichst kleinen Volumen (< 5 ml) aufgetragen wird und es ist absolut essentiell, dass alle verwendeten Puffer möglichst gut entgast wurden. Unlösliche Bestandteile (wie Puffersalze und evtl. ausgefallenes Protein) in der Probe wurden vor dem Auftragen durch Zentrifugation (4°C, 21.000 rpm, 5 min) entfernt.

Das Auftragen der Probe erfolgte bei einer Flussrate von 1,5 ml/min mit Gelfiltrationspuffer, der weitere Lauf erfolgte ebenfalls bei 1,5 ml/min mit Gelfiltrationspuffer (insgesamt 200 ml) und verschiedenen Fraktionierungen. Zum Schluss erfolgte zum finalen Spülen der Säule ein weiterer Lauf von 150 ml Gelfiltrationspuffer bei 2,0 ml/min. Wie oben beschrieben wurden auch dann die interessanten Fraktionen weiter untersucht und einkonzentriert. Die

Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einer der beschriebenen Methoden (siehe Abschnitt 3.3.3). Zur Lagerung wurde die Proteinlösung aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Reinigung von DegS-Punktmutanten mittels Protino 200 Ni-NTA Säulchen

Zur Reinigung einiger DegS-Punktmutanten, zu denen bereits Plasmide in der Laborsammlung vorhanden waren, konnte es nötig sein, Tropfsäulchen zu verwenden. Die entsprechend exprimierten rekombinanten Proteine hatten einen His-Tag, sodass sie über eine Ni-NTA Affinitätssäule aufgereinigt werden konnten.

Anzucht und Aufschluss der Bakterienkulturen erfolgte analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen, jedoch mit einem reduzierten Volumen der Hauptkultur (1 L) und einer erhöhten IPTG-Konzentration zur Induktion der Überexpression von 500 µM (Endkonzentration). Der Aufschluss erfolgte entsprechend über Sonifikation durch acht bis zehn Pulse von jeweils 30 sec bei etwa 50 % der maximalen Intensität und Kühlung auf Eis während und zwischen den Pulsen. Alle Reinigungsschritte erfolgten bei 4°C im Kühlraum.

Die Protino 2000 Säulchen (Macherey + Nagel) wurden mit 10 Säulenvolumen LEW Puffer äquilibriert, dann konnte das Rohextrakt auf die Säule gegeben werden. Der Durchfluss wurde für alle Schritte einzeln aufgefangen und gelagert. Nicht gebundene Proteine wurden dann mit 2 x 4 ml LEW Puffer ausgewaschen. Die Elution erfolgte mit 3 x 3 ml Elutionspuffer (LEW + 200 mM Imidazol).

Die Überprüfung der Fraktionen und das Aufkonzentrieren erfolgte wie oben beschrieben, ebenso die Lagerung.

4. Ergebnisse

4.1 Screening

DegS-Screen

Bereits vor Beginn dieser Arbeit wurden die ersten Verbindungen im Labor in *in-vitro* Assays und Wachstumstest mit verschiedenen Bakterienstämmen untersucht. Dabei wurde die Verbindung LDC043908 identifiziert. Die Struktur des Inhibitors und seine Wirkung sind exemplarisch in Abb. 14 dargestellt, es handelt sich um 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-N-benzyl-8-isopropylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin.

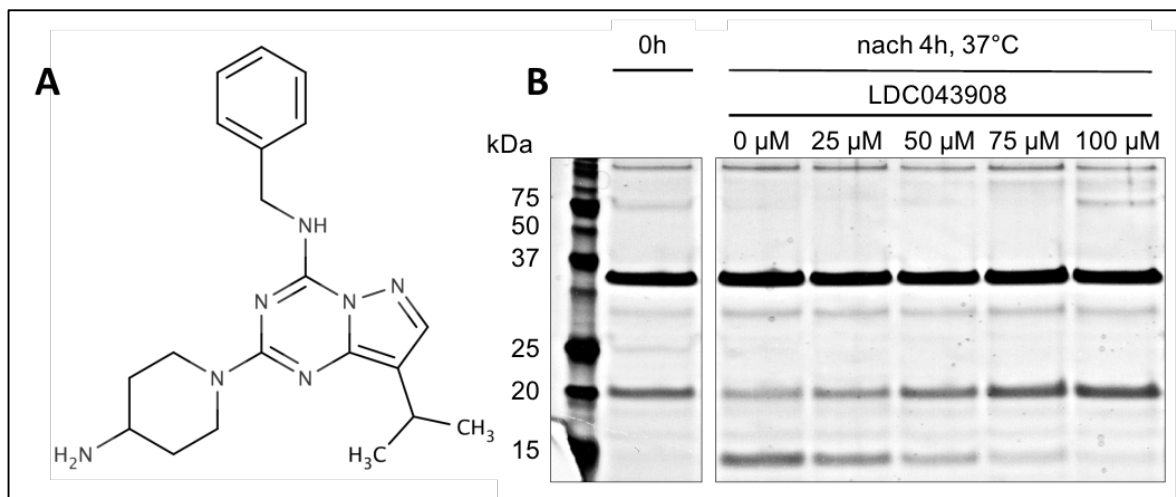


Abb. 14: LDC043908 und seine Wirkung *in-vitro*

(A) Schematische Darstellung des identifizierten Inhibitors LDC043908 und (B) seine dosisabhängige Inhibition des RseA-Verdau durch DegS im *in-vitro* Assay.

Unter den 27 weiteren *hits* des ersten Screening-Abschnittes wurden noch weitere *Compounds* identifiziert, die in *in-vitro* Verdauassays eine inhibitorische Wirkung auf den RseA-Verdau durch DegS zeigten. Keiner dieser *Compounds* konnte jedoch in weiteren Assays als potenter Inhibitor *in-vitro* oder in bakteriellen Wachstumsassays bestätigt werden.

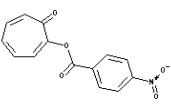
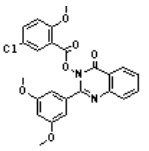
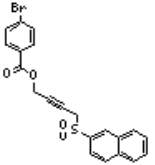
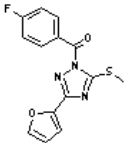
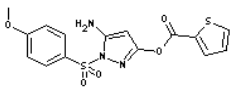
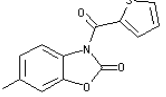
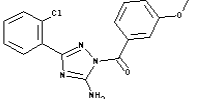
Im zweiten Screening-Abschnitt wurden 28 *hits* identifiziert, von denen jedoch keine Verbindung eine inhibitorische Wirkung in den orthogonalen Assays bestätigen konnte. Sodass davon ausgegangen werden muss, dass viele falsch positive *hits* durch das Assay produziert wurden.

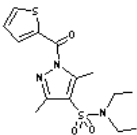
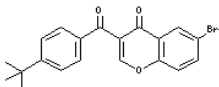
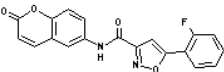
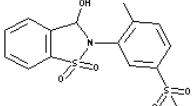
HTRA1-Screening

Ähnlich wie bei DegS wurde das primäre Screening für die Inhibition von HTRA1 am *Lead Discovery Center* (LDC GmbH, Dortmund) auf einer automatisierten Plattform mittels AlphaScreen Technologie durchgeführt. Grundlage waren auch hier durch Melisa Merdanovic (Universität Duisburg-Essen, ZMB) gereinigte Proteine HTRA1 und RseA, die in das oben beschriebene Assay eingesetzt wurden.

Dabei wurden insgesamt elf *Compounds* identifiziert (siehe Tab. 1), die HTRA1 sowohl im Assay als auch in den orthogonalen Assays (durchgeführt durch Melisa Merdanovic) inhibieren konnten.

Tab. 1: Primäre hits HTRA1 Inhibitorscreen

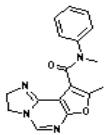
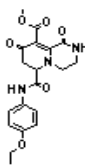
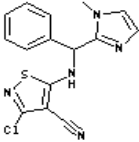
Name	Struktur	IC ₅₀ (LDC)	Inhibition Caseinverdau	% Inhibition pNA Assay (50 µM)
LDC054396		15 – 20 µM	50 µM	0
LDC054905		n.b.	6,25 µM	9
LDC062063		n.b.	6,25 µM	0
LDC070404		0,8 – 1,0 µM	12,5 µM	68
LDC082891		n.b.	6,25 µM	0
LDC083493		1,0 – 1,7 µM	10 µM	0
LDC091675		13,5 – 18,8 µM	6,25 µM	95

LDC103720		n.b.	50 μM	55
LDC137467		21 μM	6,25 μM	13
LDC161786		25 μM	keine	0
LDC165819		n.b.	n.b.	15

Namen, Strukturen und Inhibitionsparameter der elf Primärhits. IC_{50} -Werte wurden am LDC per HTRF bestimmt, Inhibition im β -Caseinverdau und Inhibition im pNA-Assay wurden durch Melisa Merdanovic bestimmt. Die Versuche wurden unter den beschriebenen Standardbedingungen durchgeführt. (n.b. = nicht bestimmbar)

Aus diesen *hits* und weiteren, chemisch interessanten, Verbindungen wurden durch Medizinal-Chemiker des LDC sechs Klassen von potentiellen Inhibitoren von HTRA1 festgelegt und weiter charakterisiert. Es wurden außerdem weitere Derivate gekauft oder synthetisiert. Diese Derivate wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht (siehe Abschnitt 4.3.1).

Tab. 2: Weitere HTRA1 *hits*

Name	Struktur	IC_{50} (LDC)	relative Löslichkeit (μM)
LDC102928		4,7 – 7,2 μM	480
LDC078451		16 μM	n.b.
LDC167023		28 μM	n.b.

Namen, Strukturen und Inhibitionsparameter weitere *hits* aus dem HTRA1 Inhibitorscreen. Diese *Compounds* wurden von Chemikern des LDC ausgewählt, da sie interessante chemische Eigenschaften zeigten und dienen ebenfalls als Grundlage weiterer Derivatisierung. (n.b. = nicht bestimmbar)

4.2 DegS Inhibitoren

4.2.1 Proteinbiochemische Assays

Untersuchung der hits aus dem zweiten Screening-Abschnitt

In einem zweiten Screening Abschnitt wurden 202 neue *hits* identifiziert, die eine messbare Inhibition von DegS bewirken. Aus diesen primären *hits* wurden 28 *Compounds*, welche über einem bestimmten (LDC internen) Schwellenwert liegen, ausgewählt, an uns übergeben und in entsprechenden orthogonalen Assays auf ihre Inhibition von DegS untersucht. Zunächst wurden in jedem Fall *in-vitro* Assays durchgeführt, die den Verdau von gereinigtem RseA durch DegS unter Zugabe der zu testenden Verbindung untersuchen. In Abb. 15 ist eine beispielhafte Darstellung eines solchen RseA-Verdau zu sehen. Tab. 3 enthält die Ergebnisse aller Tests in der Zusammenfassung. Da keiner der untersuchten *hits* DegS in diesem Assay inhibierte, wurden auch keine weiterführenden Untersuchungen im pNA-Assays oder Bakterienkultur durchgeführt. Außerdem wurden durch Markus Kaiser 26 weitere *Compounds* aus der Liste derjenigen Verbindungen, die im *Screening* zwar eine Inhibition zeigten, aber den Schwellenwert nicht überschritten, ausgewählt. Diese *Compounds* stellten unter medizinisch-chemischen Gesichtspunkten vielversprechende Ausgangspunkte für die Entwicklung eines potentiellen Medikamentes da und sind in Tab. 4 aufgeführt. Auch hier wurden orthogonale Assays durchgeführt und alle *Compounds* in einem RseA-Verdau mit Gelauffrennung getestet. Keiner der 26 untersuchten *Compounds* konnte dabei eine inhibitorische Wirkung auf den *in-vitro* RseA-Verdau durch DegS bestätigen.

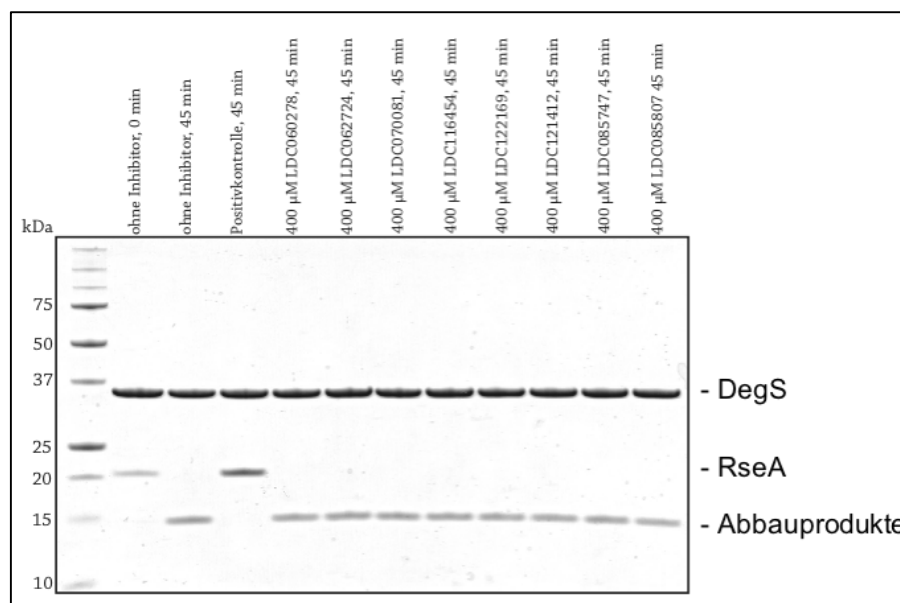
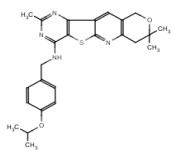
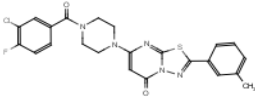
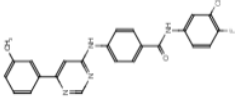
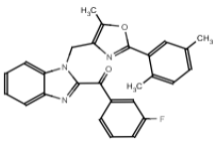
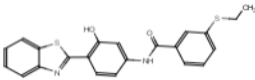
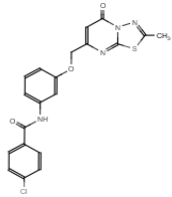
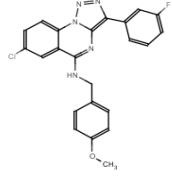
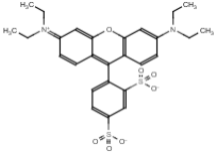
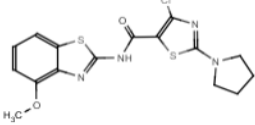
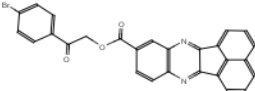


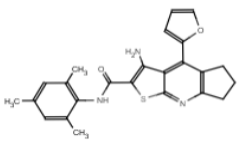
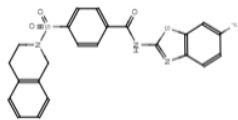
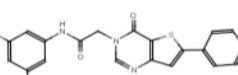
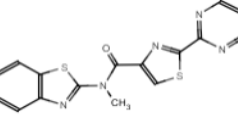
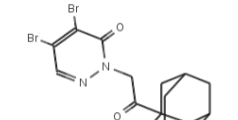
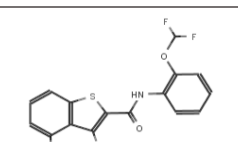
Abb. 15: Beispielhafte Darstellung RseA-Verdau durch DegS mit zu testenden *Compounds*

Qualitative Einzelbestimmungen des Verdau von RseA durch DegS nach 45 min Inkubation bei 37°C im Standardpuffer. Die Reaktionen wurden wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben mit 400 µM des zu testenden *Compounds* durchgeführt und nach 45 min abgestoppt, elektrophoretisch analysiert und angefärbt. Als Positivkontrolle dienten 400 µM LDC043908 und als Negativkontrolle die volumenmäßig entsprechende Menge DMSO.

Tab. 3: Primäre hits des DegS Inhibitorscreen (zweiter Abschnitt)

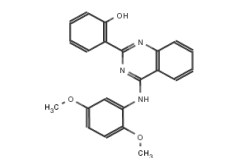
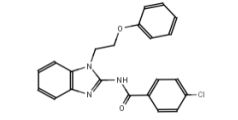
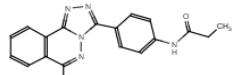
Name	Struktur	IC ₅₀ (LDC)	Inhibition RseA-Verdau (400 µM)
LDC056052		27 µM	keine
LDC059135		40 µM	keine
LDC060834		22 µM	keine
LDC070560		19 µM	keine
LDC077135		44 µM	keine
LDC078771		38 µM	keine
LDC079315		21 µM	keine
LDC080426		26 µM	keine
LDC082404		22 µM	keine
LDC084287		21µM	keine
LDC088862		30 µM	keine

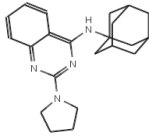
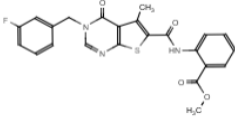
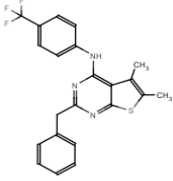
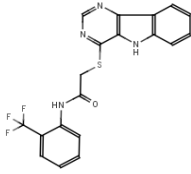
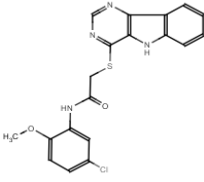
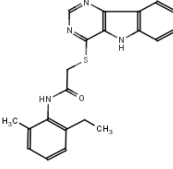
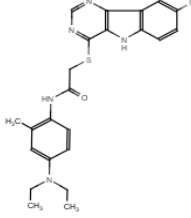
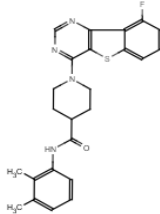
LDC097153		26 μ M	keine
LDC098277		19 μ M	keine
LDC098723		22 μ M	keine
LDC099389		23 μ M	keine
LDC106836		30 μ M	keine
LDC122060		17 μ M	keine
LDC122325		32 μ M	keine
LDC126497		12 μ M	keine
LDC130364		26 μ M	keine
LDC131748		2 μ M	keine

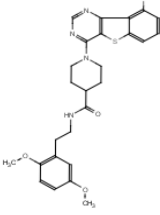
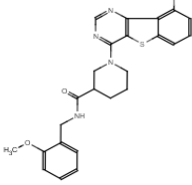
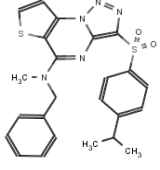
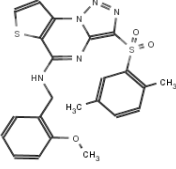
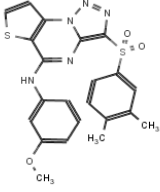
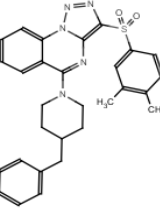
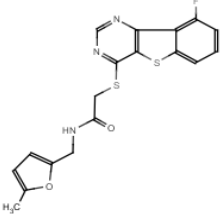
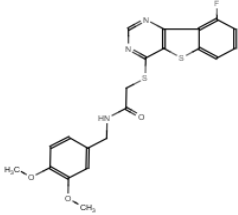
LDC144042		20 μ M	keine
LDC154147		30 μ M	keine
LDC159548		28 μ M	keine
LDC165561		33 μ M	keine
LDC167132		15 μ M	keine
LDC168575		31 μ M	keine

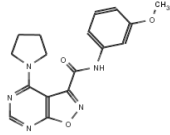
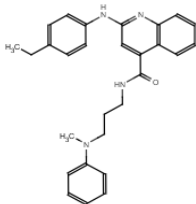
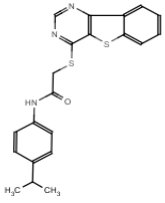
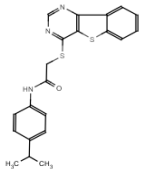
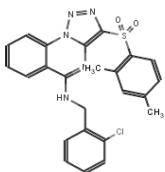
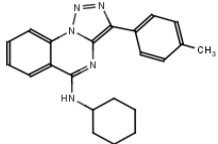
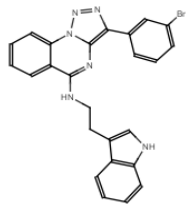
Namen, Strukturen und Inhibitionsparameter der Primärhits. IC_{50} -Werte wurden am LDC per HTRF bestimmt, orthogonale Assays wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Tab. 4: Manuell ausgesuchte *Compounds* aus DegS Inhibitorscreen (zweiter Abschnitt)

Name	Struktur	IC_{50} (LDC)	Inhibition RseA-Verdau (400 μ M)
LDC060278		n.a.	keine
LDC062724		39,46 μ M	keine
LDC069506		n.a.	keine

LDC070081		> 50 μM	keine
LDC078210		n.a.	keine
LDC078267		45 μM	keine
LDC081362		n.a.	keine
LDC081389		n.a.	keine
LDC081390		n.a.	keine
LDC081472		n.a.	keine
LDC085747		n.a.	keine

LDC085808		n.a.	keine
LDC085836		n.a.	keine
LDC093683		n.a.	keine
LDC093690		n.a.	keine
LDC093974		n.a.	keine
LDC095108		n.a.	keine
LDC098892		n.a.	keine
LDC098947		n.a.	keine

LDC102930		n.a.	keine
LDC110750		n.a.	keine
LDC111602		n.a.	keine
LDC116454		n.a.	nein
LDC121412		n.a.	nein
LDC122169		n.a.	nein
LDC122462		48 μ M	nein

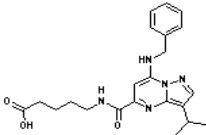
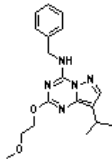
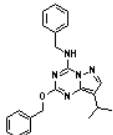
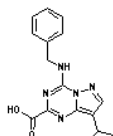
Namen, Strukturen und Inhibitionsparameter der Primärhits. IC₅₀-Werte wurden am LDC per HTRF bestimmt, orthogonale Assays wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die *Compounds* wurden durch Markus Kaiser zum Test ausgewählt. (n.a. = nicht auswertbar)

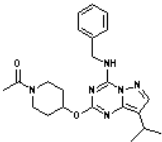
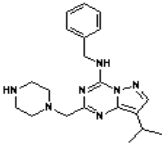
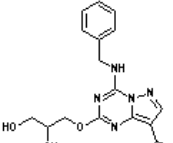
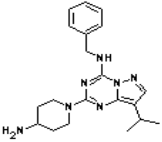
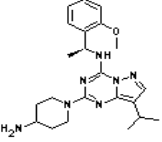
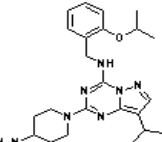
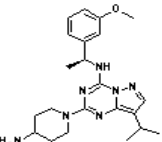
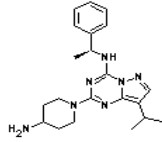
Untersuchung von LDC043908-Derivaten

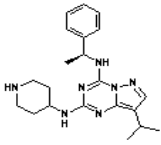
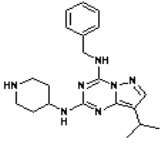
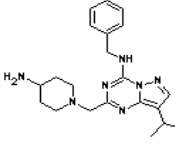
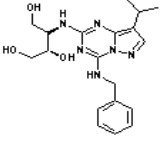
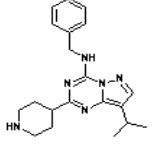
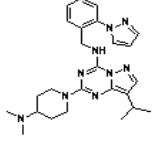
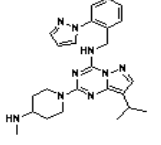
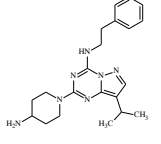
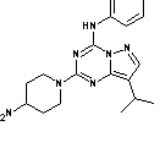
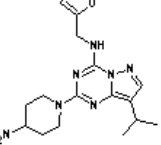
Wie bereits erwähnt wurde aus dem ersten Abschnitts des DegS Inhibitorscreens ein *Compound* identifiziert, der DegS in allen angewendeten Assays ausreichend gut und in

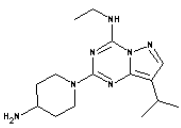
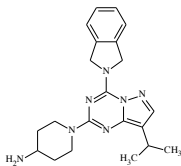
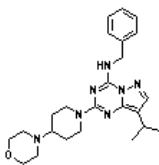
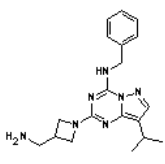
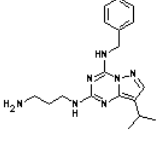
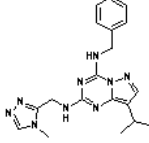
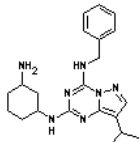
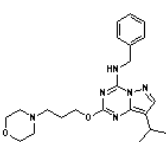
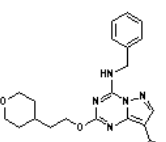
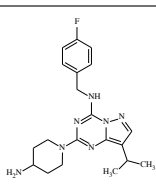
dosisabhängiger Form inhibiert (Abb. 15). Um eine Struktur-Wirkungs-Beziehung aufstellen zu können und evtl. besser wirksame *Compounds* zu finden, wurden Derivate von LDC043908 untersucht. Im ersten Schritt wurden alle käuflichen Derivate erworben und in den beschriebenen Assays untersucht (siehe Tab. 5), in einem weiteren Schritt wurden gezielt Derivate von LDC043908 durch Anna-Laura Schmitz (ZMB Essen, AG Kaiser) synthetisiert und in den Assays getestet (Tabelle 6).

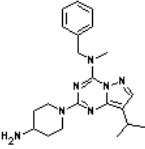
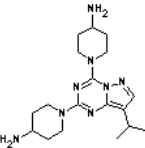
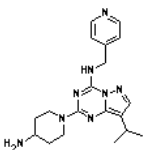
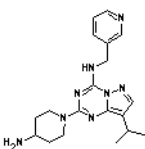
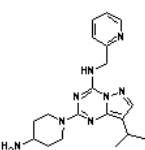
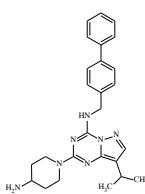
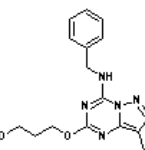
Tab. 5: Testergebnisse kommerziell erhältliche Derivate von LDC043908

Name	Struktur	IC ₅₀ (LDC)	Inhibition RseA-Verdau
LDC041317		n.d.	nein
LDC041340		n.d.	nein
LDC041419		n.d.	nein
LDC041422		n.d.	nein
LDC042290		n.d.	nein
LDC042291		n.d.	nein
LDC042534		n.d.	nein
LDC042569		n.d.	nein
LDC042611		n.d.	nein
LDC042615		n.d.	nein
LDC042622		n.d.	nein
LDC042670		n.d.	nein
LDC042674		n.d.	nein

LDC043048		n.d.	nein
LDC043093		n.d.	nein
LDC043094		n.d.	nein
LDC043108		n.d.	nein
LDC043109		n.d.	nein
LDC043148		n.d.	nein
LDC043784		n.d.	nein
LDC043788		n.d.	nein
LDC043908		150 μ M	Primärhit Inhibition ab 200 μ M
LDC044229		n.d.	nein
LDC044230		n.d.	nein
LDC044231		> 196 μ M	ab 400 μ M
LDC044257		n.d.	nein

LDC044303		n.d.	nein
LDC044396		n.d.	nein
LDC044405		n.d.	nein
LDC045500		n.d.	nein
LDC045624		n.d.	nein
LDC046174		n.d.	nein
LDC046175		n.d.	nein
LDC047858		105 μ M	ja
LDC047859		n.d.	nein
LDC047860		n.d.	nein

LDC047861		n.d.	nein
LDC047862		78 μ M	leichte Inhibition ab 400 μ M
LDC047863		n.d.	nein
LDC047864		n.d.	nein
LDC047865		n.d.	nein
LDC047866		n.d.	nein
LDC047867		n.d.	nein
LDC047868		n.d.	nein
LDC047869		n.d.	nein
LDC047871		n.d.	ab 400 μ M

LDC047872		n.d.	nein
LDC047901		n.d.	nein
LDC047902		n.d.	nein
LDC047903		n.d.	nein
LDC047904		n.d.	nein
LDC047905		106 μ M	ab 400 μ M
LDC047906		n.d.	nein

Namen, Strukturen und Inhibitionsparameter der Derivate. IC₅₀-Werte wurden (wo zutreffend) am LDC per HTRF bestimmt, weitere biochemische Assays wurden wie beschrieben durchgeführt. Einige der *Compounds* können aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht als Struktur dargestellt werden. (n.d. = nicht durchgeführt)

Es wird deutlich, dass sehr viele der untersuchten Derivate keinerlei inhibitorische Wirkung auf DegS im RseA-Verdau zeigen, obwohl teilweise nur sehr geringe Veränderungen gegenüber dem Ursprungsmolekül bestehen. Systematisch betrachtet lässt sich zusammenfassen, dass manche Strukturelemente des Moleküls überhaupt nicht verändert werden dürfen, etwa Rest B (siehe Abb. 16, grün), ohne die Wirkung des Moleküls auf DegS gänzlich zu verlieren. So führen sowohl Vergrößerungen (z.B. LDC047868), als auch Verkleinerungen (z.B. LDC043788) und alle Veränderungen des Ringsystems (z.B.

LDC047863 oder LDC047864) zum totalen Wirkungsverlust. Veränderungen des Grundgerüsts wurden aufgrund der fehlenden kommerziellen Erhältlichkeit nicht untersucht, ebenso Veränderungen von Rest C. Mit der einzigen Ausnahme von Molekül LDC045500, welches als Erweiterung des Grundgerüsts verstanden werden kann, aber auch hier lässt sich keine inhibitorische Wirkung mehr erkennen.

Es wurden außerdem zahlreiche Variationen von Rest A untersucht, hier alleine zeigt sich Variabilität ohne den totalen Verlust aller inhibitorischer Eigenschaften. Es konnten Moleküle klassifiziert werden, die eine gute inhibitorische Wirkung zeigten (z.B. LDC047905), Moleküle mit schwacher Inhibition (z.B. LDC047862) oder Moleküle ohne inhibitorische Wirkung (z.B. LDC047901). Die deutliche Verkleinerung dieser Gruppe (wie in LDC047861) führte zum Verlust der inhibitorischen Wirkung.

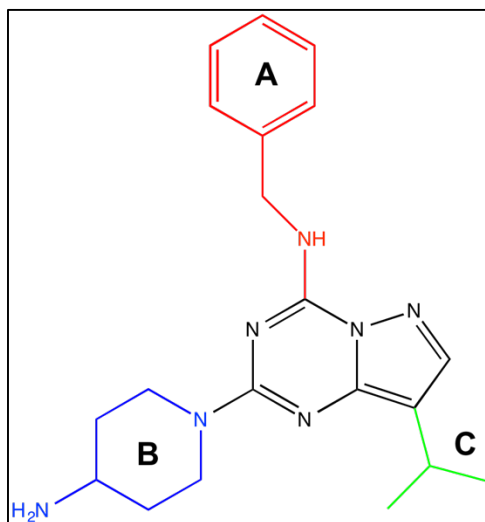


Abb. 16: Strukturzeichnung LDC043908 mit Verdeutlichung der derivatisierten Elemente.
Darstellung von LDC043908 als Strukturzeichnung mit Verdeutlichung der einzelnen Elemente. Das Grundgerüst ist in schwarz dargestellt, verschiedene Reste sind in rot (A; 4-Amin-N-benzyl), blau (B; 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)) und grün (C; 8-Isopropyl) dargestellt.

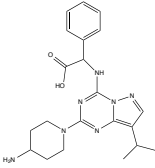
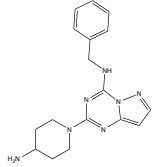
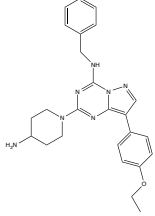
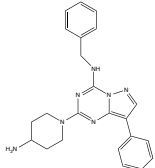
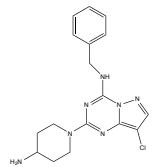
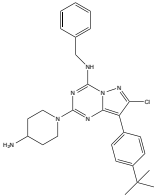
Untersuchung weiterer LDC043908-Derivate von Anna-Laura Schmitz (ALS-Compounds)

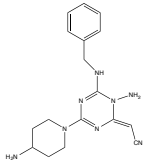
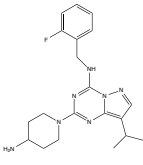
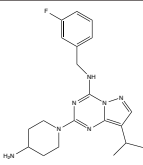
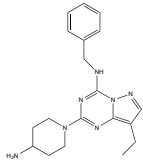
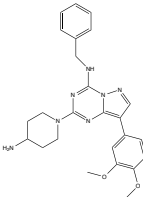
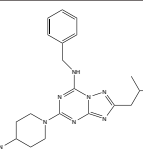
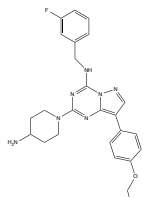
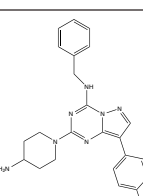
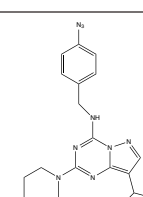
Aufbauend auf Ergebnissen des letzten Abschnittes wurden durch Anna-Laura Schmitz weitere Derivate von LDC043908 synthetisiert (Tab. 6). Diese weitergehende Derivatisierung bezog sich so vor allem auf die Reste A (rot) und C (grün), welche durch die bekannten Derivate entweder noch gar nicht (Rest C) oder teilweise erfolgreich (Rest A) angesprochen wurden.

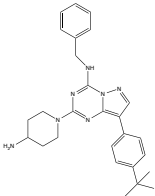
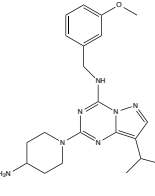
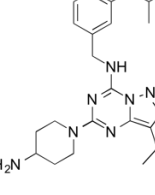
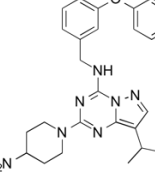
Es zeigt sich, dass Variationen von Rest A (rot) weiterhin erlaubt sind, vor allem Substitutionen des Ringes in Rest A können die inhibitorische Wirkung der Moleküle modulieren, dabei ist auch die Position der Substitution ausschlaggebend (z.B. ALS138 und ALS139). Substitutionen des *linkers* führen in jedem Fall (z.B. LDC044257 und ALS34) zur Aufhebung der inhibitorischen Wirkung.

Außerdem kommt es auf die korrekte Position des Restes C an, ist dieser falsch positioniert (z.B. ALS168) kommt es zum Verlust der Wirkung, bei zusätzlicher Substitution am Grundgerüst geht die Wirkung teilweise verloren (z.B. ALS88) und wenn das Grundgerüst zu weit verändert ist (z.B. ALS100) kommt es zum kompletten Verlust der inhibitorischen Wirkung.

Tab. 6: LDC043908-Derivate von Anna-Laura Schmitz

Name	Struktur	IC ₅₀ (LDC)	Inhibition RseA-Verdau	Anmerkung
ALS34		n.d.	nein	
ALS59		n.d.	nein	
ALS66		90 µM	ab 200 µM	keine Aktivität gegenüber Kinasen
ALS70		163 µM	ab 400 µM	
ALS80		174 µM	ab 400 µM	
ALS88		> 196 µM	ab 400 µM	

ALS100		n.d.	nein	
ALS138		134 μM	ab 100 μM	
ALS139		141 μM	ab < 100 μM	
ALS151		144 μM	ab 100 μM	
ALS167		n.d.	nein	
ALS168		n.d.	nein	
ALS179		> 196 μM	ab 400 μM	
ALS180		177 μM	etwa 400 μM	
ALS182		166 μM	ab 50 μM	für Photo-Crosslinking

ALS207		n.d.	ab 50 μ M	
ALS209		n.d.	ab 50 μ M	
ALS219		n.d.	ab 100 μ M*	
ALS221		n.d.	ab < 50 μ M*	

Namen, Strukturen und Inhibitionsparameter der Derivate. IC50-Werte wurden (wo zutreffend) am LDC per HTRF bestimmt, weitere biochemische Assays wurden wie beschrieben durchgeführt. Mit einem Stern * gekennzeichnete Ergebnisse sind mittels Rohdaten im Anhang belegt. (n.d. = nicht durchgeführt)

Variationen von Rest C sind hier zum ersten Mal durchgeführt worden, die entsprechend veränderten Moleküle zeigen sehr unterschiedliche Wirkung auf die Inhibition von DegS im RseA-Verdau. Während eine Verkleinerung des Rest C (wie in ALS151) die Wirkung nicht maßgeblich zu beeinflussen scheint, hat eine starke, hydrophile Vergrößerung des Restes (wie in ALS168) den Verlust der Wirkung zur Folge. Eine starke Vergrößerung des Restes in hydrophober Art (wie in ALS 207) verbessert die inhibitorische Wirkung des Moleküls gegenüber dem Ausgangsmolekül LDC043908. Die Substitution von Rest A mit einem Azid (ALS182), welches für die Photokoppelung an das Zielprotein gedacht war, zeigt ebenfalls eine Verbesserung der inhibitorischen Wirkung.

Die Kombination nachweislich optimierender Veränderungen (wie etwa ALS66 + ALS139 = ALS179) ist nicht zielführend. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die hydrophile Erweiterung von Rest A und die eher hydrophobe Erweiterung von Rest C als gute Möglichkeiten gezeigt haben, um die wirksame Konzentration des untersuchten Moleküls im RseA-Verdau durch DegS herabzusetzen.

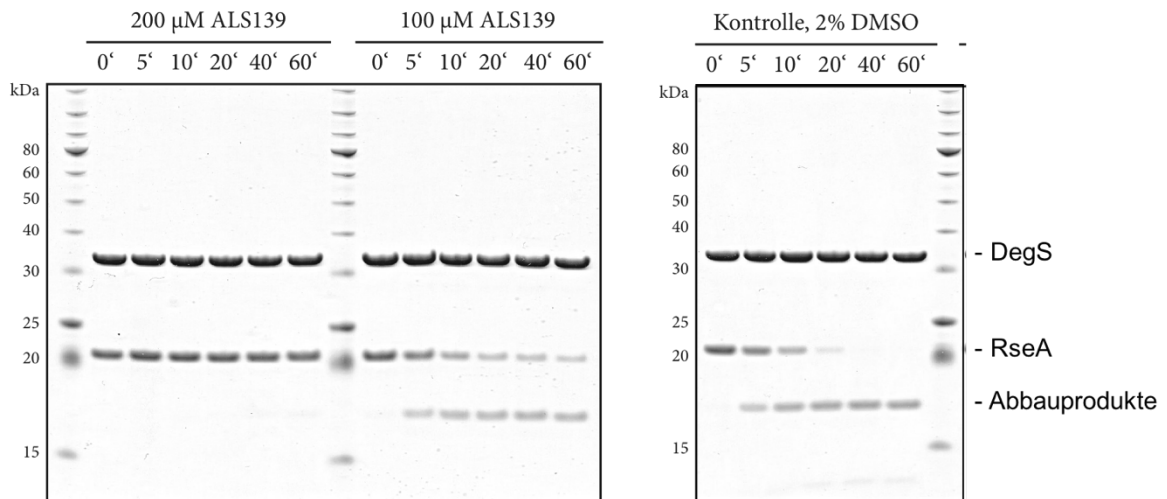


Abb. 17: RseA-Verdau durch DegS mit Titration von ALS139

Gereinigtes RseA wurde nach dem beschriebenen Prinzip durch DegS verdaut, dabei wurde der *Compound* ALS139 in sinkenden Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrolle dient die volumenmäßig gleiche Menge an DMSO in einem gesonderten Ansatz.

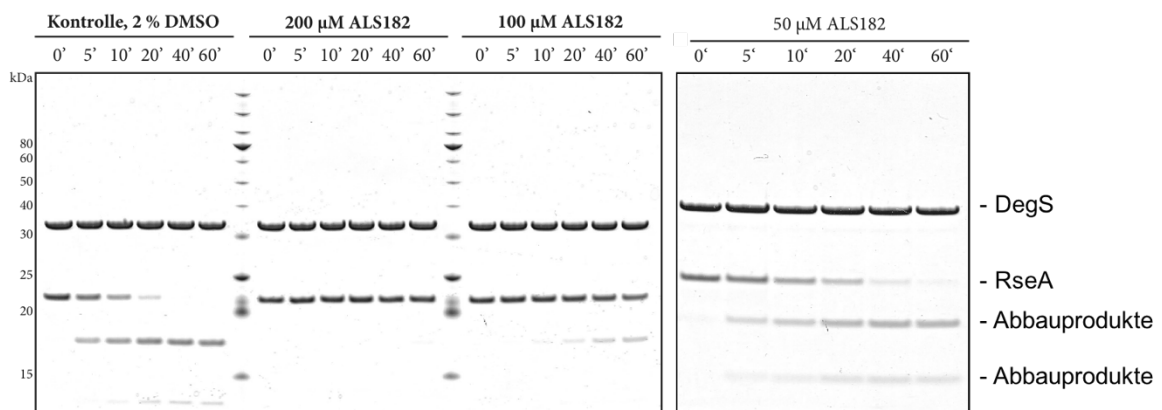


Abb. 18: RseA-Verdau durch DegS mit Titration von ALS182

Gereinigtes RseA wurde nach dem beschriebenen Prinzip durch DegS verdaut, dabei wurde der *Compound* ALS182 in sinkenden Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrolle dient die volumenmäßig gleiche Menge an DMSO in einem gesonderten Ansatz.

Nach den grundlegenden *in-vitro* Verdauassays, die zunächst nur mit einer Konzentration durchgeführt wurden, konnten vier Verbindungen identifiziert werden, die eine interessante, verbesserte Inhibition von DegS im RseA-Verdau zeigten. Diese wurden dann in weiteren Versuchen titriert.

Abbildung 17 zeigt den Einsatz verschiedener Konzentrationen ALS139 in den *in-vitro* Verdau von RseA durch DegS. Gegenüber dem Kontrollverdau wird deutlich, dass ALS139 auch noch bei einer Konzentration von 100 µM die Aktivität von DegS deutlich hemmt. Im Vergleich zum Ursprungsmolekül LDC043908 (siehe Abb. 19) handelt es sich um eine Verbesserung der inhibitorischen Wirkung.

Abb. 18 zeigt den Einsatz sinkender Konzentrationen ALS182 in den Standardversuchsansatz im RseA-Verdau durch DegS. Ähnlich wie oben zeigt sich eine

gute Inhibition des Verdau im Vergleich zum Kontrollansatz. Allerdings ist ALS182 auch bei einer Konzentration von 50 μM noch deutlich aktiv und stellt somit eine weitere Verbesserung der inhibitorischen Wirkung da, auch gegenüber ALS139.

In Abb. 20 ist der gleiche Versuchsansatz mit den beiden *Compounds* ALS207 und ALS209 zu erkennen. Beide inhibieren den RseA-Verdau durch DegS auch noch bei einer Konzentration von 50 μM sehr deutlich. Es handelt sich dabei nochmals um eine Herabsetzung der wirksamen Konzentration eines *Compounds* in diesem Assay. Die letzten *Compounds* aus dieser Reihe zeigen unterschiedliche Wirkungen, ALS221 setzt die wirksame Konzentration eines Inhibitors noch einmal auf deutlich unter 50 μM für diese Assayform herab, und stellt so den besten bisher bekannten Inhibitor da.

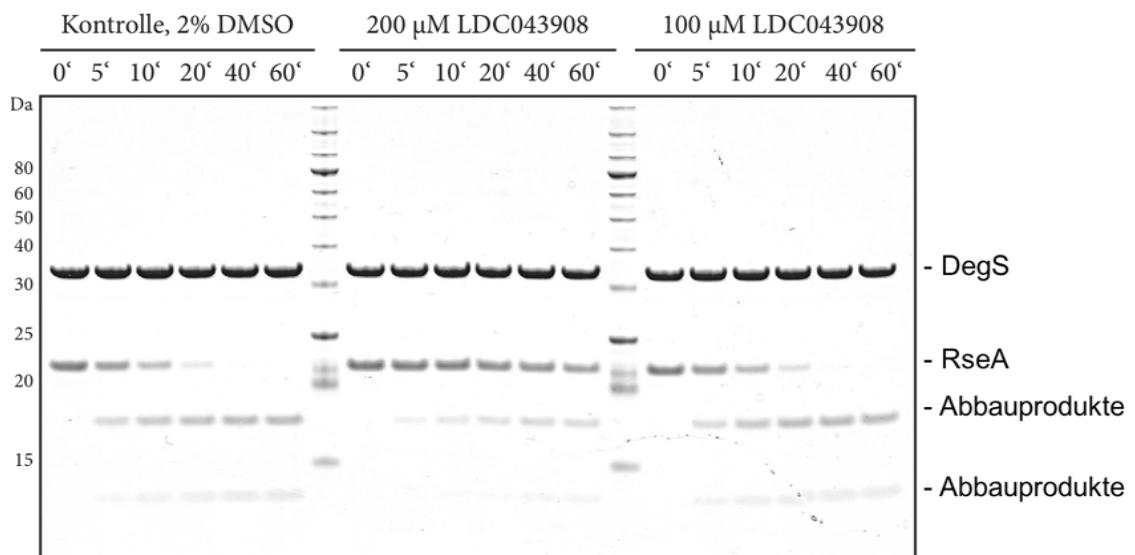


Abb. 19: RseA-Verdau durch DegS mit Titration von LDC043908

Gereinigtes RseA wurde nach dem beschriebenen Prinzip durch DegS verdaut, dabei wurden die Ursprungsverbindung LDC043908 in sinkenden Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrolle dient die volumenmäßig gleiche Menge an DMSO in einem gesonderten.

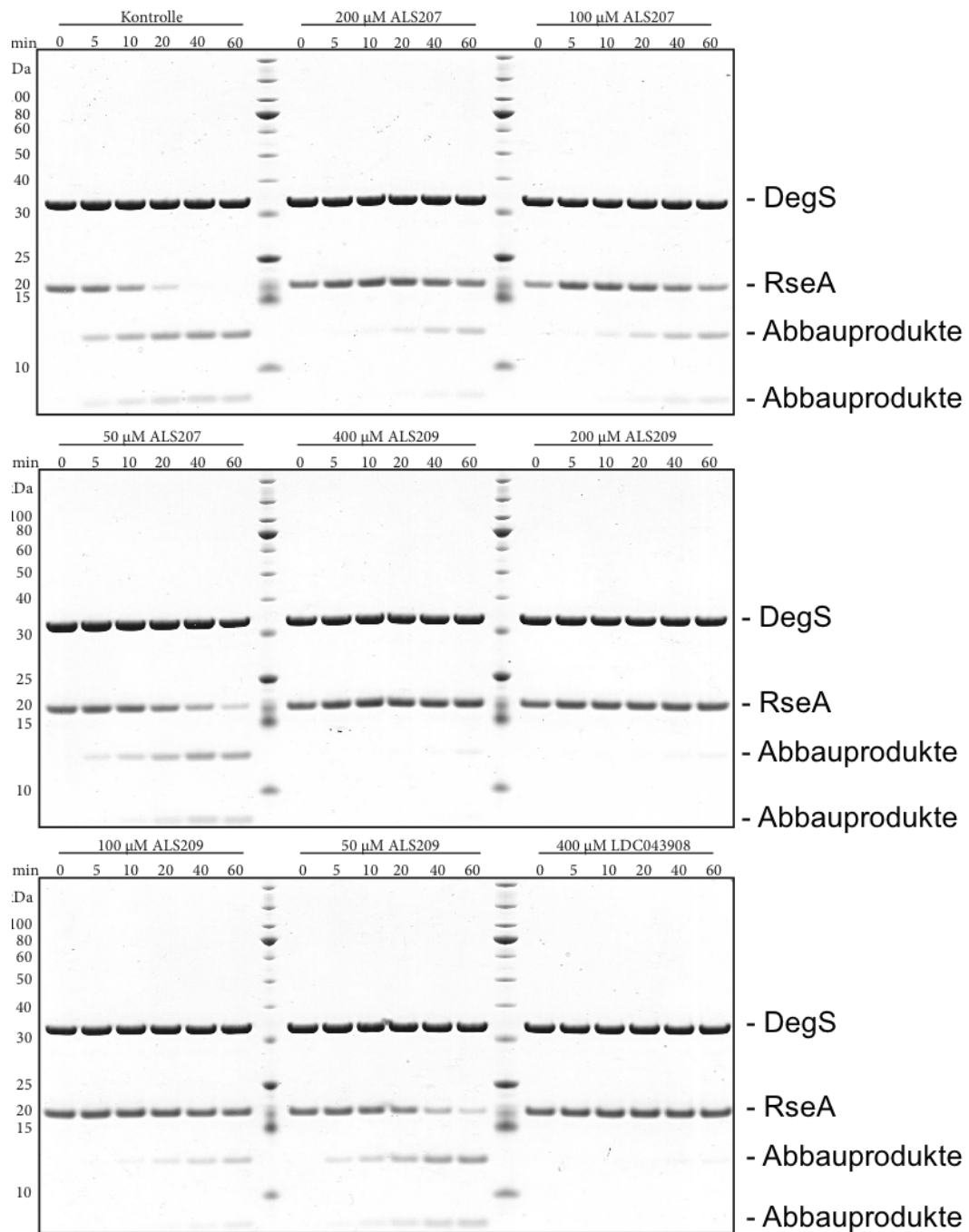


Abb. 20: RseA-Verdau durch DegS mit Titration von ALS207 und ALS209

Gereinigtes RseA wurde nach dem beschriebenen Prinzip durch DegS verdaut, dabei wurden die *Compounds* ALS207 und ALS209 in sinkenden Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrolle dient die volumenmäßig gleiche Menge an DMSO in einem gesonderten Ansatz und zum Vergleich ebenso 400 μM des Ausgangsmoleküls LDC043908.

Untersuchung der Inhibition von Kinasen

Weil sich in der Literatur Hinweise finden, dass es sich bei den Molekülen aus der Klasse von LDC043908 auch um gute Inhibitoren humaner Kinasen handelt (Review in (Zhang et al. 2009)), war es auch ein Ziel dieser Arbeit eine höhere Spezifität der inhibitorischen Wirkung gegenüber DegS zu erreichen. Die Entwicklung der Derivate von Anna-Laura Schmitz wurde auch unter diesem Gesichtspunkt betrieben. Ein Derivat von LDC043909, namentlich ALS66, wurde nach Modellierung (persönliche Kommunikation mit Alexander Wolf, LDC) als ein guter Kandidat für eine höhere Spezifität befunden und zum genaueren *in-vitro* Test an einen kommerziellen Testanbieter (Reaction Biology Corp., Malvern, USA) gesendet, um diese Hypothese zu überprüfen.

In Tab. 7 sind alle IC_{50} -Werte, die bestimmt wurden, aufgeführt. Es zeigt sich, dass ALS66 die ausgewählten Kinasen deutlich weniger gut inhibiert als das Ausgangsmolekül LDC043908. Während vor Allem der IC_{50} für LDC043908 gegenüber den Kinasen CDK2 und CDK9 in unteren nanomolaren Bereich lag, ist eine Inhibition durch ALS66 kaum mehr nachweisbar ($>30 \mu\text{M}$ gegenüber 110 nM bzw. $>30 \mu\text{M}$ gegenüber 30 nM). Aufgrund des experimentellen Aufbaus können IC_{50} -Werte, die nah an $30 \mu\text{M}$ liegen nicht genau bestimmt werden und entsprechende *Compounds* können deshalb als inaktiv angesehen werden.

Tab. 7: IC_{50} -Werte von LDC04390 und ALS66 gegenüber ausgewählten Kinasen

Kinasen	IC_{50} [μM] LDC043908	IC_{50} [μM] ALS66
AXL	>30	>30
c-MET	>30	>30
CDK1/cyclin B	1,34	27,30
CDK2/cyclin A	0,11	>30
CDK7/cyclin H	< 0,001	>30
CDK9/cyclin T1	0,03	>30
CHK1	>30	24,30
EGFR	>30	>30
FER	8,42	28,50
P38a/MAPK14	>30	>30
RON/MST1R	>30	24,20

Die *Compounds* LDC04390 und ALS66 wurden auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber ausgewählten Kinasen getestet. Dazu wurden IC_{50} -Werte durch einen kommerziellen Anbieter (Reaction Biology Corp., Malvern, USA) bestimmt.

pNA-Assays

In sog. pNA-Assays konnten die inhibitorischen Wirkungen verschiedener *Compounds* auf DegS weitergehend untersucht werden. In dieser Art von Assay wird ein künstliches Peptidsubstrat von DegS so eingesetzt, dass die Protease in der spezifischen Hydrolyse einer Peptidbindung para-Nitroanilin (pNA) von dem Peptid abspaltet. Die Konzentration an freiem pNA kann kolorimetrisch über eine Gelbfärbung (Absorption bei 405 nm)

nachgewiesen und quantifiziert werden. Dabei werden alle Bestimmungen mindestens als technische Triplikate durchgeführt und hier die Mittelwerte dargestellt.

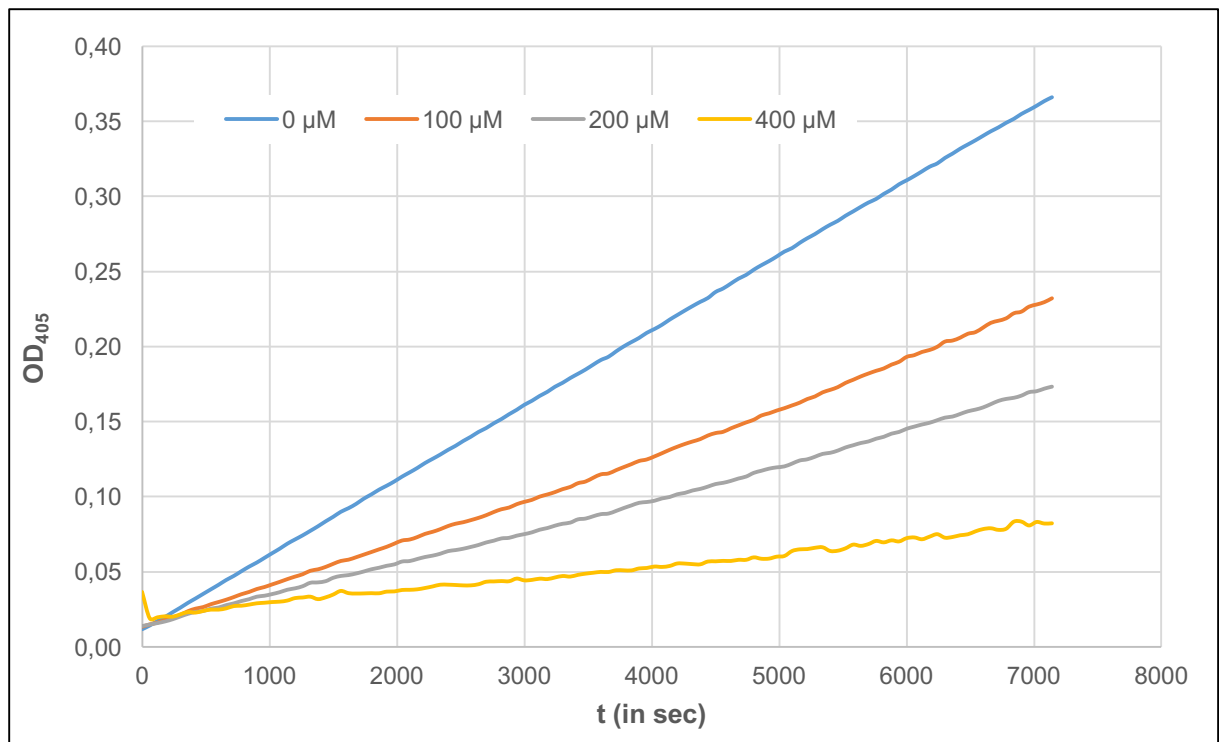


Abb. 21: pNA-Assay DegS mit verschiedenen Konzentrationen von LDC043908

Ansätze wurden wie beschrieben hergestellt und die die OD₄₀₅ über 2h in einem temperierten Plattenlesegerät verfolgt, dabei wurden verschiedene Konzentrationen LDC043908 eingesetzt. Als Kontrolle diente die volumenmäßig gleiche Menge DMSO.

Betrachtet man nun zunächst das pNA-Assay von DegS mit steigenden Konzentrationen von LDC043908, wird deutlich, dass LDC043908 wie auch im Verdauassay DegS inhibiert. Die inhibitorische Wirkung ist außerdem dosisabhängig, allerdings ist auch bei einer Konzentration von 400 µM noch immer eine Restaktivität von DegS nachweisbar. Insgesamt ist die Aktivität von DegS im gesamten betrachteten Bereich gleichbleibend, also sind auch die Kurven der OD₄₀₅-Entwicklung linear (Abb. 21).

Bei der Inhibition von DegP im pNA-Assay (Sequenz des Substrates: DPMFKLV-pNA) durch den DegS-Inhibitor LDC043908 muss eine andere Auswertungsmethodik gewählt werden, da sich nur die Steigung der ersten etwa 300 sec als linear erweist. Nach Auswertung der Steigungen ergibt sich aber auch hier eine Inhibition der DegP-Aktivität durch die Zugabe steigender Konzentrationen von LDC043908 (Abb. 22).

Durch die Berechnungen in Tab. 8 zur relativen Aktivität wird die Betrachtung der Ergebnisse vereinfacht. Hier wurden die Steigungen der linearen Bereiche der obigen unterliegenden Daten berechnet und durch Normierung eine relative Aktivität (bezogen auf die LDC043908 Konzentration) in den einzelnen Versuchsansätzen bestimmt. So zeigt sich die augenscheinliche dosisabhängige Inhibition von DegS durch LDC043908 auch in den

berechneten Werten. Während 100 μM nur etwa 40 % Inhibition bedeuten, bewirken 400 μM LDC043908 schon eine fast 90 %-ige Inhibition der DegS-Aktivität in diesem Assay. Auch für DegP wird durch 100 μM LDC043908 eine Inhibition von etwa 35 % erreicht. Durch eine Steigerung der Konzentration von LDC043908 kann die Inhibition allerdings maximal auf etwa 55 % angehoben werden.

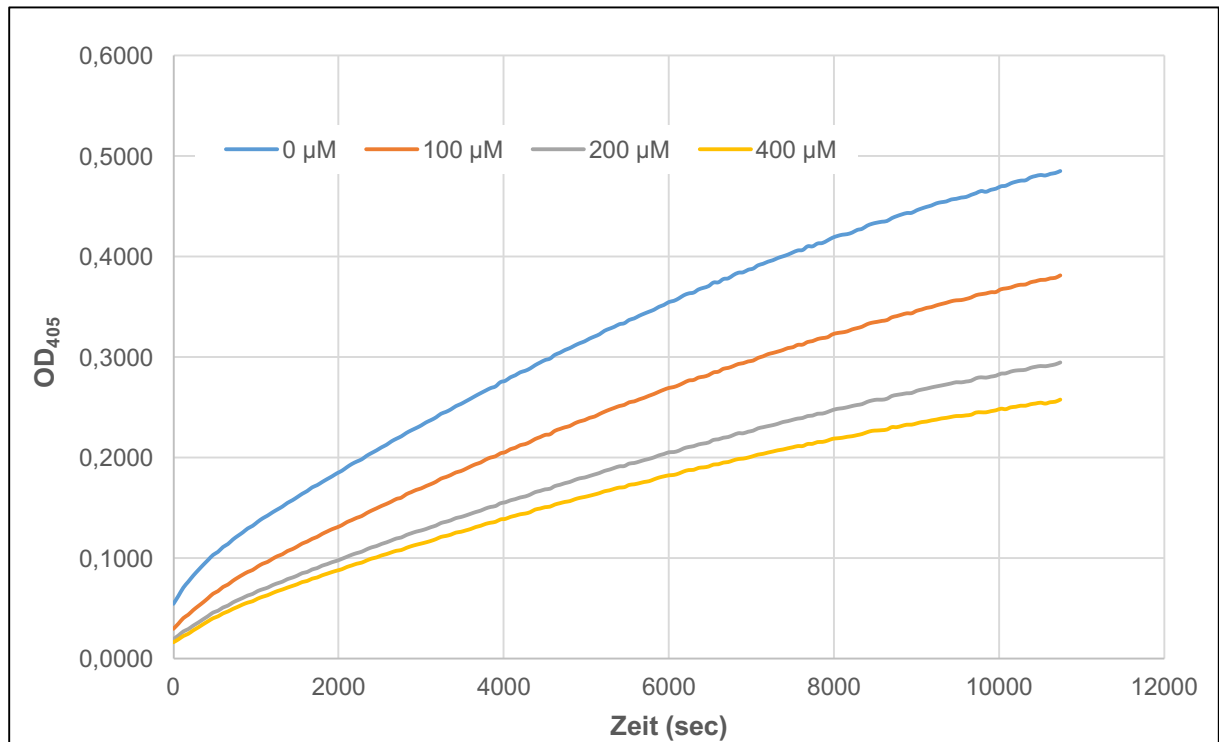


Abb. 22: pNA-Assay DegP mit verschiedenen Konzentrationen von LDC043908

Ansätze wurden wie beschrieben hergestellt und die die OD_{405} über 3h in einem temperierten Plattenlesegerät verfolgt, dabei wurden verschiedene Konzentrationen LDC043908 eingesetzt. Als Kontrolle diente die volumemäßig gleiche Menge DMSO.

Tab. 8: Berechnung der relativen Aktivitäten von DegS und DegP im pNA-Assay

		0 μM	100 μM	200 μM	400 μM
DegS	Steigung	$4,95 \times 10^{-5}$	$3,06 \times 10^{-5}$	$2,23 \times 10^{-5}$	$6,38 \times 10^{-6}$
	rel. Akt.	1	0,62	0,45	0,13
DegP	Steigung	$1,11 \times 10^{-4}$	$7,51 \times 10^{-5}$	$5,45 \times 10^{-5}$	$4,91 \times 10^{-5}$
	rel. Akt.	1	0,673	0,489	0,440

Auf Grundlage der oben als Abbildungen gezeigten Werte für die OD_{405} nach zugehörigen Zeiten wurde die Steigung der Geraden in jeweils linearen Bereichen (DegS: gesamter Bereich; DegP: 0 – 300 sec) errechnet und daraus die relative Aktivität (rel. Akt.) durch Normierung auf die Negativkontrolle bestimmt.

Viele weitere Versuche die Wirkungen verschiedener *Compounds* auf die Aktivität von Proteasen zu bestimmen und zu quantifizieren scheiterten. Das lag in den meisten Fällen wohl an der Überschreitung des Löslichkeitsproduktes von pNA-Substrat, *Compound* und Enzym. Dabei fiel meist weiße Substanz aus der Lösung aus und verhinderte somit

natürlich die photometrische Messung der Absorption bei 405 nm. Dieses Problem und weitere unklare und inkonsistente Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ein sehr artifizielles System, wie das pNA-Assay, nicht dazu geeignet ist die Inhibition eines komplexen physiologischen Vorganges zu beschreiben. Aus diesem Grund wurden keine weiteren pNA-Assays mehr für die Wirkungsbestimmung verschiedener *Compounds* herangezogen. Diese Entscheidung wird im entsprechenden Abschnitt dieser Arbeit ausführlich diskutiert.

***In-vitro* Aktivitätsanalysen verschiedener DegS-Punktmutanten**

Um eine ungefähre Einordnung vornehmen zu können, wie der *Compound* LDC043908 und seine Derivate auf die Aktivität von DegS wirken, wurden verschiedene Punktmutanten von DegS benutzt. Es handelt sich dabei gänzlich um in der Literatur bereits beschriebenen Varianten (siehe Übersicht), die an distinkten Stellen in Aktivität und Regulation der Aktivität von DegS eingreifen.

Da, anders als in anderen HTRA Proteasen, die PDZ-Domäne bei DegS eine wichtige regulatorische Rolle übernimmt, die PDZ-lose Variante von DegS aber weiterhin aktiv ist (wenn auch in einem deutlich geringeren Umfang), wurde zunächst diese Variante von DegS im Zusammenhang mit LDC043908 untersucht.

In Abb. 23 ist ein solcher Verdau abgebildet, gereinigtes RseA wurde durch die PDZ-lose Variante von DegS (DegS- Δ PDZ) verdaut. Da diese Variante eine deutlich geringere katalytische Rate aufweist, musste die Versuchsdauer erhöht werden (bis zu 5h). Es zeigt sich ein langsamer Verdau des eingesetzten RseA mit der Zeit. Wird 400 μ M LDC043908 hinzugegeben, ist keine Veränderung des Verdau zu beobachten. Zur Kontrolle wurde dieser Versuch ebenfalls mit einem bekannten *active-site Inhibitor* von Serinproteasen (LDC070404; siehe Abschnitt 4.3.1 und 4.3.2) durchgeführt. In diesem Versuchsteil ist eine deutliche Inhibition von DegS- Δ PDZ erkennbar, erst nach etwa 5h ist eine leichte Abbaubande von RseA erkennbar.

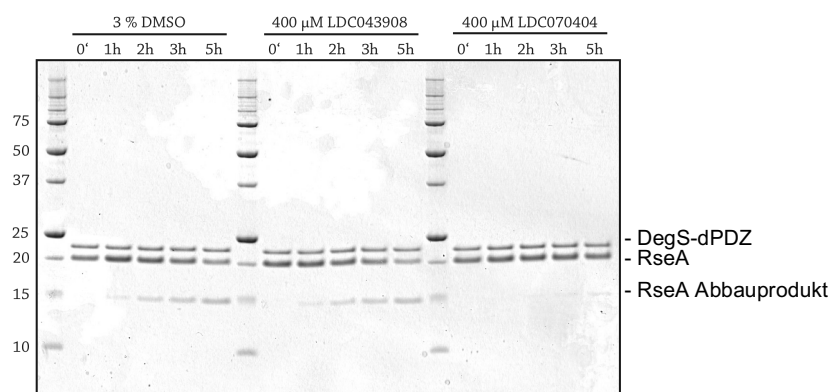


Abb. 23: RseA-Verdau durch DegS- Δ PDZ mit LDC043908 und LDC070404

Gereinigtes RseA wurde durch DegS- Δ PDZ (Variante ohne PDZ-Domäne) verdaut. Dabei wurden angegebene Konzentrationen des *Compounds* LDC043908 und des *active-site* Inhibitors LDC070404 (siehe Abschnitt 4.3.2) zugegeben. Als Kontrolle wurde eine volumenmäßig gleiche Menge DMSO eingesetzt.

Daraus wird deutlich, dass DegS- Δ PDZ zwar allgemein inhibiert werden kann, LDC043908 aber nicht mehr dazu in der Lage ist.

Aufbauend auf dieser Erkenntnis wurden weitere Varianten von *degS* als Expressionsvektoren kloniert, Bakterien damit transformiert und die produzierten Proteine aufgereinigt. Dabei wurden vor allem Mutanten gewählt, die distinkte Regulationsprozesse der DegS-Aktivierung auf verschiedene Weisen und an verschiedenen topographischen Punkten beeinflussen. In Tab. 9 findet sich eine Übersicht derer Mutanten, die untersucht wurden, inklusive einer kurzen Beschreibung und der relevanten Literatur.

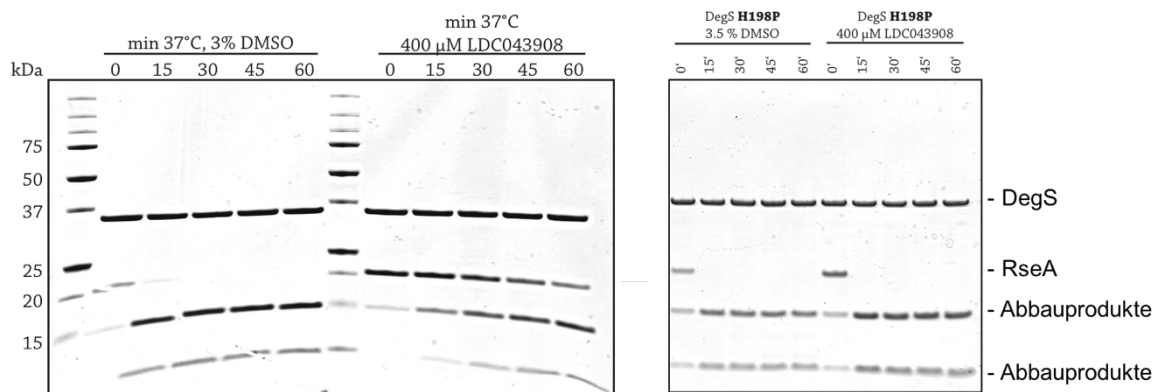


Abb. 24: Beispielhafte Verdaureaktionen mit DegS-Punktmutanten und LDC043908

Verdaureaktionen von DegS-Punktmutanten L181A (links) und H198P (rechts), jeweils in der Kontrolle mit DMSO und 400 μ M LDC043908. Alle Reaktionen wurden mit 50 μ M FFF Aktivatorpeptid durchgeführt.

Die in Abb. 24 zu sehenden Gele stellen beispielhaft die durchgeführten Versuche mit den DegS-Punktmutanten da. Wie in allen anderen Versuchen wurden zunächst Kontrollversuche mit 5 μ M der Protease, 50 μ M FFF Aktivatorpeptid und 10 μ M RseA durchgeführt. Dazu kamen Bestimmungen der Basalaktivität (nicht abgebildet), bei denen nur DegS und RseA zusammengegeben wurden und nach einer Inkubation über Nacht der Anteil des verdauten RseA semi-quantitativ per Gelanalyse bestimmt wurde (Ergebnisse ebenfalls in Tab. 10). Im dritten Versuchsteil wurden dann jeweils 400 μ M LDC043908 hinzugegeben und der Verdau wie schon oben beschrieben ausgewertet (Ergebnisse siehe Tab. 10).

Tab. 9 (folgende Seite): Verzeichnis der untersuchten DegS-Punktmutanten

Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten DegS-Punktmutanten mit Referenzen und kurzer Beschreibung ihrer Bedeutung.

DegS-Mutante	Domäne	Effekt	Referenz	Bedeutung
D122A	Protease	deutliche Reduktion der Proteaseaktivität	(Sohn et al. 2007; Hasselblatt et al. 2007)	Ausbildung einer Salzbrücke mit R256 im aktiven und inaktiven Zustand, evtl. noch andere Bedeutung
Y162F	Protease, LD	60 % Reduktion der Proteaseaktivität	(Sohn et al. 2007; Hasselblatt et al. 2007)	Wasserstoffbrückenbildung mit E227
R178A	Protease, L3	deutliche Reduktion der Proteaseaktivität	(Sohn et al. 2007; Sohn J Sauer RT 2010)	Bildet Ionen-Paar-Netzwerk mit E317 und D320, evtl. noch andere wichtige Funktion
L181A	Protease, L3	wie WT, aber leicht erhöhte Basalaktivität	(Wilken et al. 2004), Sonja Hasenbein	Interaktion stabilisiert Aktivierungsdomäne
T184A	Protease, L3		(Wilken et al. 2004), Alexandra Beil	verändert Position von L3 nach Bindung eines Aktivators
H198P	Protease, L1	erhöhte Basalaktivität	(Sohn et al. 2007; Chaba et al. 2011)	Stabilisiert das <i>oxyanion-hole</i> und damit die aktive Konformation ohne Zutun eines Aktivators
K222P	Protease, L2	wie WT	Sonja Hasenbein	
E320I	Protease, L2	50 % verringerte Proteaseaktivität	Sonja Hasenbein	wichtig für hydrophobes Cluster in Trimer-Stabilisierung
K243D	Protease	erhöhte Basalaktivität	(Sohn et al. 2007; Chaba et al. 2011)	inhibitorische Interaktion zwischen Protease- und PDZ-Domäne (K243-E324)
R256A	<i>linker</i> -Region	erhöhte Basalaktivität	(Sohn et al. 2007)	bildet Salzbrücke mit D122, Verbindung sowohl im aktiven als auch im inaktiven Zustand ausgebildet
D320A	PDZ	erhöhte Basalaktivität	(Sohn et al. 2007)	Bildet Ionen-Paar mit R178 (nur im inaktiven Zustand)
Y351A	PDZ	schwach aktiv	Sonja Hasenbein	Evtl. Interaktion mit dem L3 Loop

Tab. 10: Ergebnisse der Inhibitionstests mit DegS-Punktmutanten

Mutante	Lokalisation in DegS	Aktivität	Inhibition durch LDC043908
D122A	Protease	+	***
Y162F	Protease, LD	+	***
R178A	Protease, L3	keine	nicht bestimmbar
L181A	Protease, L3	+++ (basal)	*
T184A	Protease, L3	keine	nicht bestimmbar
H198P	Protease, L1	+++ (basal)	-
K222P	Protease, L2	+	***
E230I	Protease, L2	++	***
K243D	Protease, Helix	+++ (basal)	*
R256A	Protease, linker	+++	*
D320A	PDZ	+++ (basal)	*
Y351A	PDZ	++ (basal)	*

Zusammenfassung der Aktivitäts- und Inhibitionstest mit den beschriebenen DegS-Punktmutanten. Zunächst wurde die Aktivität nach Aktivatorpeptidzugabe untersucht und eingestuft, dabei entspricht (+++) der wildtypischen Aktivität. Inhibitionsmessung bei Gabe von 400 μM LDC043908, (***) entspricht dabei einer inhibitorischen Wirkung wie beim Wildtyp. Basal bezieht sich auf eine Aktivität von DegS ohne Zugabe von Aktivatorpeptid

Untersucht wurden verschiedene DegS-Punktmutanten, die an verschiedenen Stellen (sowohl topographisch als auch funktionell) in die Regulation der Aktivität von DegS eingreifen (Zusammenfassung siehe Tab. 9). Dabei wurden zwei Mutanten von DegS gefunden, die nicht mehr durch 50 μM FFF Aktivatorpeptid aktivierbar sind (R178A und T184A), dadurch ist die Inhibition durch 400 μM LDC043908 für diese Varianten von DegS natürlich auch nicht bestimmbar. Es wurde außerdem nur eine einzige Mutante gefunden, bei der 400 μM LDC043908 keinerlei Wirkung mehr auf die Aktivität im RseA-Verdau zeigen (H198P). Alle anderen Versionen weisen eine bestimmbare Aktivität nach Gabe von 50 μM FFF Aktivatorpeptid auf und können zumindest teilweise durch Anwesenheit von 400 μM LDC043908 in ihrer Aktivität des RseA-Verdau gehemmt werden. Viele der mutierten DegS-Varianten weisen eine basale Aktivität auf, sind also auch ohne Zugabe von FFF im RseA-Verdau aktiv. Aufgrund dessen, dass die mutierten Versionen bereits in der Literatur beschrieben wurden und recht gut bekannt ist, auf welche Art und wo sie in den Regulationsmechanismus der DegS-Aktivität eingreifen, kann der Effekt von LDC043908 auf die Mutanten gut diskutiert werden (siehe Abschnitt 5.1).

RseA-Verdau Assays mit verschiedenen Aktivatorpeptiden

Um weitere Hinweise auf den Wirkungs- bzw. Bindungsmechanismus von LDC043908 und seinen Derivaten gegenüber der Aktivität von DegS zu erlangen, wurden außerdem RseA-Verdau Assays mit anderen Aktivatorpeptiden als FFF durchgeführt. So wurden die bereits beschriebenen Aktivatorpeptide DNRLGLVYQF und DNRLGLVYWF (Wilken et al.

2004) sowie der natürliche N-Terminus von OmpC als Peptid IVALGLVYQF in den Verdau eingesetzt.

In Abb. 25 sind die Ergebnisse dieser Versuche zu sehen, es wird deutlich, dass alle untersuchten Peptide aktivieren., wobei die Aktivierung unterschiedliche Qualitäten aufweist. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden die Konzentrationen der Peptide so angepasst, dass die katalytische Aktivität von DegS in allen Fällen in etwa gleich hoch ist. Werden verschiedene Arten von DegS-Inhibitoren dazu gegeben, werden verschiedene Ergebnisse erzielt. Während 50 μM des *active-site* Inhibitors LDC198181 in allen Fällen ausreichen um eine komplette Inhibition von DegS im RseA-Verdau über den untersuchten Zeitraum zu erreichen, lässt sich mit 400 μM LDC043908 jetzt nur noch eine sehr geringe Inhibition der DegS-Aktivität erreichen. Identische Ergebnisse wurden auch mit den verkürzten Aktivatorpeptiden RLGLVYQF und RLGLVYWF erzielt (nicht abgebildet).

Um eine störende sterische Interaktion mit dem nicht gebundenen Rest des Peptides (nur –VYQF/-VYWF binden an DegS) ausschließen zu können, wurden außerdem Versuche mit den kürzeren Peptiden ALGLVYQF (ohne Abbildung), VYQF und VYWF durchgeführt (Abb. 25).

Aus Abb. 26 geht deutlich hervor, dass die verkürzten Aktivatorpeptide VYQF und VYWF DegS im RseA Verdau deutlich schlechter aktivieren als die jeweiligen langen Versionen (Abb. 25) DNRLGLVYQF und DNRLGLVYWF. Bei jeweils 100 μM ist jedoch eine deutliche Aktivierung der katalytischen Aktivität von DegS im RseA-Verdau feststellbar. Es ist außerdem deutlich, dass die Zugabe von 400 μM LDC043908 in keinem der beiden Fälle eine Wirkung hat. Für die Versuche mit dem Peptid ALGLVYQF (ohne Abbildung) ergab sich das gleiche Bild.

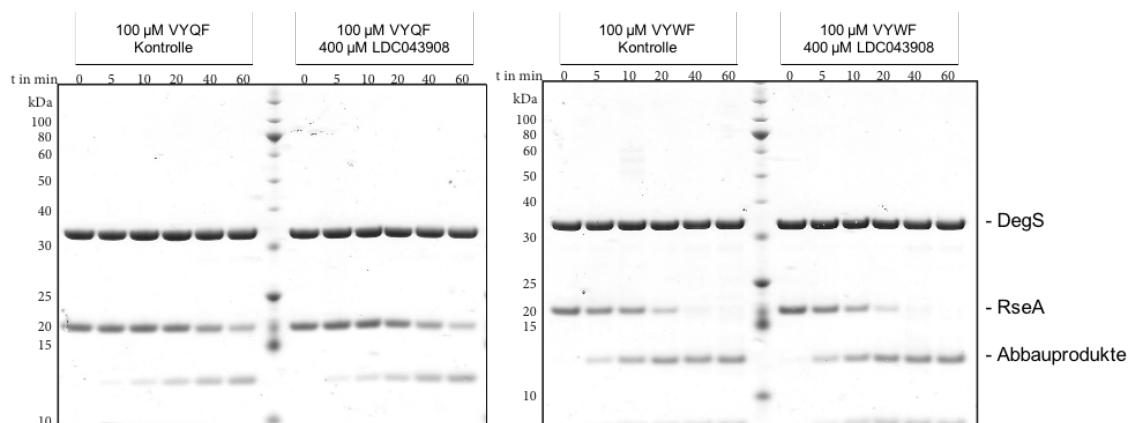


Abb. 25: RseA-Verdau durch DegS mit kurzen Aktivatorpeptiden und LDC043908

RseA-Verdau (10 μM) durch DegS (5 μM) mit kurzen Aktivatorpeptiden (VYQF und VYWF) mit und ohne 400 μM LDC043908. Als Kontrolle diente jeweils die volumenmäßig gleiche Menge DMSO. Alle Versuche wurden wie beschrieben durchgeführt.

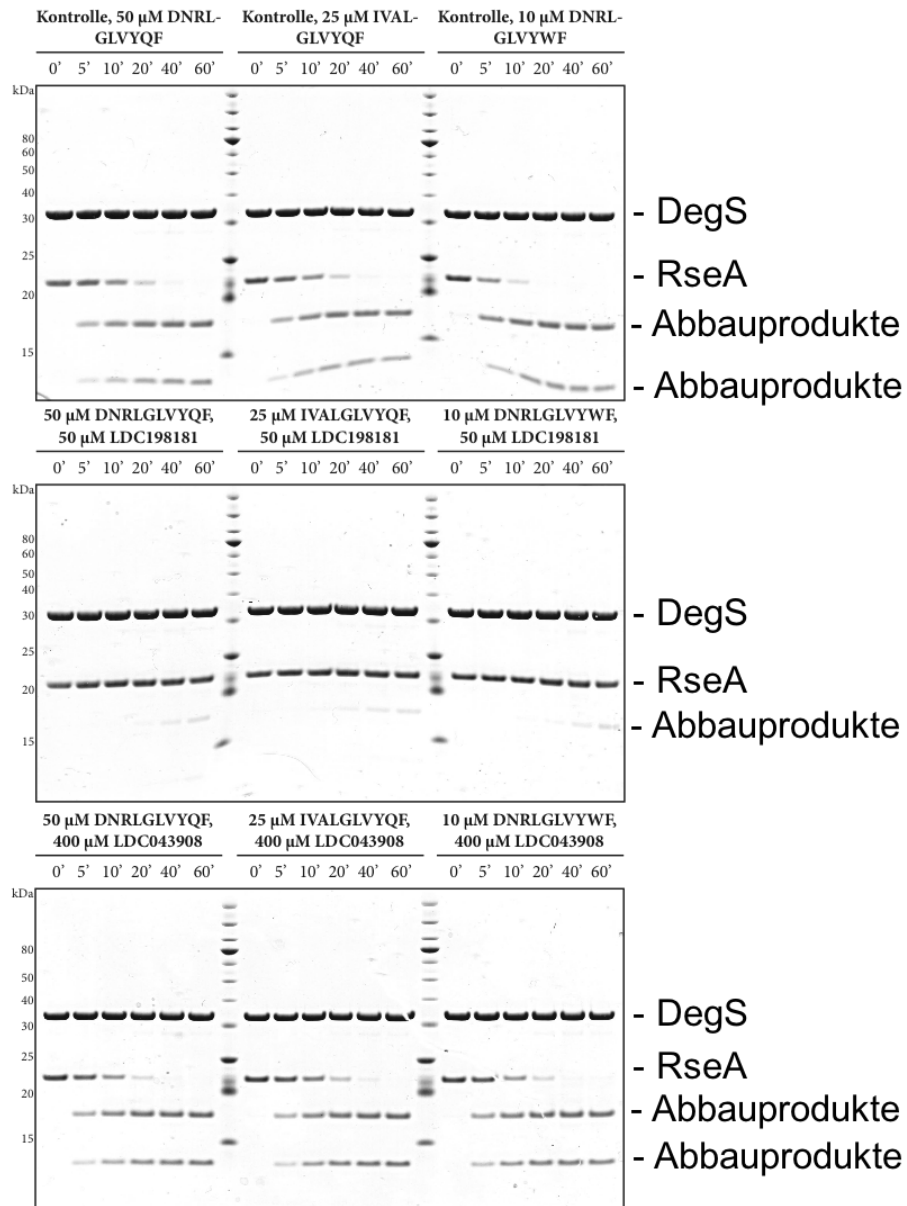


Abb. 26: RseA-Verdau durch DegS mit langen Aktivatorpeptiden und Inhibitoren

10 μM gereinigtes RseA wurden durch 5 μM gereinigtes DegS in 150 mM NaH₂PO₄ (pH 8.3), 380 mM NaCl, 10 % Glycerin bei 37°C verdaut. Aktivierung durch indizierte lange Aktivatorpeptide. Kontrollen mit volumemäßig gleicher Menge DMSO, LDC198181 ist ein bekannter *active-site* Inhibitor von Serinproteasen.

4.2.2 Zelluläre Assays

Wachstumskurven

Ebenso relevant wie die Inhibition von DegS in *in-vitro* Assays, aber auch deutlich komplexer, ist die Bewertung der zu untersuchenden *Compounds* auf ihre Inhibition von DegS in vollständigen physiologischen Systemen. Es gilt zu zeigen, dass ein *Compound*, der die Aktivität von DegS in einem *in-vitro* Assay (z.B. RseA-Verdau) inhibieren kann, auch in der Lage ist, Inhibition von DegS in lebenden Bakterien zu zeigen. Die Aktivität von DegS in lebenden Bakterien erzeugt keinen direkten Phänotypen und kann so nicht einfach ausgelesen werden. Weil abgesehen davon die gewünschte physiologische Wirkung die Inhibition von Bakterienwachstum (oder sogar deren Tod) ist, wurden zunächst Wachstumskurven von Bakterien in Flüssigkulturen angefertigt. Zu diesem Zweck wurden die Kulturen in Voll- oder Minimalmedium auf eine definierte optische Dichte (also auch definierte Zellzahl pro ml) angeimpft und LDC043908 entweder sofort nach Überimpfen oder kurz vor der exponentiellen Wachstumsphase zugegeben. Das Wachstum der Kultur wurden über die Messung der optischen Dichte bei 600 nm in definierten Abständen verfolgt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Zugabe des Inhibitors kurz vor der exponentiellen Wachstumsphase (ohne Abbildung) machte keinen Unterschied im Vergleich zur direkten Zugabe, und so wurden diese Experimente nicht mehr durchgeführt. Alle gezeigten Wachstumskurven beziehen sich also auf die direkte Zugabe der indizierten Inhibitorkonzentration.

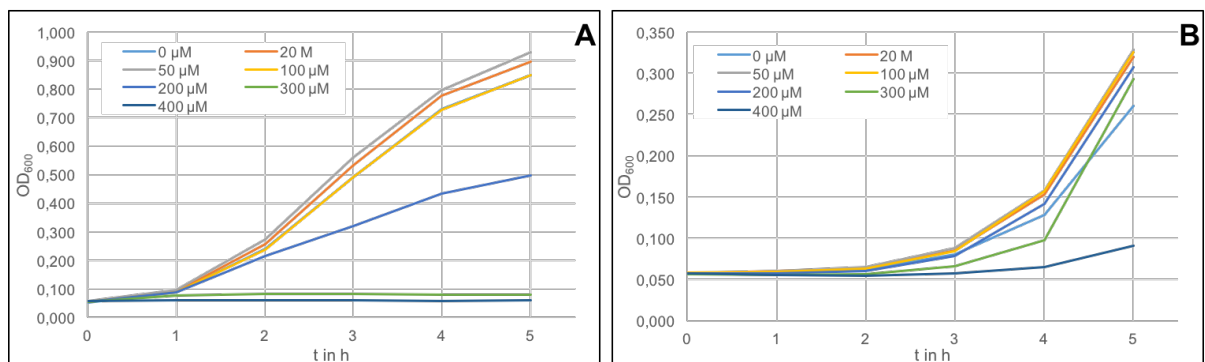


Abb. 27: Wachstumskurven CAG16037 (WT-Reporterstamm) und CAG33315 ($\Delta degS$ Reporterstamm) mit steigenden LDC043908-Konzentrationen.

(A) CAG1607, Reporterstamm mit DegS, (B) CAG33315, Reporterstamm ohne DegS. Kulturen wurden aus ÜNK auf $OD_{600}=0,1$ angeimpft und direkt mit den entsprechenden Konzentrationen LDC043908 versetzt. Messung der OD_{600} stündlich im Plattenleser (Tecan Genios Pro), abgebildet sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmung.

Abb. 27 zeigt die Wachstumskurven der Reporterstämme CAG16037 (WT) und CAG33315 ($\Delta degS$) unter Einfluss steigender LDC043908 Konzentrationen. Beide Stämme werden durch die Zugabe von LDC043908 in ihrem Wachstum gehemmt, wenn auch beide Stämme sehr unterschiedlich auf gleiche Konzentrationen reagieren. So scheint es, als ob

LDC043908-Konzentrationen von bis zu 300 μM den Deletionsstamm nicht hemmen, ja sogar das Wachstum beschleunigen. Erst bei 400 μM kann man eine deutliche Hemmung des Wachstums erkennen. Der WT Stamm wird jedoch dosisabhängig durch Zugabe von LDC043908 in seinem Wachstum gehemmt, ab etwa 200 μM kommt es zu einer Halbierung des Wachstums, bei Konzentrationen die darüber liegen, ist überhaupt kein Wachstum mehr zu beobachten.

Um diese Unterschiede deutlicher darzustellen, sind in Abbildung 28 die (auf die unbehandelte Kontrolle) normierten optischen Dichten bei 600 nm am Ende eines Wachstumsexperimentes der beiden Stämme in Abhängigkeit der zugefügten LDC043908 Konzentration aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die optische Dichte einer Bakterienkultur nach 5 Stunden beim Stamm CAG16037 (WT) ab einer Konzentration von etwa 100 μM LDC043908 deutlich reduziert wird. Ab einer Konzentration von etwas über 200 μM ist die Reduktion des Wachstums maximal und das rel. Wachstum bewegt sich gegen Null. Anders sieht es beim Stamm CAG33315 ($\Delta degS$) aus. Hier ist bis zu einer LDC043908 Konzentration von etwas über 300 μM keine Beeinflussung der optischen Dichte am Ende des Experimentes zu beobachten. Bei darüber hinaus steigenden Konzentrationen nimmt die gemessene optische Dichte aber auch hier schnell ab, ein unteres Limit des Wachstums, wie bei CAG16037, wird aber in dem gemessenen Konzentrationsbereich nicht erreicht.

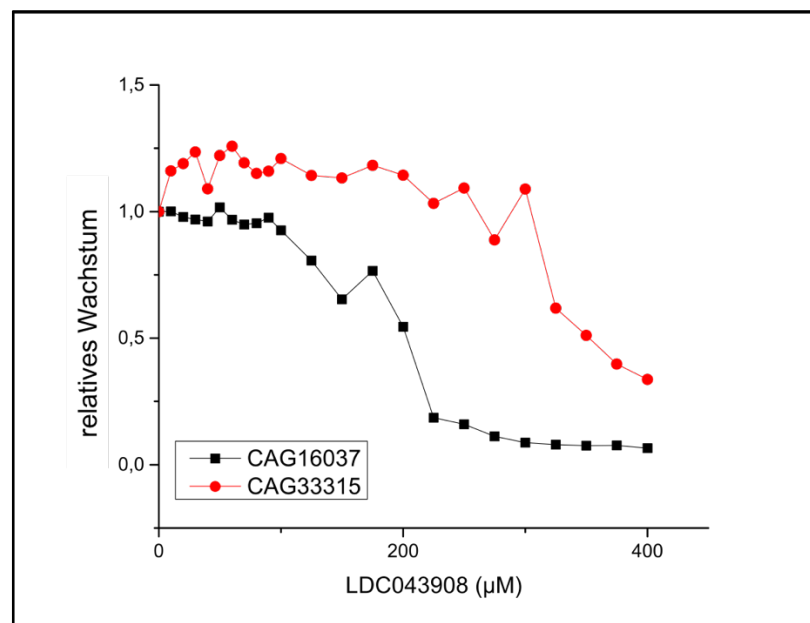


Abb. 28: Vergleich des Wachstums (Endpunkt) CAG16037 und CAG33315 mit verschiedenen LDC043908 Konzentrationen.

Die auf die unbehandelte Kontrolle normierten optischen Dichten am Ende eines Wachstumsexperimentes nach 5h Inkubation wurden gegen die Konzentration von LDC043908 aufgetragen. Ausgewertet wurden die Reporterstämme CAG16037 (WT) und CAG33315 ($\Delta degS$). Die optische Dichte (Endpunktanalyse) wurde auf die optische Dichte der unbehandelten Kontrolle normiert.

Für den *Compound* ALS182 (LDC043908 Derivat) zeigt sich in der Wachstumsanalyse (Abb. 29) zunächst ein ähnliches Bild, im Wildtypstamm BW30270 ist das Wachstum allerdings erst durch die Zugabe von 400 μM des Moleküls deutlich gehemmt, hier ist kein Wachstum mehr zu erkennen. Betrachtet man hingegen den gleichen Versuch im Stamm MM518, welcher eine Defizienz bei der Effluxpumpe TolC aufweist und eine deutlich verringerte Lipopolysaccharid- (LPS-) Schicht besitzt ($\Delta galE$, $\Delta galK$) ist schon ab 25 μM des Moleküls im Medium eine deutliche Hemmung des Wachstums erkennbar. Steigt die Konzentration darüber hinaus, ist überhaupt kein Wachstum mehr vorhanden. Die hier negativ dargestellten Werte sind durch potenzierte Messfehler in diesem System entstanden und können als Nullwerte betrachtet werden.

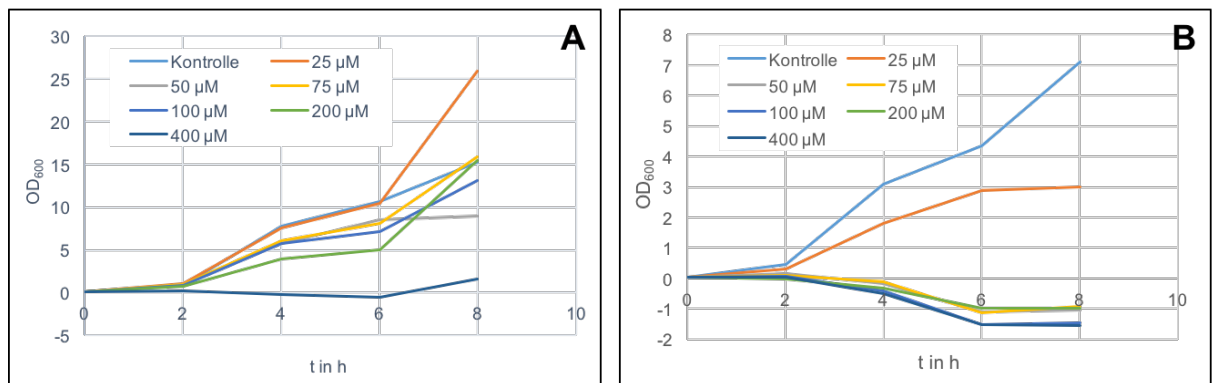


Abb. 29: Wachstum von BW30270 (WT) und MM518 ($\Delta tolC$, LPS) unter Einfluss von ALS182

Flüssigkulturen in Vollmedium (NZA) von (A) BW30270 (WT) und (B) MM518 ($\Delta tolC$, LPS defizient) wurden auf eine $OD_{600}=0,1$ mit entsprechenden ÜNK angeimpft und direkt mit den angegebenen Konzentrationen ALS182 versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Rundschtüttler, zweistündliche Messung der optischen Dichte am Plattenleser (Molecular Devices, MX5), aufgetragen sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmung

Minimale inhibitorische Konzentrationen (MIC) bei klinisch relevanten Bakterienstämmen

Da es wenig sinnvoll ist nur Messungen mit Laborstämmen von *E. coli* durchzuführen, wenn ein Wirkstoff entwickelt werden soll, der auch bei wirklichen, physiologisch relevanten Infektionen wirkt, wurden Messungen mit weiteren Stämmen durchgeführt. Dazu wurden in Kooperation mit Jörg Steinmann vom Institut für klinische Mikrobiologie (Universitätsklinikum Essen) minimale inhibitorische Konzentrationen von LDC043908 gegenüber einer Reihe klinische relevanter Stämme bestimmt (Tab. 11).

Tab. 11: Minimale inhibitorische Konzentrationen (MIC) LDC043908 für klinisch relevante Bakterienstämme

Bakterienstamm	Kennnummer	getesteter Bereich (μM)	Medium	MIC (μM)
Gram-positive				
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	100-600	MHB	300
<i>Staphylococcus aureus (MRSA2040)</i>	(B59)	100-600	MHB	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	25-600	BHI	100
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619	25-600	BHI	100
<i>Enterococcus faecium (Vancomycin resistant)</i>	(vb885)	100-600	MHB	200
Gram-negative				
<i>E. coli</i>	(DSM1103)	100-600	MHB	300
<i>E. coli (ESBL)</i>	(vv1400)	100-600	MHB	300
<i>Salmonella enterica</i>	14028	100-600	MHB	500
<i>Serratia marcescens</i>	13880	100-600	MHB	600
<i>Enterobacter cloacae</i>	700323	100-600	MHB	300
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	25-600	MHB	100
<i>Burkholderia cepacia</i>	17759	100-600	MHB	-
<i>Acinetobacter iwofii</i>	15309	25-600	MHB	100
<i>Shigella flexneri</i>	29903	100-600	MHB	200
<i>Neisseria meningitidis</i>	(DSM10036)	25-600	BHI	100
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	13637	100-600	MHB	200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	100-600	MHB	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(762)	100-600	MHB	-
<i>Achromobacter xyloxidans (pan-resistant)</i>	(vv960)	100-600	MHB	-

MIC Werte wurden durch Jörg Steinmann (Institut für klinische Mikrobiologie, UK Essen) per *microdilution* Methode durchgeführt. Angegeben sind die Namen der untersuchten Bakterienstämme, deren Kennnummern nach ATCC-Standard, der untersuchte Konzentrationsbereich von LDC043908, das verwendete Medium (MHB: Müller-Hinton broth; BHI: brain heart infusion broth) und die gemessene minimale inhibitorische Konzentration.

Dabei wurden fünf Gram-positive und 14 Gram-negative Keime herangezogen und im sog. *microdilution* Verfahren diejenige Konzentration von LDC043908 bestimmt, bei der zuerst eine Hemmung des Wachstums gegenüber einer Referenzkultur erzielt werden konnte. Dabei konnte für 14 der 19 getesteten Stämme eine inhibitorische Wirkung durch LDC043908 festgestellt werden. Die gefundenen MIC-Werte lagen dabei zwischen 100 μM (z.B. *Streptococcus pneumoniae*) und 600 μM (z.B. *Serratia marcescens*). Die Stämme *Achromobacter xyloxidans (pan-resistant)*, *Pseudomonas aeruginosa (762)*, *Pseudomonas aeruginosa (27853)*, *Burkholderia cepacia* und *Staphylococcus aureus (MRSA2040)* konnten im getesteten Konzentrationsbereich (bis 600 μM) nicht durch LDC043908 in ihrem Wachstum gehemmt werden.

β-Galactosidase-Assay

Mit Hilfe des beschriebenen β -Galactosidase-Assays (Abschnitt 3.3.3), sollte die Inhibition von DegS durch LDC043908 in lebenden Bakterien gezeigt werden. Hierzu werden Reporterstämme verwendet (CAG16037, CAG33315, CAG22968), die eine Kopie des Gens der β -Galactosidase (*lacZ*) unter Kontrolle eines σ^E spezifischen Promotors aufweisen. So kommt es in diesen Stämmen bei einer hohen Aktivität des σ^E Signalweges (initial ausgelöst durch DegS Aktivität) zu einer vermehrten Produktion von β -Galactosidase. Die Menge an β -Galactosidase kann über deren Aktivität in der Spaltung eines artifiziellen Substrates ONPG gemessen werden, indem die Gelbfärbung des Mediums durch das Spaltungsprodukt o-Nitrophenol kolorimetrisch quantifiziert wird. Um den σ^E Signalweg über Aktivität von DegS zuverlässig und reproduzierbar stimulieren zu können, wurde außerdem ein Plasmid in die Bakterien eingebracht, welches für ein Induktorprotein kodiert (im folgend Stressplasmid genannt). Dieses ist ein Fusionsprotein, bestehend aus dem *maltose binding protein* (MBP) um eine hohe Stabilität zu gewährleisten, und den 50 N-terminalen Aminosäuren von OmpC (endend auf -YQF), welche den natürlichen Induktor der DegS-Aktivität enthalten, ohne dabei die physiologische Funktion von OmpC zu erfüllen (Abb. 30).

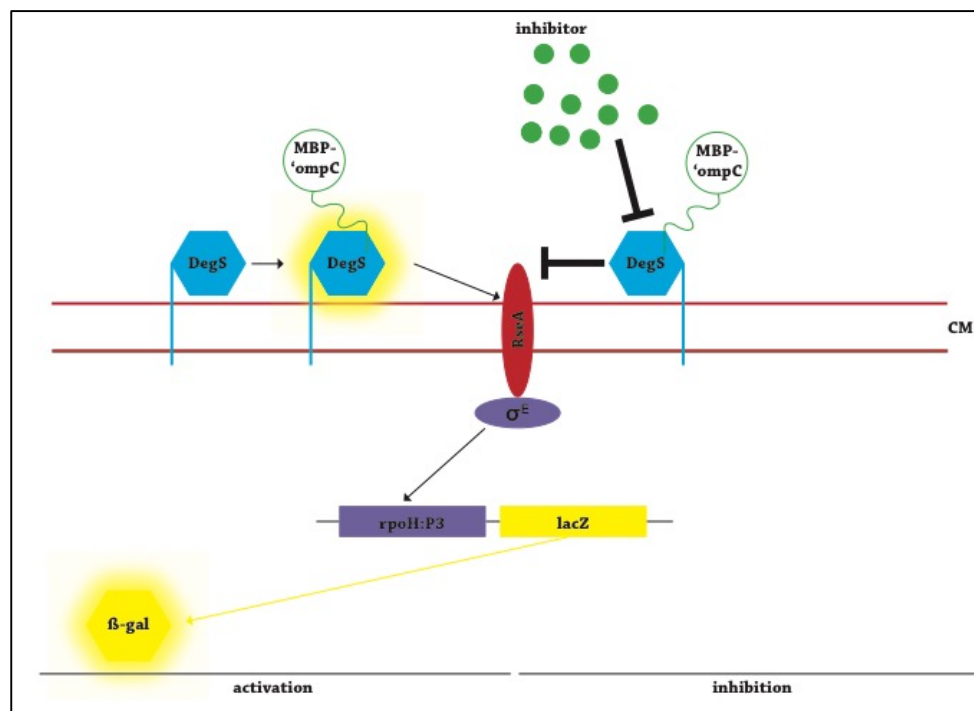


Abb. 30: Schematische Darstellung β -Galactosidase-Assay

DegS wird durch die Expression des Fusionsproteins MBP-OmpC aktiviert, stimuliert so den σ^E -Signalweg und die Freisetzung des Sigmafaktors RpoE. Dann kommt es zur Interaktion mit dem spezifischen Promotor rpoH:P3 und zur Translation des *lacZ* Gens. Die Transkription zur β -Galactosidase sorgt für eine kolorimetrisch messbare Aktivität. Wird die Aktivierung von DegS durch einen Inhibitor verhindert, zeigt sich das in der Verringerung der β -Galactosidaseaktivität.

Zur Überprüfung der Expression des fusionierten (artifiziiellen) Induktorproteins und seiner korrekten Lokalisation wurde eine Analyse per *Western Blot* mit anschließender Immundetektion durchgeführt. Dazu wurde mittels kaltem osmotischen Schock ein periplasmatisches Extrakt transformierter *E. coli* Bakterien gewonnen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und der Immundetektion gegenüber MBP unterzogen.

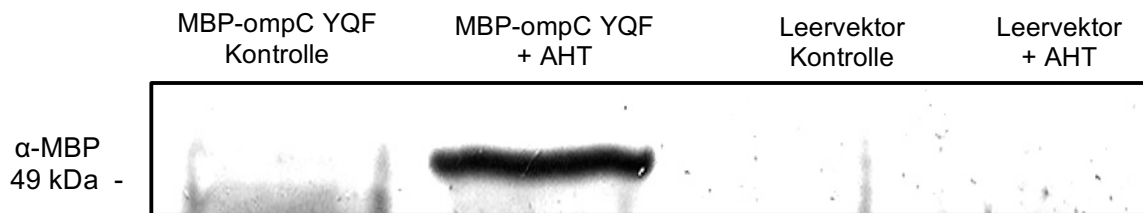


Abb. 31: Expressionskontrolle mit gleichzeitiger Lokalisationskontrolle für MBP-OmpC Fusionsprotein
Periplasmatische Extrakte wurden wie beschrieben nach 5h Kultur in LB-Medium hergestellt. Kulturen wurden aus frisch transformierten Vorkulturen angeimpft und (wo zutreffend) mit 200 ng/ml AHT induziert. Die Immundetektion erfolgte über einen MBP Primärantikörper. Die angezeigte Größe von 49 kDa entspricht der theoretischen Größe des Fusionsproteins.

Es konnte gezeigt werden, dass das artifiziielle Fusionsprotein in den Versuchskulturen nur bei entsprechender Transformation im Periplasma vorliegt (Abb. 31). Ohne Induktion ist eine geringe Menge des Proteins zu erkennen, diese wird durch die Zugabe von 200 ng/ml des Induktors AHT deutlich erhöht.

Mit diesem System (siehe Abb. 30) kann nun die Aktivität des σ^E -Signalweges durch die Induktion der Expression des Fusionsproteins hochreguliert werden. Wenn zusätzlich ein Inhibitor dazu gegeben wird, sollte die messbare DegS-Aktivierung wieder herunter reguliert werden können.

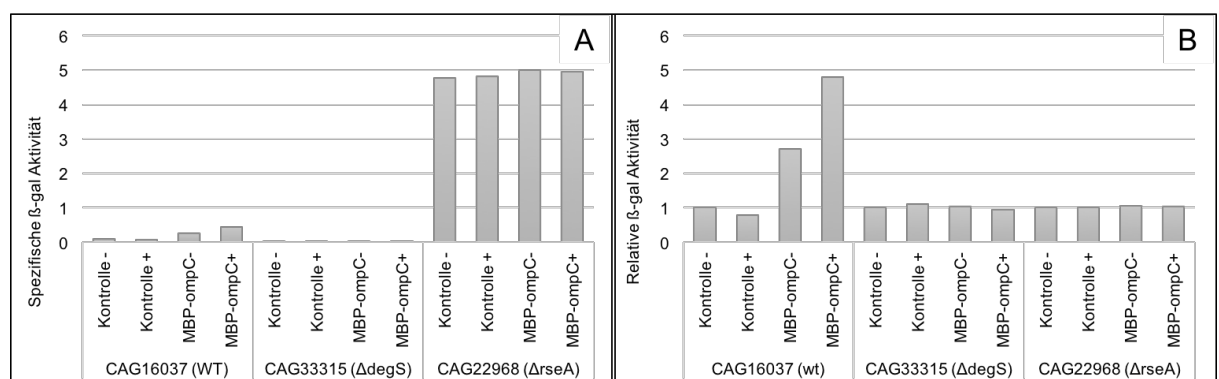


Abb. 32: Beweis der Durchführbarkeit des β -Galactosidase-Assays mit verschiedenen Stämmen

Darstellung von spezifischen (A) und normierten (B) β -Galactosidase Aktivitäten in verschiedenen Reporterstämmen CAG16037 (WT), CAG33315 ($\Delta degS$) und CAG22968 ($\Delta rseA$). Die Stämme wurden jeweils ohne Stressplasmid (Kontrolle) und mit Stressplasmid (MBP-OmpC) kultiviert und die β -Galactosidaseaktivität kolorimetrisch gemessen. Dabei wurde die Induktion des Stressplasmides mit 10 ng/ml AHT vorgenommen (+), in allen Fällen wurde auch eine unbehandelte Kontrolle (-) gemessen. In (B) wurden die spezifischen Aktivitäten auf die der jeweiligen unbehandelten Kontrolle normiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus technischen Triplikaten. Berechnung wie in Abschnitt 3.3 beschrieben.

In Abb. 32 sind Daten zur Etablierung und zum Machbarkeitsbeweis dieses Assays dargestellt. Die Reporterstämmen CAG16037 (WT), CAG33315 ($\Delta degS$) und CAG22968 ($\Delta rseA$) wurden (MBP-OmpC) oder wurden nicht (control) frisch mit dem Stressplasmid transformiert, über Nacht bei 28°C rollend in M9-Minimalmedium mit Antibiotikum selektioniert und dann auf definierte Konzentrationen ($OD_{600}=0,05$) verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei lediglich 30°C und 230 rpm auf dem Rundschtüttler für 150 min, dann wurde in entsprechend gekennzeichneten Fällen 10 ng/ml AHT (+), der Induktor für das Fusionsprotein, hinzugefügt und nach einer weiteren Stunde Inkubation die β -Galactosidaseaktivität wie beschrieben gemessen. Es ist zu erkennen, dass der Stamm CAG22968 ($\Delta rseA$) die mit Abstand höchste Aktivität der β -Galactosidase aufweist, es folgen mit großem Abstand der wildtypische CAG16037 und die die DegS-defiziente Variante CAG33315. Erst wenn die β -Galactosidaseaktivitäten innerhalb der Gruppen auf ihre jeweilige unbehandelte Kontrolle normiert wird, wird deutlich, dass eine Regulation der Aktivität nur bei CAG16037 stattgefunden hat. Hier wirkt sich schon das Einbringen des uninduzierten Stressplasmides mit einer Verdreifachung der Aktivität aus, die Expression des Fusionsproteins erhöht die Aktivität auf etwa das Fünffache der Ausgangsaktivität. Die Zugabe des Induktors in den nicht-transformierten Stamm wirkt sich nicht erheblich auf die β -Galactosidaseaktivität aus. Bei den anderen beiden Stämmen ist keine Veränderung der Aktivität durch Zugabe des Induktors oder Transformation mit dem Stressplasmid erkennbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann bestätigt werden, dass ein Experiment grundsätzlich wie geplant durchgeführt werden kann. Allerdings wurde die Resistenz des Stressplasmides noch von Ampicillin zu Chloramphenicol geändert, um die subzelluläre Lokalisation der Resistenzausbildung aus dem Periplasma heraus in das Cytoplasma zu verlegen und so keinen zusätzlichen Stress im Periplasma zu erzeugen.

In Abbildung 33 sind die Ergebnisse des Experimentes mit Inhibitor dargestellt. In den Kontrollansätzen, die nur einen Leervektor enthalten, sind die Unterschiede in der gemessenen β -Galactosidaseaktivität sehr gering. Es ist allenfalls eine leichte Verringerung der Aktivität bei Gabe des Induktor AHT und eine leichte Erhöhung der Aktivität bei Gabe des Inhibitors LDC043908 zu erkennen. In den Ansätzen mit Fusionsgen im Vektor ist klar zu beobachten, dass die β -Galactosidaseaktivität bei Induktion des Stressplasmides mit 10 ng/ml AHT etwas mehr als verdoppelt wird. Wenn außerdem Inhibitor (200 μ M LDC043908) zugegeben wurde, sinkt die β -Galactosidaseaktivität wieder auf das Niveau der nicht induzierten Kontrolle ab.

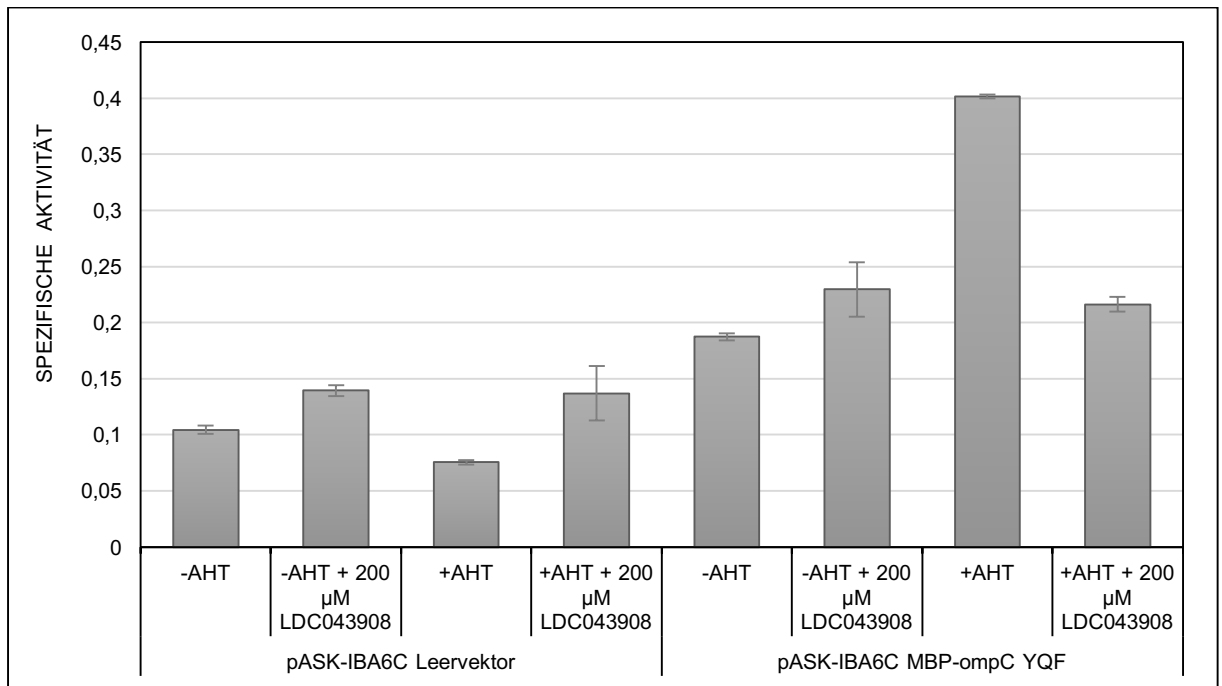


Abb. 33: β -Galactosidaseassay CAG16037 mit Inhibitor LDC043908

Frisch transformierte CAG1607 Bakterien wurden über Nacht in LB + Cm bei 30°C inkubiert und für das Experiment verdünnt ($OD_{600}=0,1$). Experiment in M9-Minimalmedium (0,02 % Glucose, 0,05 % Casaminoacids), Inkubation bei 30°C und 230 rpm auf Rundschtüttler. Zugabe Inhibitor nach 90 min, Zugabe Induktor AHT (Stressinduktion) nach 120 min, Experimentelle Bestimmung β -Galactosidaseaktivität nach 180 min. Aufgetragen sind Mittelwerte aus technischer Dreifachbestimmung und Standardabweichungen. Berechnung der spezifischen Aktivität wie in Abschnitt 3.3 beschrieben.

4.3 HTRA1 Inhibitoren

4.3.1 Biochemische Assays

Systematische Untersuchung von Derivaten der hits aus HTRA1 Inhibitorscreen

Nach dem anfrags beschriebenen HTRA1 Inhibitorscreen wurden die unter pharmakologischen, medizinal-chemischen und praktischen Parametern interessanten *hits* in sechs Gruppen unterteilt und jeweils Derivate gekauft bzw. synthetisiert. Nach ersten Tests am LDC wurden die relevanten Derivate im Rahmen dieser Arbeit auch in orthogonalen Assays untersucht. Dazu zählte die Untersuchung der Inhibition von HTRA1, aber auch die Inhibition anderer Serinproteasen im Sinne der Spezifitätsentwicklung. Im Folgenden sollen die untersuchten Derivate nach Gruppen unterteilt mit ihrer Wirkung und Spezifität dargestellt werden.

Abb. 34 zeigt einen beispielhaften Verdau von β -Casein durch HTRA1.

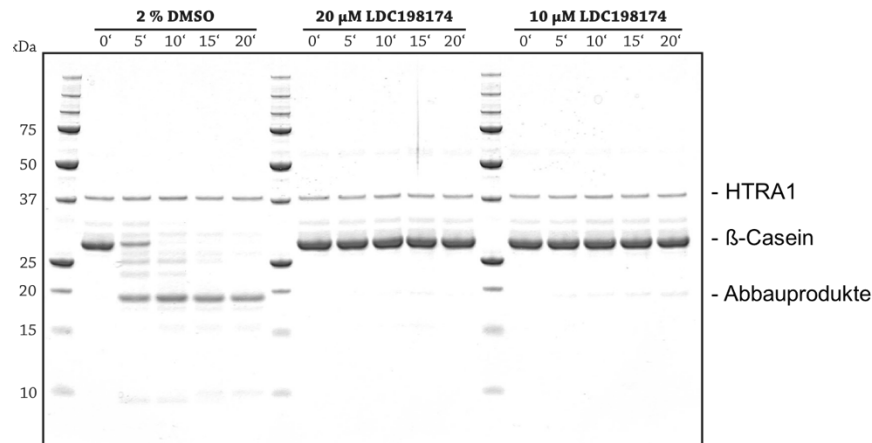


Abb. 34: Beispielhafter β -Casein-Verdau durch HTRA1 mit LDC198174

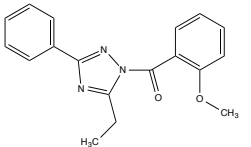
20 μ M β -Casein wurden in 150 mM NaH_2PO_4 (pH 8.3), 380 mM NaCl durch 1 μ M HTRA1 verdaut. Auftrennung und Färbung des Gels wie beschrieben. Negativkontrolle mit der volumenmäßig gleichen Menge an DMSO.

Alle als Ergebnisse aufgeführten Assays wurden bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μ M durchgeführt und wie in Abb. 34 auf einem Gel untersucht. Dabei stehen die Angaben (+++) in den Tabellen für volle Inhibition, also den vollständigen Erhalt des Substrates über den gesamten Versuchszeitraum, (++) für den Erhalt bis zum vorletzten Messpunkt, (+) für den Erhalt bis zum drittletzten Messpunkt, (o) für eine gerade noch erkennbare Inhibition und (-) für keine Inhibition. In manchen Assays war eine Steigerung der Aktivität einzelner Proteasen erkennbar, diese Ereignisse sind auch in den Tabellen gekennzeichnet. Alle Assays (bis auf DegS Assays) wurden mit 1 μ M der Protease und 20 μ M β -Casein als Substrat in 150 mM NaH_2PO_4 (pH 8.3) und 380 mM NaCl durchgeführt. DegS wurde unter den spezifischen Standardbedingungen (Puffer + 10 % Glycerin, 5 μ M Protease, 10 μ M Substrat RseA, 50 μ M Aktivatorpetid FFF) getestet.

In den untenstehenden Tabellen sind außerdem die parentalen *Compounds*, also die *hits* aus dem HTRA1 Inhibitorscreen, fett abgedruckt.

Tab. 12: HTRA1-Inhibitor Derivate der Klasse A (3-Aryl-1-benzoyl-1H-1,2,4-triazole)

Name	Struktur	HtrA1	HtrA2	HtrA3	sonstige
LDC070404		+++	+++	+	+++ (DegS) ++ (DegP) + (Trypsin) o (Chymotrypsin) - (Elastase)
LDC091675		+++	+++	+++	++ (DegS, DegP) o (Trypsin) - (Elastase, Chymotrypsin)
LDC197753		+++	+++	++	+++ (DegS, DegP) ++ (Trypsin, Elastase) + (Chymotrypsin)
LDC197756		+	o	++	+++ (DegP) ++ (Trypsin) + (DegS) - (Elastase, Chymotrypsin)
LDC198173		+++	+++	++	+++ (DegP) ++ (DegS, Trypsin) + (Elastase) o (Chymotrypsin)
LDC198174		+++	+++	++	+++ (DegP, Elastase) ++ (Trypsin, Chymotrypsin) + (DegS)
LDC198175		++	++	+	+ (DegS, DegP, Chymotrypsin) o (Trypsin, Elastase)
LDC198181		+++	+++	+++	+++ (DegS, DegP) ++ (Trypsin) o (Chymotrypsin) - (Elastase)
LDC198919		+	+	-	+++ (DegS) ++ (DegP) + (Trypsin, Chymotrypsin) - (Elastase)
LDC199317		o	o	-	+++ (DegS) + (DegP) + (Chymotrypsin) o (Trypsin) - (Elastase)
LDC199318		+	+	-	+++ (DegS) ++ (DegP) + (Chymotrypsin) o (Trypsin) - (Elastase)

LDC199319		++	+	o	++ (DegS, DegP) + (Trypsin, Chymotrypsin) o (Elastase)
-----------	---	----	---	---	--

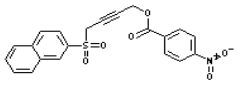
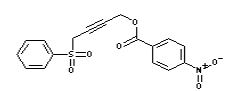
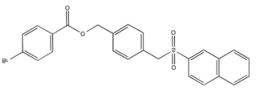
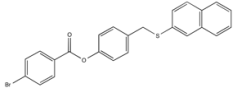
Abgesehen von DegS wurden alle Messungen mit 1 µM Protease und 20 µM β-Casein durchgeführt, DegS wurde bei 5 µM Protease und 10 µM RseA gemessen. Einsatz Inhibitor: jeweils 50 µM

Tab. 13: HTRA1-Inhibitor Derivate der Klasse B (3-benzoyl-benzo(D)oxazol-2(3H)one)

Name	Struktur	HtrA1	HtrA2	HtrA3	sonstige
LDC197757		+++	+++	+	++ (DegP) + (DegS) o (Trypsin) - (Chymotrypsin, Elastase)

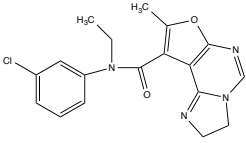
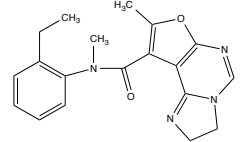
Abgesehen von DegS wurden alle Messungen mit 1 µM Protease und 20 µM β-Casein durchgeführt, DegS wurde bei 5 µM Protease und 10 µM RseA gemessen. Einsatz Inhibitor: jeweils 50 µM

Tab. 14: HTRA1-Inhibitor Derivate der Klasse C (4-(Arylsulfonyl)but-2-in-1-yl Benzoate)

Name	Struktur	HtrA1	HtrA2	HtrA3	sonstige
LDC198178		-	+	o	Aktivierung (DegS) - (DegP, Elastase, Chymotrypsin, Trypsin, Elastase)
LDC198179		o	++	+++	Aktivierung (DegS) ++ (DegP) - (Trypsin, Chymotrypsin, Elastase)
LDC199760		n.d.	n.d.	n.d.	Aktivierung (DegS)
LDC200455		n.d.	n.d.	n.d.	Aktivierung (DegS)

Abgesehen von DegS wurden alle Messungen mit 1 µM Protease und 20 µM β-Casein durchgeführt, DegS wurde bei 5 µM Protease und 10 µM RseA gemessen. Einsatz Inhibitor: jeweils 50 µM

Tab. 15: HTRA1-Inhibitor Derivate der Klasse D (2,3-Dihydrofuro(3,2-e)imidazo(1,2,-c)pyrimidin-9-carboxamide

Name	Struktur	HtrA1	HtrA2	HtrA3	sonstige
LDC199887		-	-	-	- (DegS, DegP, Elastase, Chymotrypsin, Trypsin, Elastase)
LDC199888		-	-	-	- (DegS, DegP, Elastase, Chymotrypsin, Trypsin, Elastase)

Abgesehen von DegS wurden alle Messungen mit 1 μM Protease und 20 μM β -Casein durchgeführt, DegS wurde bei 5 μM Protease und 10 μM RseA gemessen. Einsatz Inhibitor: jeweils 50 μM

Aus der Vielzahl dieser Untersuchungen lassen sich einige Ergebnisse und Hauptaussagen ziehen. So stehen in vielen Fällen die Ergebnisse aus dem Assay am LDC und unseren orthogonalen Assays im absoluten Gegensatz zueinander. Während *Compounds* der Klassen D und E (Tab. 15 und Tab. 16) am LDC sehr gute Ergebnisse bei der Inhibition von HTRA1 zeigten, waren in unseren Untersuchungen keine derartigen Wirkungen feststellbar. *Compounds* der Klasse E zeigen bei der untersuchten Konzentration allenfalls eine leichte Inhibition von DegS, aber keiner anderen Protease. Aufgrund dessen, dass die Verbindungen der Klasse D in den Assays am LDC sehr gute inhibitorische Wirkungen zeigen konnten und in unseren orthogonalen Assays keinerlei Wirkung zeigten, wurden weitere Untersuchungen angestellt um den Grund für diese deutliche Diskrepanz zu finden. Bei der vergleichenden Betrachtung der Assay Parameter fallen zwei Dinge auf. Erstens werden bei den Assays am LDC deutlich geringere Konzentrationen aller Komponenten eingesetzt und zweitens werden die Assays am LDC auch für die humanen HTRA-Proteasen mit RseA als Substrat durchgeführt.

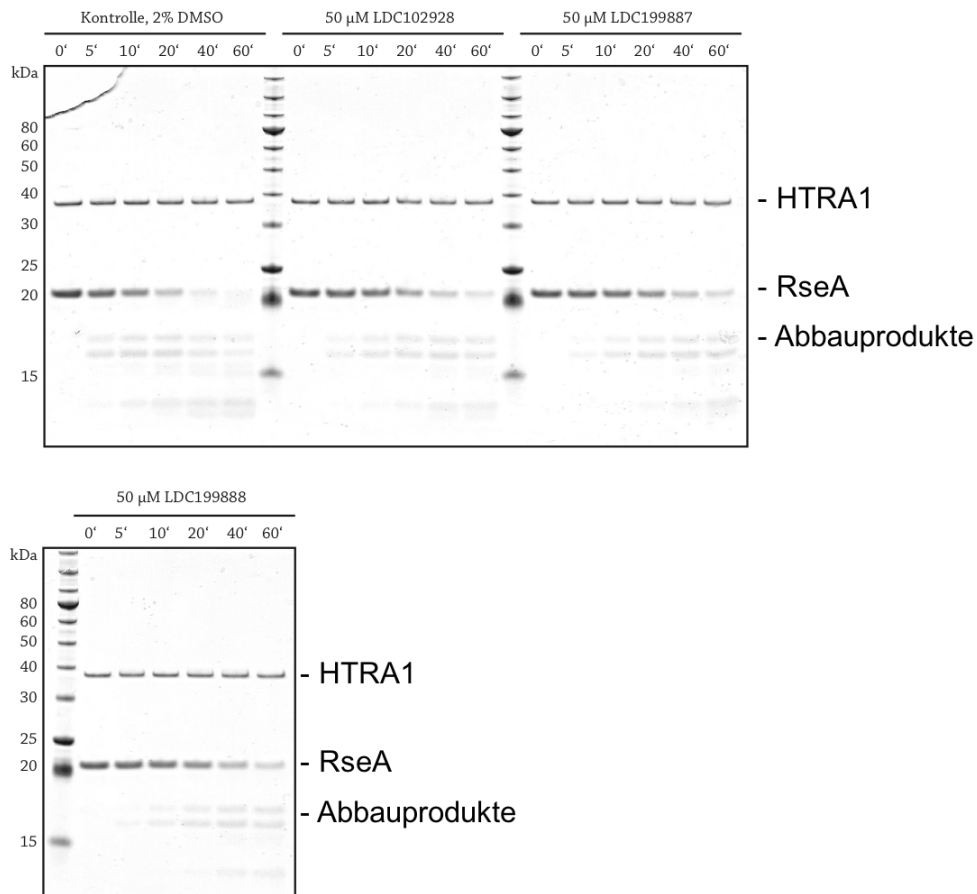


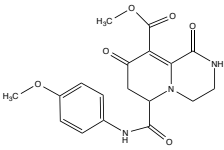
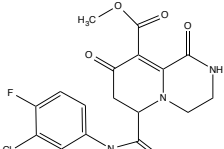
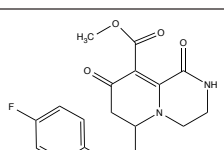
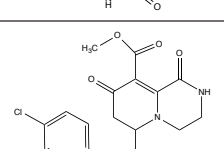
Abb. 35: RseA-Verdau durch HTRA1 mit *Compounds* der Klasse D.

10 μM RseA wurden durch 1 μM HTRA1 in Standardpuffer verdaut. Untersucht wurde der Einfluss von jeweils 50 μM der Klasse D *Compounds* LDC102928 (parentaler *hit* aus dem HTRA1-Inhibitorscreen), LDC199887 und LDC199888. Als Kontrolle diente die volumenmäßig gleiche Menge DMSO.

Eine Herabsetzung der Konzentration aller Komponenten des Assays auf das Niveau der beim LDC angewandten Versuche (25 nM HTRA1, 250 nM β -Casein, 30 nM *Compound*) erwirkte keine Veränderung der Ergebnisse (siehe Anhang), eine Inhibition der Aktivität von HTRA1 war auch hier nicht zu erkennen. Die Veränderung des Substrates zu RseA unter unseren Standardbedingungen (1 μM HTRA1, 10 μM RseA, 50 μM *Compound*) jedoch erwirkte eine deutliche Veränderung. In diesen Versuchen (Abb. 35) war eine deutliche, aber nicht vollständige Inhibition der katalytischen Aktivität von HTRA1 im RseA-Verdau zu erkennen.

Unter dem Gesichtspunkt der HTRA1-Inhibition waren vor allem die *Compounds* der Klassen A und B (Tab. 12 und Tab. 13) sehr interessant. Hier zeigten sich bei fast allen Vertretern gute Inhibitionswerte. Allerdings in den meisten Fällen nicht nur für HTRA1, sondern für die meisten der untersuchten Proteasen.

Tab. 16: HTRA1-Inhibitor Derivate der Klasse E (1,8-Dioxo-2,3,4,6,7,8-hexahydro-1H-pyrido(1,2-a)pyrazin-6-carbamoyl-9-carboxylate)

Name	Struktur	HtrA1	HtrA2	HtrA3	sonstige
LDC199818		-	-	-	o (DegS) - (DegP, Elastase, Chymotrypsin, Trypsin, Elastase)
LDC199819		-	-	-	o (DegS) - (DegP, Elastase, Chymotrypsin, Trypsin, Elastase)
LDC199820		-	-	-	o (DegS) - (DegP, Elastase, Chymotrypsin, Trypsin, Elastase)
LDC199821		-	-	-	o (DegS) - (DegP, Elastase, Chymotrypsin, Trypsin, Elastase)

Abgesehen von DegS wurden alle Messungen mit 1 μM Protease und 20 μM β -Casein durchgeführt, DegS wurde bei 5 μM Protease und 10 μM RseA gemessen. Einsatz Inhibitor: jeweils 50 μM

Compounds aus der Klasse F (N-Heteroaryl-(1H-imidazol-2-yl)(phenyl)methanamine) konnten wir leider in unseren orthogonalen Assays nicht testen, da uns keine Vertreter dieser Klasse zur Verfügung gestellt wurden.

Bemerkenswerte Ergebnisse erzielen auch die Vertreter der Klasse C. Die *Compounds* LDC198178 und LDC198179 zeigten ein gemischtes Muster in der Inhibition der untersuchten Proteasen (Tab. 14). Bei allen Untersuchungen zeigten sich in den jeweiligen Gelen allerdings Banden in höher-molekularen Bereichen, sodass davon auszugehen ist, dass neue Komplexe mit einem höheren Molekulargewicht entstanden sind. Für DegS zeigte sich außerdem eine Steigerung der katalytischen Aktivität beim Verdau von RseA (Abb. 36).

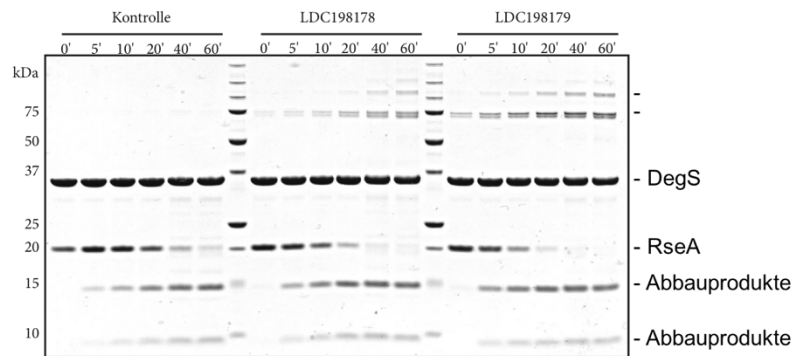


Abb. 36: Beispielhafte Darstellung RseA-Verdau durch DegS mit Klasse C Compounds. Verdau unter Standardbedingungen mit jeweils 50 μM der indizierten Compounds LDC198178 und LDC198179. Zu sehen sind die erwähnten Banden in höher-molekularen Bereichen (über 75 kDa).

Die intramolekularen Dreifachbindungen in den Molekülen LDC198178 und LDC198179 sind als sehr reaktiv zu beschreiben (persönliche Kommunikation, Gerd Rütter, LDC), daher können sie eventuell für unspezifische *crosslinks* zwischen einzelnen Proteinmolekülen sorgen. Diese Reaktivität kann aber auch zu einem sehr schnellen Verfall der Moleküle in einer wässrigen Umgebung führen. In jedem Fall aber stellen diese Moleküle unter medizinisch-chemischen Gesichtspunkten keine besonders interessanten Verbindungen dar, und so wurden in zwei weiteren Derivaten (LDC199760 und LDC200455) die Dreifachbindungen durch intramolekulare Benzolringe ersetzt und die Moleküle im RseA-Verdau durch DegS im Rahmen dieser Arbeit getestet. Bei diesen Tests (Abb. 37) zeigten sich keine Banden in den höher-molekularen Bereichen mehr, die Steigerung der katalytischen Aktivität von DegS im RseA-Verdau wird aber auch hier deutlich, vor Allem für LDC200455.

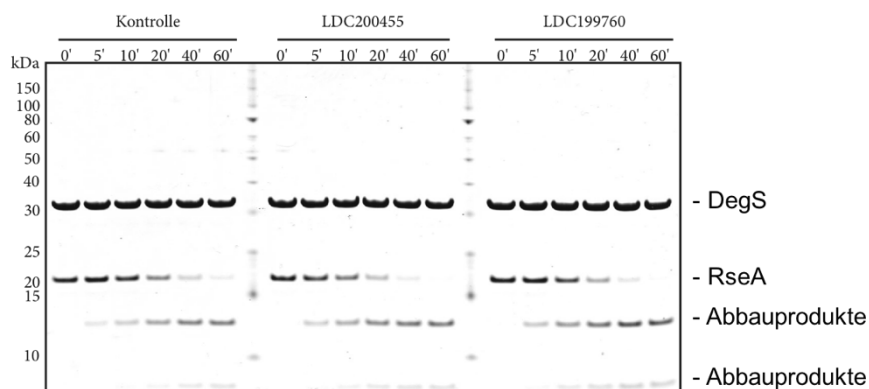


Abb. 37: DegS RseA-Verdau mit neuen Derivaten der Klasse C. Verdaureaktion unter Standardbedingungen, mit 50 μM der indizierten Compounds LDC199760 und LDC200455 oder als Kontrolle der volumemäßig gleichen Menge DMSO.

Der einzige untersuchte Compound aus Klasse B, LDC197757, inhibierte bei einer Konzentration von 50 μM HTRA1 und HTRA2 sehr gut, zeigte aber auch unspezifische

Inhibition von DegS und DegP, so wie eine sehr leichte Inhibition der für die Verdauung im menschlichen Magen wichtigen Serinprotease Trypsin.

Die *Compounds* der Klasse A zeigten gänzlich gute Werte für die Inhibition der HtrA-Proteasen, waren aber zumeist auch wenig spezifisch in Bezug auf die andere untersuchten Serinproteasen. So zeigte eigentlich nur LDC091675 (einer der parentalen *Compounds* dieser Klasse), gleichzeitig eine deutlich erkennbare Inhibition der HtrA-Proteasen und eine geringe Inhibition der Verdauungsproteasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase. Eine hohe Spezifität nur für HTRA1 oder eine der anderen humanen HTRA-Proteasen konnte nicht erreicht werden. Aufgrund der guten Ergebnisse der Inhibition von HTRA1 durch die untersuchten *Compounds* bei einer Konzentration von 50 μM wurden weitere Untersuchungen mit geringeren Konzentrationen der relevanten *Compounds* durchgeführt (Abb. 38). Dabei zeigt sich, dass auch mit stark sinkenden Konzentrationen der *Compounds* noch viele eine gute inhibitorische Wirkung gegenüber HTRA1 zeigen. So lässt sich für den *Compound* LDC198174 auch bei einer Konzentration von 1,25 μM noch eine Inhibition des β -Casein-Verdau durch HTRA1 nachweisen. LDC091675 und LDC198181 sind bei 2,5 μM noch aktiv und bei einer Konzentration von 5 μM lässt sich für fast alle untersuchten Verbindungen noch eine inhibitorische Wirkung feststellen. Lediglich LDC198175 zeigt keine und LDC197753 nur eine sehr leichte inhibitorische Wirkung.

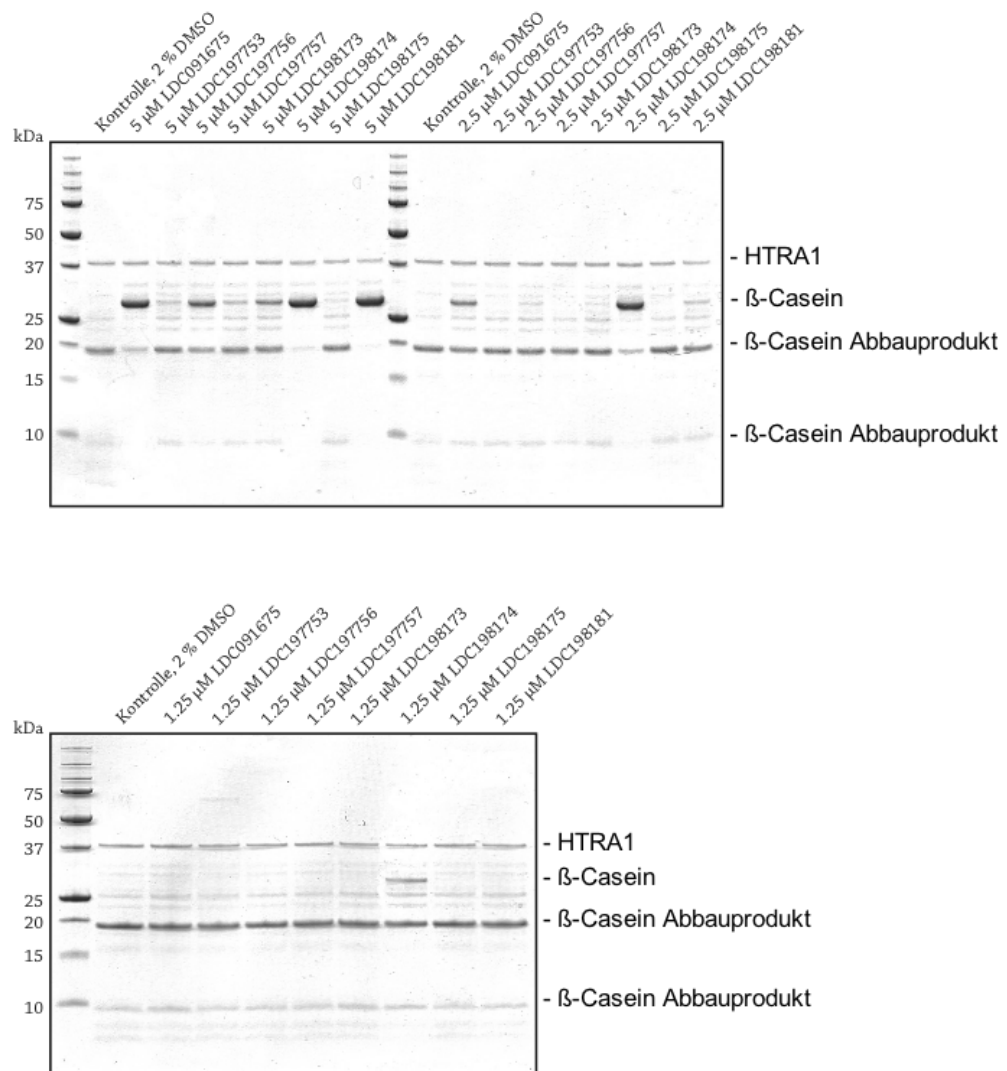


Abb. 38: β -Casein-Verdau durch HTRA1 mit sinkenden Konzentrationen der untersuchten *Compounds*. 20 μ M β -Casein wurden durch 1 μ M HTRA1 im Standardpuffer bei 37°C und 500 rpm verdaut. Dazu wurden sinkende Konzentrationen der relevanten *Compounds* gegeben und Proben wurden nach 10 min Inkubationszeit entnommen, aufgetragen und mit Coomassie gefärbt.

Weiterhin bemerkenswert waren die Versuche mit den vier *Compounds* der Klasse A, welche die höchsten Identifikationsnummern aufwiesen. Die *Compounds* LDC198919, LDC199317, LDC199318 und LDC199319 zeigten in den orthogonalen Assays zwar eine eher schwache Inhibition der humanen HTRA-Proteasen, aber sie waren in sofern interessant, dass sie auch nur eine geringe Inhibition der humanen Verdauungsproteasen zeigten und sehr gute Inhibitionswerte für DegS und DegP aufwiesen. Aus diesem Grund wurden diese *Compounds* in sinkenden Konzentrationen in weitere Verdauassays mit DegS eingesetzt. Während bei sinkenden Konzentrationen der *Compounds* bei DegP, HTRA1, HTRA2, Trypsin, Chymotrypsin und Elastase keine Inhibition mehr zu erkennen war (ohne Abbildung), ist beim RseA-Verdau durch DegS auch noch bei einer Konzentration von 5 μ M LDC198919 (exemplarisch) eine deutliche Inhibition zu erkennen (Abb. 39). Die anderen relevanten *Compounds* (LDC199317, LDC199318 und LDC199319)

zeigen sehr ähnliche inhibitorische Wirkungen bei den untersuchten sinkenden Konzentrationen.

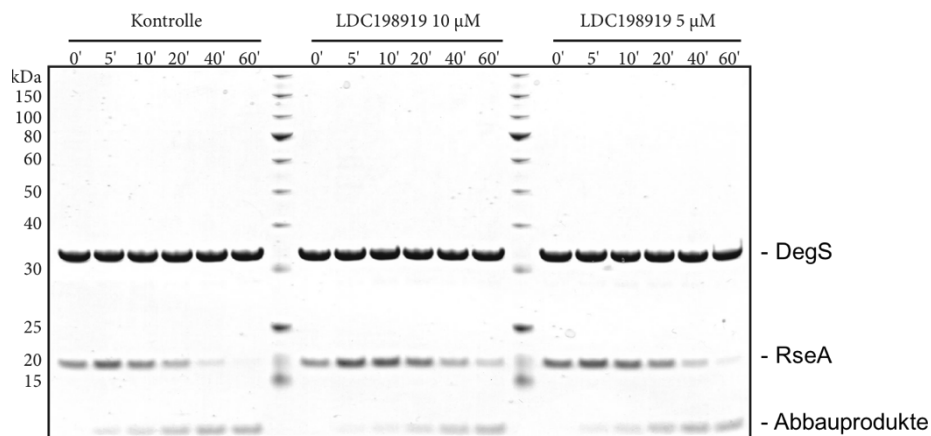


Abb. 39: RseA-Verdau durch DegS mit sinkenden LDC198919 Konzentrationen.

10 µM RseA wurden durch 5 µM DegS im Standardpuffer (mit 10 % Glycerin) verdaut. LDC198919 wurde in sinkenden Konzentrationen zugegeben, als Kontrolle diente die volumemäßig gleiche Menge DMSO.

Allerdings haben wohl alle *Compounds* der Klasse A ein gemeinsames Problem, sie weisen eine sehr geringe Stabilität in wässriger Umgebung auf (persönliche Kommunikation, LDC) und sind ohne weitere Modifikationen wohl nicht weiter relevant für die Entwicklung eines Wirkstoffes. Anstrengungen, diese instabile Stelle (vor allem die Bindung über den Stickstoff aus dem Fünfring heraus) scheiterten bisher daran, dass keines der synthetisierten Derivate noch eine inhibitorische Wirkung bei den Serinproteasen zeigte.

Weitere Untersuchungen sollten den Wirkmechanismus der *Compounds* aufklären.

Untersuchung der DegP-Inhibition im zellulären Assay

Vor allem bei einem *Compound* der Klasse A, LDC197756, fiel eine deutlich erkennbare Spezifität gegenüber der bakteriellen HTRA-Protease DegP auf. Um diese Inhibition auch in einem zellulären, physiologisch eher relevantem Assay zu überprüfen, wurde das durch Melisa Merdanovic etablierte zelluläre Tsr-PhoA Assay eingesetzt. In diesem Assay wird ein Fusionsgen aus dem membranverankerten Chemorezeptor Tsr und der bakteriellen alkalischen Phosphatase PhoA durch ein Plasmid in Bakterien des *E. coli* Stammes MM518 (*tolC*, LPS verkürzt) eingebracht und das Fusionsprotein exprimiert. Die Anwesenheit großer Mengen dieses Fusionsproteins ist toxisch für die Bakterien, was sich in deutlich verringertem Wachstum auswirken würde (Strauch & Beckwith 1988). Zelluläres DegP kann diese irreguläre Häufung des Fusionsproteins jedoch beheben, indem es durch seine proteolytische Funktionalität die Degradation des toxischen Inhaltes einleitet. Wird nun aber DegP von außen durch den Einsatz eines *small-molecule* Inhibitors in seiner Funktion gehemmt, sollte dieses wiederum in den Wachstumskurven der behandelten Bakterien ersichtlich sein.

In Abb. 40 sind die Wachstumskurven der beschriebenen Kulturen mit und ohne Inhibitor LDC197756 gezeigt. Es ist weder bei den mit dem Leervektor noch bei den mit *tsr-phoA*-Vektor transformierten Bakterienkulturen ein Wachstumsnachteil durch die Gabe von bis zu 200 μM LDC197756 zu erkennen. Alle Kulturen wachsen in etwa gleich gut, eine Gabe von höheren Konzentrationen des Inhibitors scheiterte an der schlechten Löslichkeit des *Compounds* in wässriger Umgebung.

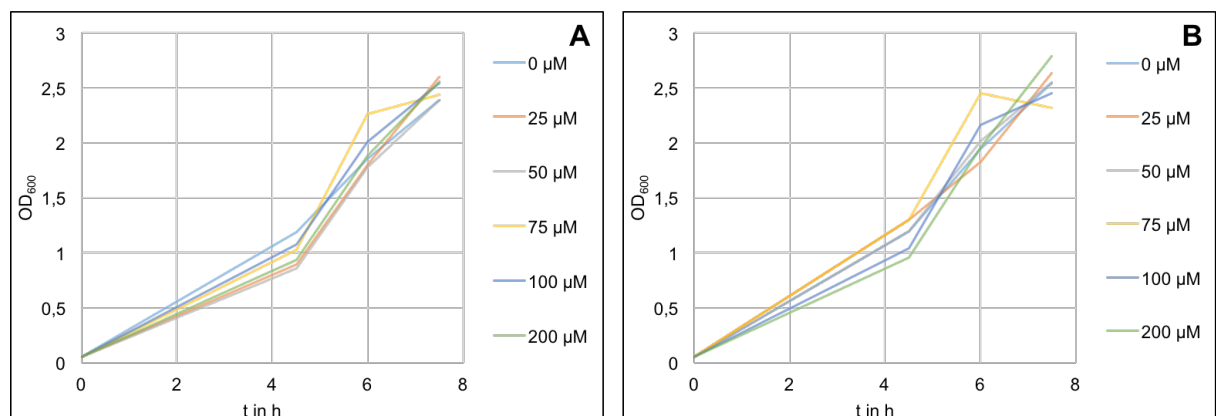


Abb. 40: Wachstumskurven DegP-Inhibitions-Assay mit LDC197756

Kulturen des Stammes MM518 (*tolC*, *galE*, *galK*) wurden mit einem leeren Kontrollvektor (A) oder einem Vektor mit *tsr-phoA* Fusionsgen transformiert (B), über Nacht selektioniert und dann als Hauptkultur in der Entwicklung der optischen Dichte beobachtet. Dabei wurde nur die basale Expression des Tsr-PhoA Fusionsprotein ohne weitere Induktion ausgenutzt. Die indizierten Konzentrationen des *Compounds* LDC197756 wurden nach 2h Inkubation hinzugegeben.

4.3.2 Massenspektrometrische Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Compounds der Klasse A

Um den Wirkmechanismus besser zu verstehen und daraus eventuell Schlüsse ziehen zu können, die bei der zielgerichteten Weiterentwicklung dieser *Compound*-Klasse helfen könnten, wurden Bindungsexperimente per Massenspektrometrie mit dieser *Compound*-Klasse durchgeführt. Es bestand die Vermutung, dass diese *Compounds* unter der eigenen Aufspaltung eine kovalente Bindung mit dem Serin der katalytischen Triade in HtrA-Proteasen eingehen (Markus Kaiser, Alexander Wolf (LDC), persönliche Kommunikation; außerdem (Sztanke et al. 2008; Tan et al. 2013; Adibekian et al. 2011)). Es bestand außerdem die Vermutung, dass dieses Bindungs-/Wirkungsprinzip für alle HtrA-Proteasen und *Compounds* dieser Klasse gleich ist.

Um die Bindung zu überprüfen, wurden 5 μM gereinigtes DegS (192 $\mu\text{g/ml}$) mit 50 μM LDC197756 (exemplarisch) in 150 mM NaH_2PO_4 (pH 8.3), 380 mM NaCl und 10 % Glycerin für 10 min bei 37°C und 500 rpm inkubiert, das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 100 μl . Als Kontrolle diente ein Ansatz, in den anstelle des *Compounds* 3 % DMSO eingesetzt wurden. Diese Ansätze wurden nach dem beschriebenen Prinzip weiterverarbeitet, also in tryptische Peptide verdaut, aufgereinigt und in einem kompatiblen Lösungsmittel aufgenommen. Die anschließende Analyse im Massenspektrometer (Orbitrap Elite, Thermo Scientific), mit Thermo Nanospray Flex Ionenquelle und vorgeschalteter Flüssigchromatographie Thermo Easy-nLC 1000 (Säulenmaterial: Reprosil-Pur 120 C18-AQ, Dr. Maisch GmbH) wurde maßgeblich durch Farnusch Kaschani (*Analytics Core Facility*, ZMB, Essen) und Mitarbeiter durchgeführt.

Für die Analyse der generierten Daten wurde der angenommene Reaktionsmechanismus in Zahlen ausgedrückt (Abb. 41), so wird davon ausgegangen, dass eine Masse von 135,0446 Da auf das entsprechende Peptid übertragen wurde. Der dazugehörige Reaktionsmechanismus ist in Abb. 41 ebenfalls zu erkennen.

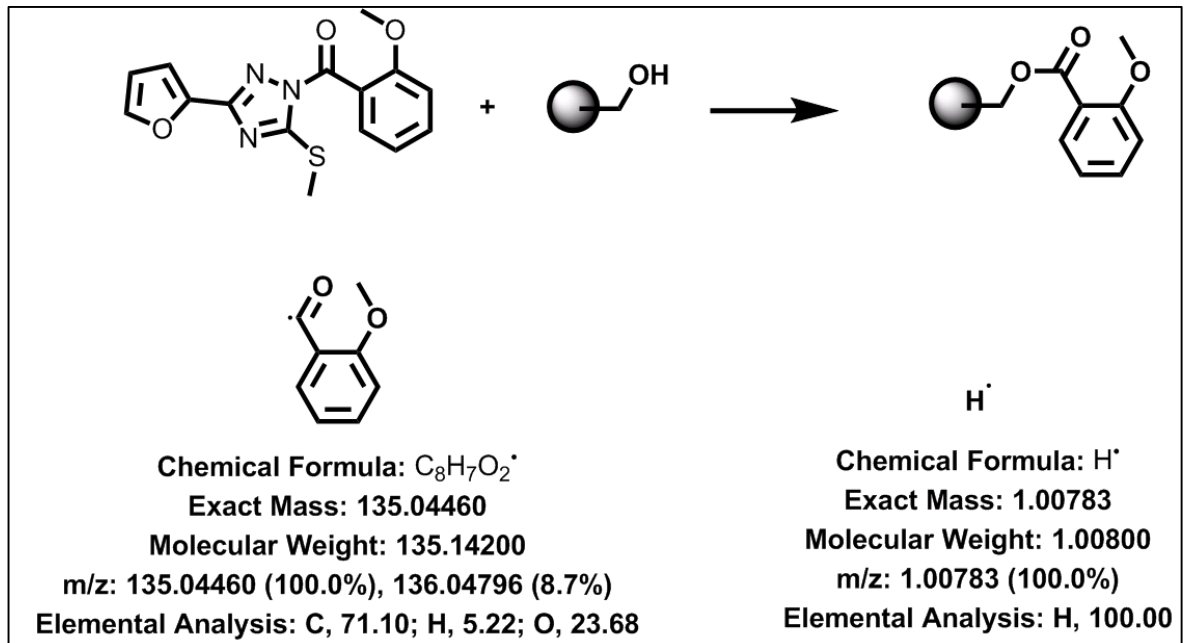
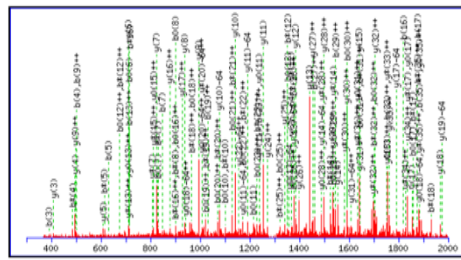


Abb. 41: Vorhergesagter Reaktionsmechanismus LDC197756 und *active-site* Serin S201

Das Molekül LDC197756 spaltet sich bei der Übertragung an das Protein unter dem angegebenen Reaktionsmechanismus auf und die unten angegebene Masse von 135,0446 Da wird auf das Peptid übertragen. Das Protein/Peptid wird hier als graue Kugel dargestellt. Abbildung: Farnusch Kaschani (ACE Essen).

Die entsprechende Modifikation von 134,0446 Da (ohne H) wurde in die Datenbank für Modifikationen eingetragen und als „LDC“ bezeichnet. Die Auftrennung und Identifikation der durch Trypsin verdauten Peptide verlief planmäßig und es wurden nur sehr geringe Kontaminationen (z.B. durch andere Proteine als DegS und Kreatin von menschlichen Haaren) gefunden (Daten nicht gezeigt). Bei der Suche nach modifizierten Peptiden wurden diese auch noch per MS/MS fragmentiert und dadurch sequenziert, so konnte der genaue Ort der Modifikation gefunden werden. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 42 zu sehen.

Aus den Ergebnissen in Abb. 42 lässt sich erkennen, dass die Modifikation „LDC“ mit einer Häufigkeit von 99,74 % an dem Serin mit Position 15 des gefundenen Peptides vorliegt. Dieses Serin entspricht, auf das vollständige Protein umgerechnet, dem *active-site* Serin S201.



Score	Mr(calc)	Delta	Sequence	Site Analysis
106.4	3911.8636	0.0040	QNFLQTDASINHGNSGGALVNSLGELMGINTLSFDK	LDC S15 99.74%
79.1	3911.8636	0.0040	QNFLQTDASINHGNSGGALVNSLGELMGINTLSFDK	LDC S9 0.19%
73.5	3911.8636	0.0040	QNFLQTDASINHGNSGGALVNSLGELMGINTLSFDK	LDC T6 0.05%
70.6	3911.8636	0.0040	QNFLQTDASINHGNSGGALVNSLGELMGINTLSFDK	LDC S22 0.03%
18.6	3911.8636	0.0040	QNFLQTDASINHGNSGGALVNSLGELMGINTLSFDK	LDC T31 0.00%
8.4	3911.8636	0.0040	QNFLQTDASINHGNSGGALVNSLGELMGINTLSFDK	LDC S33 0.00%
4.5	3911.8887	-0.0211	HLSQNFISAEELDTANLNVKAMQASVDAAQATLK	
3.9	3911.8887	-0.0211	HLSQNFISAEELDTANLNVKAMQASVDAAQATLK	
3.9	3911.8887	-0.0211	HLSQNFISAEELDTANLNVKAMQASVDAAQATLK	

↓ ↓ ↓

QNFLQTDASINHGNSGGALVNSLGELMGINTLSFDK

Masse (ber.)	Masse (exp.)	ppm	Score	Peptid + Modifikation
3911.8676	3911.8636	1,02	106	QNFLQTDASINHGNSGGALVNSLGELMGINTLSFDK + Oxidation (M) + LDC (S)
3895.8737	3895.8687	1,29	93	QNFLQTDASINHGNSGGALVNSLGELMGINTLSFDK + LDC (S)
3761.8383	3761.8319	1,70	86	QNFLQTDASINHGNSGGALVNSLGELMGINTLSFDK
3911.8642	3911.8636	0,16	43	QNFLQTDASINHGNSGGALVNSLGELMGINTLSFDK + Oxidation (M) + LDC (S)
3895.8713	3895.8687	0,67	27	QNFLQTDASINHGNSGGALVNSLGELMGINTLSFDK + Oxidation (M) + LDC (T)

Abb. 42: Analyse der modifizierten Peptide

Analyse der Peptide mit der zu untersuchenden Modifikation („LDC“) unter Einbeziehung der theoretischen und experimentellen Massen und der entsprechenden Bewertung.

4.4 Inhibition durch Aktivierung der Autoproteolyse/Aktivierung

4.4.1 Entdeckung und biochemische Assays

Bei den Spezifitätsuntersuchungen der *hits* aus dem HTRA1-Inhibitorscreen erweckten drei Verbindungen besondere Aufmerksamkeit, diese zeigte unerwartete Eigenschaften. Dazu gehörte die scheinbare Inhibition des β -Casein Verdau durch HTRA1, aber auch die scheinbare Beschleunigung des RseA-Verdau durch DegS.

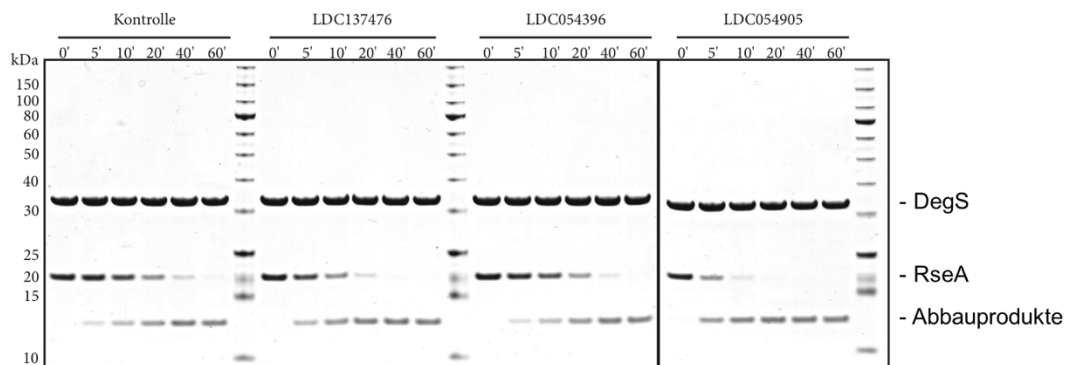


Abb. 43: RseA-Verdau durch DegS mit potentiellen Aktivormolekülen

Verdau von RseA durch DegS unter Standardbedingungen mit jeweils 50 μM des indizierten *Compounds*. Als Kontrolle diente eine volumenmäßig gleiche Menge an DMSO.

Daraufhin wurde zunächst die aktivierende Wirkung auf DegS genauer untersucht, und die drei potentielle Aktivormoleküle in den RseA-Verdau durch DegS eingesetzt (Abb. 43). Besonders prominent war die Wirkung von LDC054905 ([2-(3,5-dimethoxyphenyl)-4-oxoquinazolin-3-yl] 5-chloro-2-methoxybenzoate), die noch mehrmals bestätigt wurde (nicht abgebildet). Im Weiteren wurden die Untersuchungen auf dieses Molekül und seine Derivate konzentriert, da hier die Geschwindigkeit des RseA-Verdau durch DegS nach Zugabe von 50 μM des Moleküls etwa vervierfacht wurde, dieser Effekt war der stärkste beobachtete Effekt unter den untersuchten Molekülen.

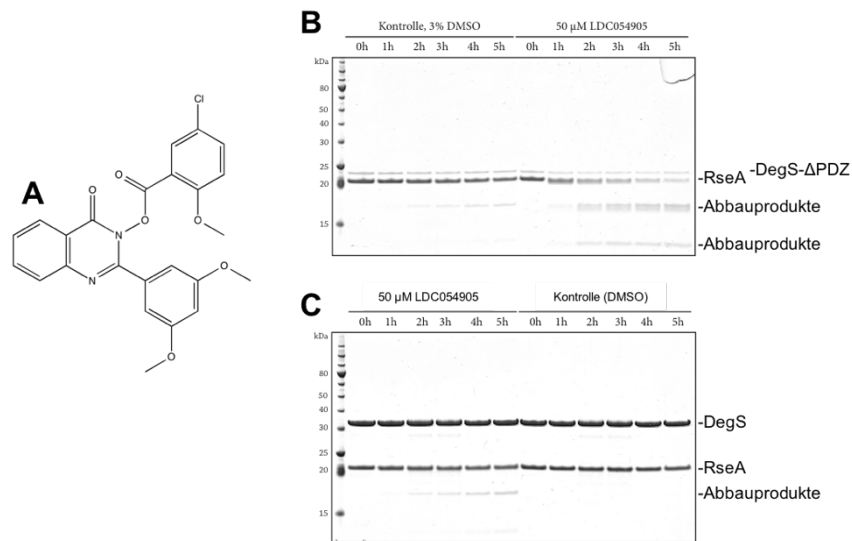


Abb. 44: Untersuchung der Eigenschaften von LDC054905

(A) Struktur von LDC054905, (B) RseA-Verdau durch DegS-ΔPDZ mit LDC054905 und Kontrolle mit DMSO, (C) RseA-Verdau durch DegS mit LDC054905 ohne Kontrolle mit DMSO, ohne FFF-Aktivatorpeptid.

Weitere Untersuchungen (Abb. 44) zeigten, dass für die deutliche Beschleunigung der katalytischen Aktivität von DegS die Aktivierung durch das Aktivatorpeptid FFF weiterhin nötig ist. Der entsprechende Versuch (Abb. 44 C) zeigt, dass bei fehlender Aktivierung von DegS das Molekül LDC054905 nur eine sehr geringe Anhebung der Basalaktivität von DegS bewirkt. Wird der *Compound* LDC054905 zu einem RseA-Verdau durch DegS-ΔPDZ gegeben, wird der proteolytische Verdau von RseA deutlich schneller vollzogen als in der entsprechenden Kontrolle mit DMSO.

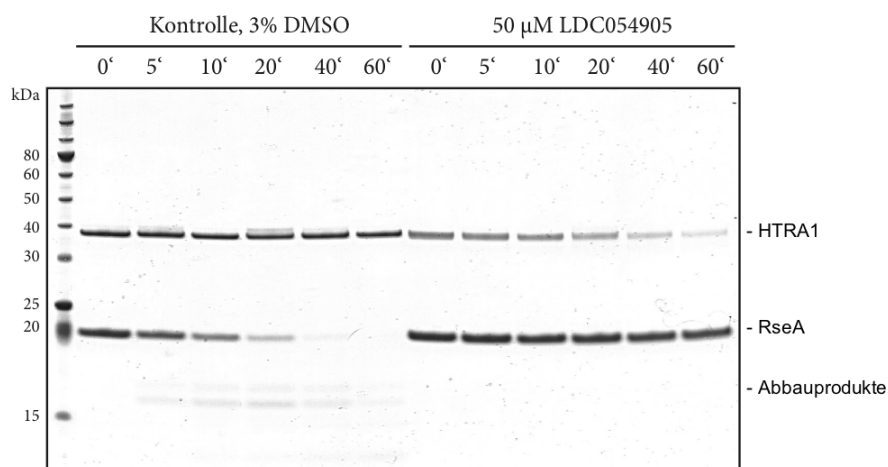


Abb. 45: RseA Verdau durch HTRA1 mit LDC054905

10 μM RseA wurden durch 1 μM HTRA1 in Standardpuffer (ohne Glycerin) bei 37°C und 500 rpm verdaut. Dazu wurden entweder 50 μM LDC054905 oder die volumemäßig gleiche Menge DMSO als Kontrolle gegeben.

Wenn nun der inhibitorischen Wirkung des *Compounds* auf HTRA1 betrachtet wird und einen Verdau von RseA in Anwesenheit des *Compounds* mit der entsprechenden Kontrolle vergleicht (Abb. 45), fällt auf, dass RseA tatsächlich über den gesamten Versuchszeitraum nicht verdaut wird. Es wird deutlich, dass die HTRA1-Bande mit der Zeit deutlich abnimmt. So scheint HTRA1 entweder verdaut zu werden oder in einen anderen, hier nicht abbildbaren, Zustand überzugehen.

Zur genaueren Charakterisierung der unterliegenden Mechanismen wurden die Komponenten der vorhergegangenen Verdaue einzeln mit dem *Compound* LDC054905 inkubiert und nach verschiedenen Zeiten Proben entnommen, diese aufgetrennt und im Gel gefärbt (Abb. 46). So zeigt sich, dass weder DegS, DegS- Δ PDZ (Abb. 46 A) noch RseA (Abb. 46 B) eine Instabilität aufgrund von LDC054905 entwickeln, das schnellere Verschwinden von RseA an der entsprechenden Stelle im Gel im entsprechenden Versuch muss also tatsächlich auf die höhere katalytische Aktivität von DegS zurückgeführt werden. Bei der Betrachtung der HTRA1-Inkubation mit LDC054905 bestätigt sich das, was auch vorher zu sehen war. In Anwesenheit von LDC054905 nimmt die Intensität der HTRA1-Bande im Gel mit der Zeit deutlich ab (Abb. 46 C), nach 5h ist sie fast komplett verschwunden. Neben der geringer werdenden Bande sind allerdings keine anderen Banden, etwa von Abbauprodukten oder Aggregaten im höher-molekularen Bereich, zu erkennen. Zur weiteren Untersuchung wurden dann kommerziell erhältliche Derivate des *Compounds* LDC054905 zugekauft und auf ihre Wirkung auf DegS und HTRA1 hin untersucht (Tab. 17).

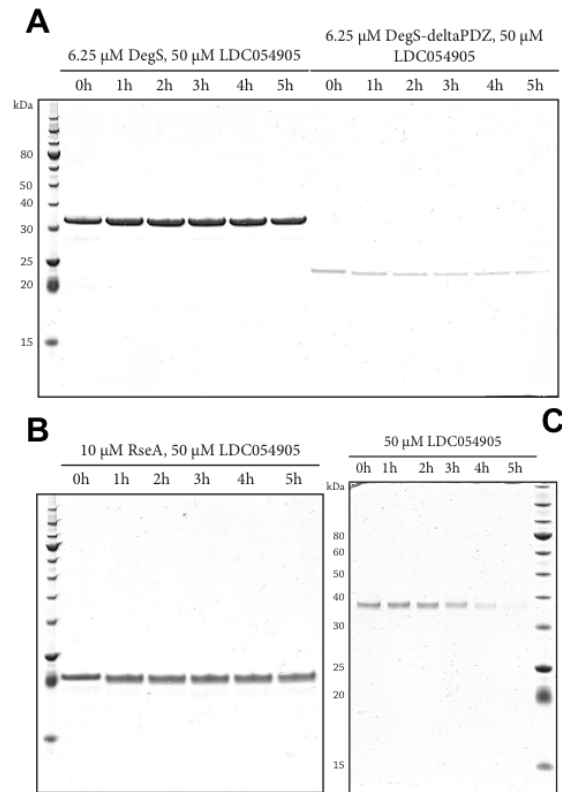


Abb. 46: Inkubation einzelner Proteine mit 50 μ M des *Compounds* LDC054905

Die Komponenten aus voran gegangenen Verdauassays wurden einzeln mit 50 μ M des *Compounds* LDC054905 inkubiert (37°C, 500 rpm) und zu den indizierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Diese wurden im Gel aufgetrennt und gefärbt. (A) zeigt die Inkubation von DegS und DegS- Δ PDZ mit LDC054905, (B) Inkubation von RseA mit LDC054905 und (C) Inkubation von HTRA1 mit LDC054905.

Bei der Untersuchung der zugekauften Derivate von LDC054905 wurde klar, dass auch diese Verbindungen (mit Ausnahme von ChemDiv #3470-5592) den RseA-Verdau durch DegS aktivierten. Es wird außerdem deutlich, dass sowohl die Substituenten des „oberen“ als auch des „unteren“ Benzolrings am Grundgerüst Bedeutung für die Aktivität des *Compounds* haben. So weisen zum Beispiel die Änderungen am „oberen“ Ring (ChemDiv #3129-4865) gegenüber LDC054905, als auch Änderungen am „unteren“ Ring (ChemDiv #3470-5614) deutliche Veränderungen in ihrer Aktivität auf den RseA-Verdau durch DegS auf. Die Veränderung der Position einer Methoxy-Gruppe (ChemDiv #3470-5592) bewirkt den totalen Verlust der Wirksamkeit des *Compounds*.

Bei der Untersuchung der einzelnen *Compounds* im Zusammenhang mit der HTRA1-Aktivität wurde festgestellt, dass alle *Compounds* auch den RseA-Verdau durch HTRA1 über eine Autoproteolyse des Enzyms in unterschiedlich starker Art hemmen (ohne Abbildung, Tab. 17). Einzige Ausnahme dabei ist der *Compound* ChemDiv #3470-5592, für diesen ist zwar eine starke Inhibition des RseA-Verdau erkennbar, jedoch keinerlei Autoproteolyse. Bei der folgenden Untersuchung wurde festgestellt, dass dieses Molekül den RseA-Verdau durch HTRA1 schon ab einer Konzentration von 10 μ M deutlich und ab 15 μ M vollständig hemmt (Abb. 47).

Tab. 17: Kommerziell erhältliche Derivate von LDC054905 und ihre Wirkung

Name	Struktur	DegS Aktivierung	HtrA1 „Inhibition“	Sonstiges*
ChemDiv #3091-4826		ab 5 μ M	++ Autoproteolyse	keine Wirkung auf Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und DegP bis 50 μ M
ChemDiv #3129-4865		ab 50 μ M	+ Autoproteolyse	keine Wirkung auf Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und DegP bis 50 μ M
ChemDiv #3129-4970		ab 5 μ M	++ Autoproteolyse	keine Wirkung auf Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und DegP bis 50 μ M
ChemDiv #3129-5009 LDC054905		ab 5 μ M	+++ Autoproteolyse	keine Wirkung auf Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und DegP bis 50 μ M
ChemDiv #3470-5592		kein	+++ (ab 10 μ M)	keine Wirkung auf Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und DegP bis 50 μ M
ChemDiv #3470-5614		ab 5 μ M	+++ Autoproteolyse	keine Wirkung auf Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und DegP bis 50 μ M

Die Hemmung von DegS bezieht sich auf Verdaureaktionen mit FFF als Aktivatorpeptid. Inhibition von HTRA1 für Verdaureaktionen mit 50 μ M *Compound* (außer anders angegeben). Wenn Autoproteolyse vorhanden, ist dies außerdem angegeben. *Ein beispielhafter Verdau mit anderen Enzymen ist im Anhang zu finden. (+++) steht für volle Inhibition des RseA-Verdau, (++) für eine leichte Reduktion, (+) deutliche Reduktion

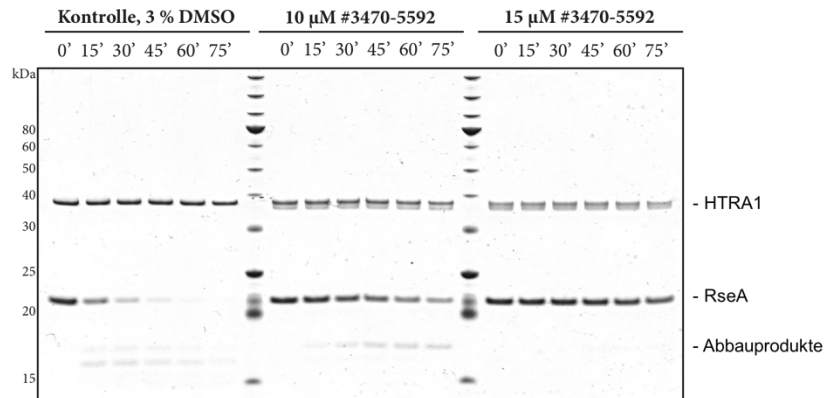


Abb. 47: RseA-Verdau durch HTRA1 mit *Compound* ChemDiv #3470-5592

10 µM RseA wurden durch 1 µM HTRA1 verdaut. Zugabe von 10 oder 15 µM des *Compounds* ChemDiv #3470-5592 oder der volumenmäßig gleichen Menge DMSO als Kontrolle.

Für weitergehende Untersuchungen sollten die Wirkungen der *Compounds* auf DegS getestet werden, wenn bereits eine Aktivierung des Enzyms durch ein Aktivatorpeptid vorlag, zu welchem die Struktur in Verbindung mit seiner strukturellen Wirkung auf DegS bereits bekannt war (PDB-Einträge 1SOT mit DNRLGLVYQF und 1SOZ mit DNRLGLVYWF) (Hasselblatt et al. 2007; Wilken et al. 2004). Bei der Untersuchung der kommerziell erworbenen Peptide (Intavis AG, Köln) bezüglich ihrer Wirkung auf die DegS-Aktivität hin, wurde festgestellt, dass sehr unterschiedliche Konzentrationen des Peptides nötig waren um die gleiche katalytische Aktivität von DegS zu erreichen wie in den bisherigen Versuchen mit dem FFF-Aktivatorpeptid. Diese Unterschiede (ohne Abbildung) sind durch die verschiedenen Dissoziationskonstanten (K_D) der Peptide an DegS zu erklären, diese wurden bereits vorher publiziert und liegen bei etwa 3 µM für DNRLGLVYWF und 53 µM für DNRLGLVYQF (Hasselblatt et al. 2007). So liegen auch die benötigten Konzentrationen bei 50 µM für DNRLGLVYQF und bei lediglich 10 µM für DNRLGLVYWF.

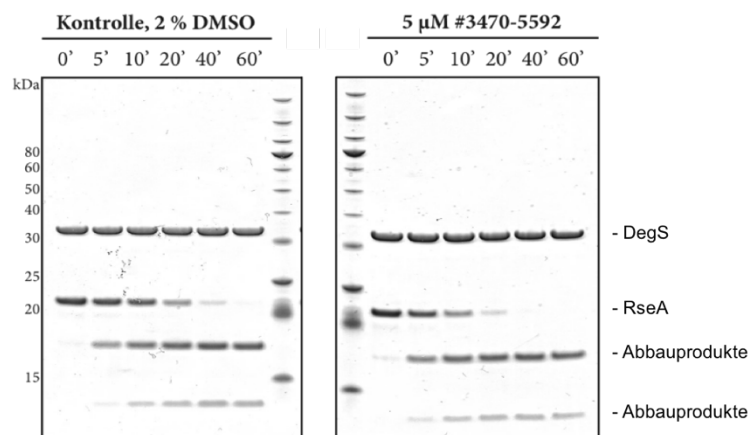


Abb. 48: RseA-Verdau durch DegS mit Aktivator-*Compound* ChemDiv #3470-5592

Verdau von 10 µM RseA durch 5 µM DegS in Anwesenheit von 5 µM Aktivator-*Compound* ChemDiv #3470-5592. Als Kontrolle diente der Einsatz einer volumenmäßig gleichen Menge DMSO. Dieses Experiment wurde mit 50 µM des Aktivator-*Compounds* DNRLGLVYQF durchgeführt.

Der daraufhin durchgeführte Test auf DegS-Aktivität im Zusammenhang mit diesen Aktivatorpeptiden und den aktivierenden *Compounds* zeigte ein eher diffuses Bild. Besonders fiel auf, dass im Zusammenhang mit einem anderen Aktivatorpeptid auch der *Compound* ChemDiv #3470-5592 eine deutliche Erhöhung der katalytischen Aktivität von DegS bewirkte (Abb. 48).

Aufgrund dieser Unterschiede in der Wirkung der *Compounds*, welche von den unterschiedlichen Aktivatorpeptiden herzurühren scheinen, wurden alle Kombinationen von Aktivatorpeptiden und Aktivator-*Compounds* mit DegS in RseA-Verdau-Assays getestet. Diese Verdaudaten (nicht gezeigt) wurden dann mit Hilfe der Software ImageJ quantifiziert. Dazu wurden die abnehmenden Bandenintensitäten von RseA mittels ImageJ bestimmt und dann durch einen internen Algorithmus in der Software GraphPad Prism 5 die Halbwertzeiten von RseA für die jeweiligen Versuche bestimmt. Aus den Halbwertzeiten konnten die Aktivierungen gegenüber dem Kontrollverdau mit dem jeweiligen Aktivatorpeptid relativ bestimmt werden. Diese Werte sind in Tab. 18 angegeben. Alle *Compounds* wurden bei einer Konzentration von 5 μM eingesetzt (anders als bei den meisten Gelen).

Tab. 18: Aktivierung von DegS im Zusammenhang von Aktivatorpeptid und Aktivator-*Compound*

	Kontrolle	#3129-5009	#3091-4826	#3470-5592	#3470-5614	#3129-4865	#3129-4970
FFF	1,00	1,35	2,02	1,86	2,13	1,09	1,20
IVALGLVYQF (25 μM)	1,00	2,78	2,23	4,59	3,63	1,61	2,18
GAERQVVATATFRF	1,00	2,17	2,92	1,91	4,24	2,14	1,13
ITTAGLKYTF	1,00	1,00	2,25	5,75	7,31	1,76	2,00
VFMFSAGYRF	1,00	1,33	1,42	2,91	3,23	1,15	1,86
DNRLGLVYQF	1,00	1,40	2,16	2,24	2,06	1,72	2,29
DNRLGLVYWF (5 μM)	1,00	0,00	1,78	1,78	3,45	1,50	1,68

Aktivierungen wurden aus Verdauassays in Gelen mit ImageJ quantifiziert und mit GraphPad Prism über Halbwertzeiten von RseA bestimmt. Farbliche Kodierung von schwächster (rot) bis stärkster (grün) Aktivierung. Konzentration der Aktivatorpeptide: 50 μM (oder anders angegeben).

Es wird klar, dass bei bestimmten Kombinationen aus Aktivatorpeptid und Aktivator-*Compound* Aktivierungen bis zur Versiebenfachung der Grundaktivität erreicht werden können. Wird allerdings nur das Aktivatorpeptid austauscht, kann die Aktivitätssteigerung wieder auf „nur“ den doppelten Wert absinken. Insgesamt lässt sich eine Bevorzugung gewisser Aktivator-*Compounds* (ChemDiv #3470-5592 und #3470-5614) feststellen, nicht aber die Bevorzugung gewisser Aktivatorpeptide. Von einem Vorzug der Substituenten Chlor- und Methoxygruppe am „oberen“ Ring kann allerdings auch nicht ausgegangen werden, da z.B. der Ausgangs-*Compound* LDC054905 auch diese Substitution aufweist, aber zu den schwächsten Aktivatoren zählen muss.

4.4.2 Massenspektrometrische Untersuchung der Aktivator-Compounds

Um den Mechanismus zu verstehen, der der Aktivierung von DegS (und ebenso von HTRA1) unterliegt, sollten die *Compounds* genauer untersucht werden. Zunächst wurde dazu die Stabilität und die Reinheit der *Compounds* per Flüssigchromatographie mit nachgeschalteter Massenspektrometrie (LC-MS) überprüft. Dazu wurden die *Compounds* in einer Konzentration von 25 μM in einem Gemisch aus Wasser (hoch rein) und Acetonitril (Verhältnis 1:1) gelöst und dann in LC-MS-Läufen untersucht.

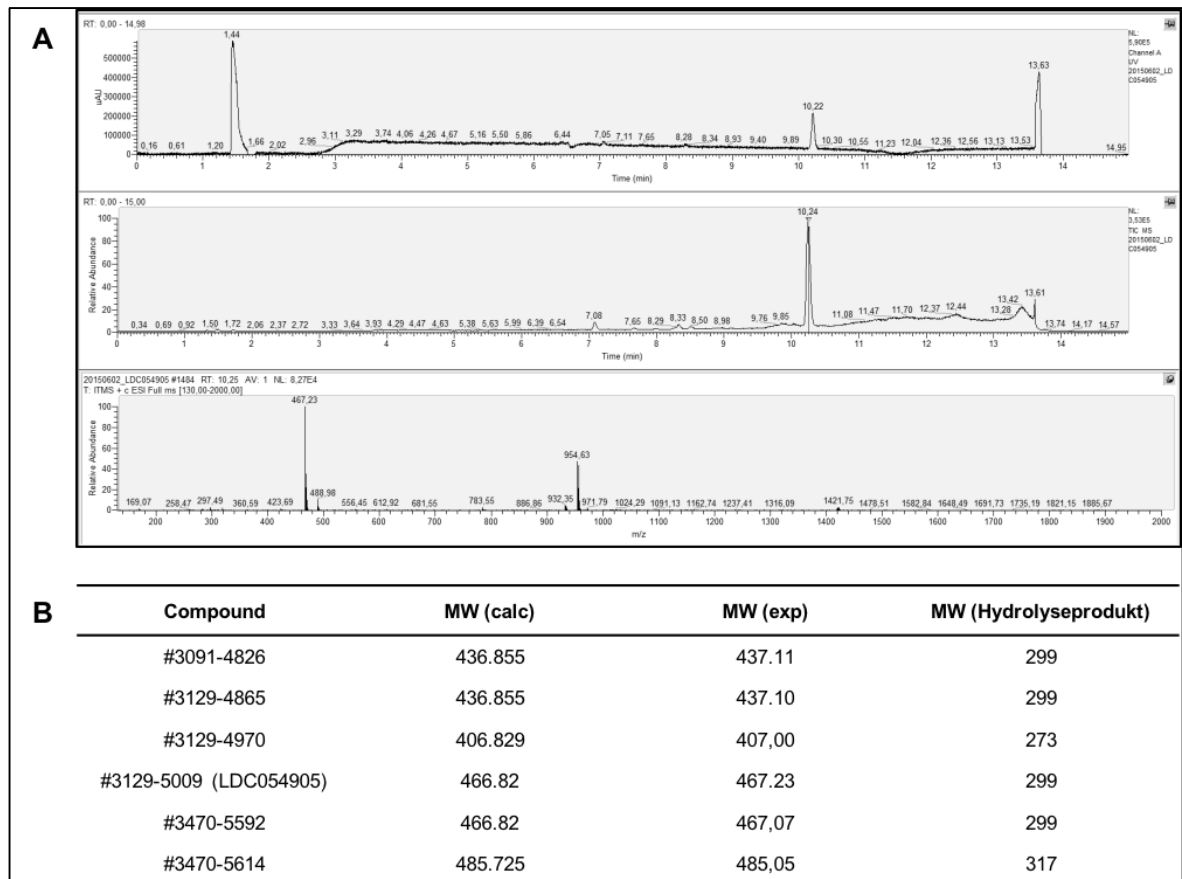


Abb. 49: Beispielhafte Untersuchung von LDC054905 per LC-MS

25 μM LDC054905 in Acetonitril:Wasser (1:1) wurden per LC-MS untersucht. (A) Absolute UV-Absorption nach Retentionszeit (oben), relative Häufigkeit nach Retentionszeit (Mitte) und relative Häufigkeit der Massen nach m/z (unten) mit Beschriftung der prominentesten Peaks. (B) zeigt eine Auflistung der erwarteten und gemessenen Massen aller untersuchter Moleküle sowie derer Hydrolyseprodukte.

Abb. 49 (A) zeigt ein beispielhaftes Ergebnis des LC-MS-Laufs zu LDC054905. In der relativen Intensität der UV-Absorption und der daraus berechneten Häufigkeit der zur jeweiligen Retentionszeit durchfließenden Moleküle ist ein einziger scharfer Peak bei einer Retentionszeit von 10,24 min zu erkennen. In dem aus diesem Peak resultierenden MS-Spektrum sind zwei sehr prominente Peaks zu erkennen (m/z 467,23 und 954,63), außerdem noch zwei scharfe aber deutlich kleinere Peaks (m/z 488,98 und 932,35). Dabei entspricht der Peak bei 467,23 (m/z) wohl der theoretischen Masse von 466,09 Da und der

Peak bei 932,35 (m/z) der doppelt ionisierten Masse von 932,18. Der Peak bei 488,98 (m/z) ist der einzelnen Masse plus einem Natrium-Atom ($466,09 + 22,98 = 489,07$ Da) zuzuordnen. Der Peak bei 954,63 (m/z) entspricht in etwa der erwarteten Masse des doppelt ionisierten LDC054905 plus eines Natriums ($(466,09 \times 2) + 22,98 = 955,16$). So konnten auch bei den anderen Molekülen dieser Klasse alle theoretischen Massen in sehr guter Reinheit (ohne Abbildung) identifiziert werden. Die Ergebnisse dazu sind ebenfalls in Abb. 49 (B) zu erkennen.

Bei weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Moleküle nach einer Lagerung von 24 h in wässriger Lösung nicht mehr vollends nachweisbar waren. Die theoretischen absoluten Massen der Moleküle waren per LC-MS nicht mehr nachweisbar, dafür einige wenige andere Massen. Nach Betrachtung des Moleküls wurde durch Markus Kaiser (persönliche Kommunikation) ein Reaktionsmechanismus postuliert (Abb. 50), der eine Autohydrolyse des Moleküls in wässriger Lösung vorsieht. In jeder der untersuchten Reaktionen war das postulierte größere Fragment der Autohydrolyse per LC-MS nachweisbar (Abb. 49 B). Das kleinere Fragment (186,01 Da) war nicht nachweisbar.

Aus diesen Daten geht aber bisher nicht hervor, ob nur das gesamte Molekül (466,09 Da) mit DegS und HTRA1 reagieren und so zu den bekannten Auswirkungen führen kann, oder ob eines (oder beide) der Hydrolyse-Fragmente für die Wirkung verantwortlich ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein beispielhaftes Molekül LDC054905 in der entsprechenden Konzentration in Puffer gelöst und für 24h bei RT inkubiert, sodass nach der Inkubation die gleichen Fragmente wie in den LC-MS-Läufen vorhanden sein sollten. Diese inkubierte Lösung wurde dann so in einen RseA-Verdau durch DegS eingesetzt, dass eine zurückgerechnete Endkonzentration von 50 μ M LDC054905 erreicht wurde.

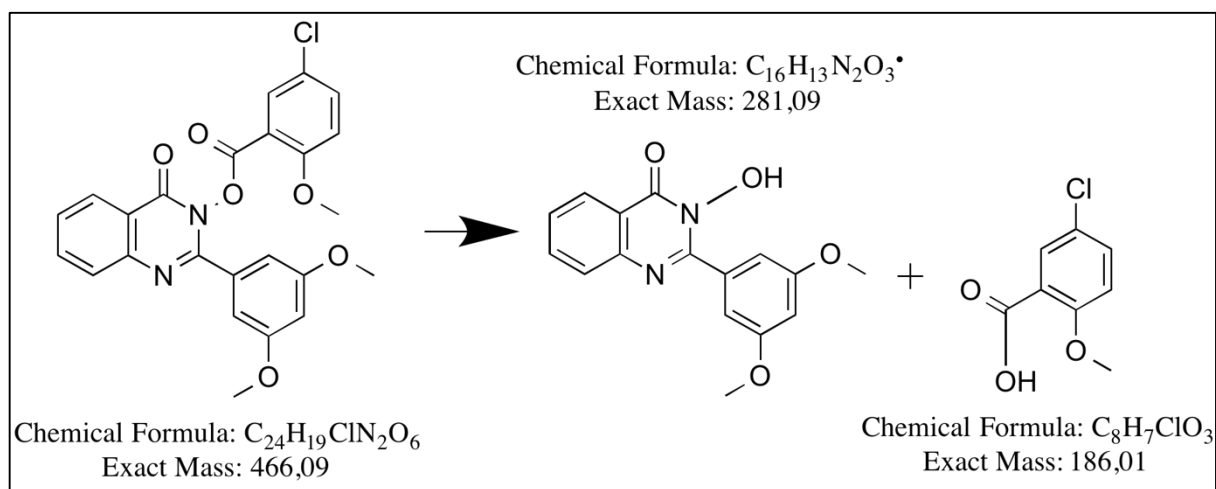


Abb. 50: Theoretische Reaktion: LDC054905, Autohydrolyse in wässriger Lösung

In der Abbildung ist die theoretische Hydrolyse des Compounds LDC054905 in wässriger Lösung in zwei Fragmente mit einer Größe von 281,09 Da und 186,01 Da beschrieben.

Wie in Abb. 51 zu erkennen ist, hatte das Einsetzen der Hydrolyseprodukte in den RseA-Verdau durch DegS keinerlei Einfluss auf die katalytische Aktivität von DegS. Falls weiterhin eine Verstärkung der katalytischen Aktivität von DegS zu beobachten gewesen wäre, hätte das auf die Aktivität des größeren Hydrolyse-Fragmentes zurückgeführt werden können. Da dies jedoch nicht der Fall ist, muss die weitergehende Arbeitshypothese lauten, dass die entscheidende Wirkung durch das kleinere Fragment der Hydrolyse (186,01 Da) erwirkt wird. Und so sollte mittels weitergehender Massenspektrometrie in einem größeren Gerät (OrbiTrap Elite, Thermo Scientific) nach Modifikationen der untersuchten Enzyme um die Masse des kleineren Fragmentes gesucht werden.

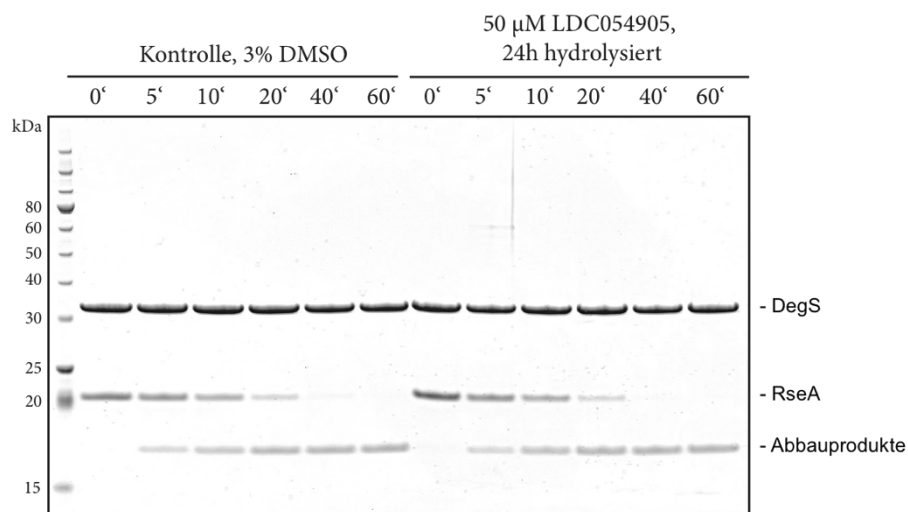


Abb. 51: RseA-Verdau durch DegS mit hydrolysiertem LDC054905 (24h)

Der *Compound* LDC054905 wurde für 24h in Standardpuffer inkubiert und dann in einer Endkonzentration von 50 µM in einen Verdau von 10 µM RseA durch 5 µM DegS mit 50 µM FFF eingesetzt. Die Kontrolle erfolgte mit der volumenmäßig gleichen Menge DMSO (ebenfalls mit Vorinkubation).

Massenspektrometrische Untersuchung der Modifikationen an DegS und HTRA1 durch ChemDiv #3470-5614

Um die oben erwähnte (postulierte) Modifikation durch das kleinere Hydrolyse-Fragment (186,01 Da) an den Proteinen DegS und HTRA1 zu untersuchen, wurden weitergehende Experimente per Massenspektrometrie angesetzt. Anders als bei der Ester-Hydrolyse in wässriger Lösung würde hier theoretisch nur ein Fragment von 169,0056 Da übertragen (siehe Abb. 52). Nach dieser Modifikation sollte per Massenspektrometrie gesucht werden.

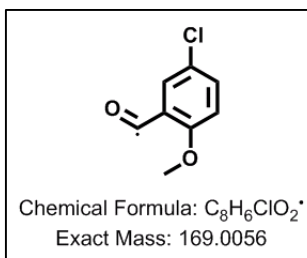


Abb. 52: Modifikation durch ChemDiv #3470-5614

Das Hydrolyseprodukt der Reaktion mit dem Protein unterscheidet sich von dem Produkt der Ester-Hydrolyse in wässriger Lösung. Es wird ein theoretisches Fragment von 169,0056 Da übertragen. Abbildung: Farnusch Kaschani (ACE, Essen).

Dazu wurden jeweils 5 µM der Proteasen DegS und HTRA1-S328A (katalytisch inaktiv), entsprechend jeweils 0,192 µg/µl, in 150 mM NaH₂PO₄ (pH 8.3) und 380 mM NaCl mit 100 µM des *Compounds* ChemDiv #3470-5614 gemischt, bei DegS wurden noch 50 µM FFF hinzugefügt. Das Endvolumen jedes Ansatzes betrug 100 µl. Außerdem wurden zu jedem Enzym Kontrollen mit der volumenmäßig gleichen Menge DMSO angesetzt. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C und 500 rpm inkubiert und die Proteine dann mit der Zugabe des vierfachen Volumens (400 µl) an Methanol (100 %) präzipitiert. Bis zur Übergabe an Farnusch Kaschani (ACE, ZMB Universität Duisburg-Essen) wurden die Ansätze bei -20°C gelagert, nach der Übergabe wurden die Proben durch Herrn Kaschani und seine Mitarbeiter wie oben beschrieben (Abschnitt 3.3.4) weiterverarbeitet und analysiert. Die Analyse fand in einem Ionenspray-Massenspektrometer (OrbiTrap Elite, Thermo Scientific) mit vorgeschalteter Flüssigkeitschromatographie (Thermo Easy-nLC 1000, Säulenmaterial: Reprosil-Pur 120 C18-AQ, Dr. Maisch GmbH, Säulenlänge: 25 cm) statt. Die Ergebnisse der Experimente (als Rohdaten) wurden mittels der Software MASCOT (Matrix Science, (Perkins et al. 1999)) und Andromeda (Max-Planck Gesellschaft; (Cox et al. 2011)) analysiert. Beide Ergebnisse wurden dann zusammengefügt und diejenigen Modifikationen manuell herausgesucht, die mit beiden Suchalgorithmen gefunden wurden und auch den sonstigen Qualitätsmerkmalen des ACE (Analytics Core Facility, ZMB, Essen) entsprachen. Die Ergebnisse sind in Abb. 53 (folgende Gesamtseite) dargestellt.

A		B					
Peptid	Position d. Mod.	Position (Gesamtprot.)	Score (MASCOT/Andromeda)	Peptid	Position d. Mod.	Position (Gesamtprot.)	Score (MASCOT/Andromeda)
GLNTNSHNQLER	S6	S70	65,14 / 54,09	HKYNFADVVEK	K2	K168	73,15 / 102,52
GYIITNKHVINDADQIIVALQDGR	K7	K95	26,23 / 192,63	HKYNFADVVEK K IAPAVVHIELFR	K12	K178	40,04 / 80,102
SNDGETPEGIGFAIPFOLAT K IMDKLIR	K21	K243	34,11 / -	KLPFSKR	K6	K196	34,85 / 57,047
IMDKLIRDGR	K4	K247	26,87 / 107,9	V K VELKNGATYEAK	K2 / K6	K229 / K233	38,02 / 123,76
IMDKLIR	K4	K247	47,22 / -	V K VELKNGATYEAK	K6	K233	65,14 / 134,14
				I KDVDE K AD I AL I K	K2 / K7	K243 / K248	24,18 / 118,2
				IDHQG K LPVLLGR	K6	K261	58,46 / 185,32
				GG K ELGLR	K3	K305	49,08 / 126,07
				K FLTESHDR	K1	K362	36,62 / 154,84
				FLTESHDR OAK K G K	K11	K373	- / 48,568
				K KYIGIR	K1	K380	25,88 / 68,915
				MMLTSS KAK	K8	K394	53,25 / 213,25

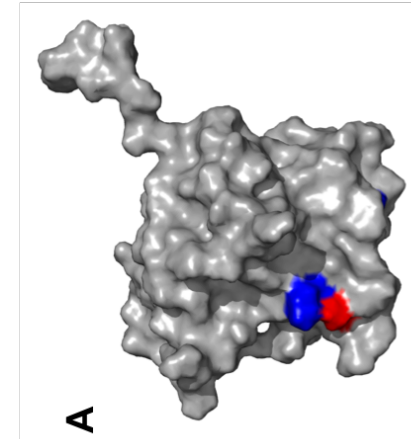
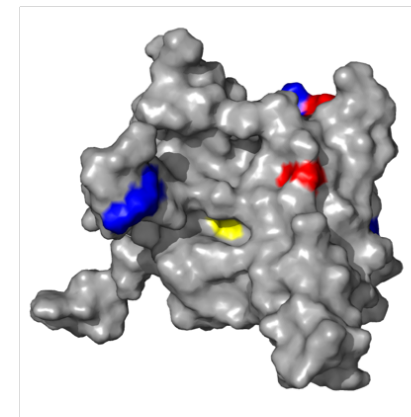
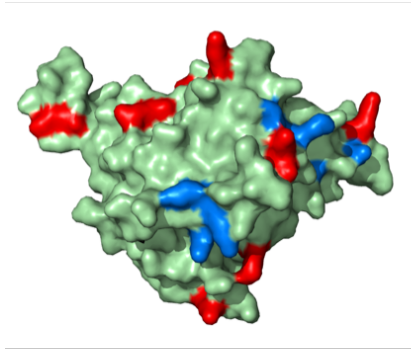
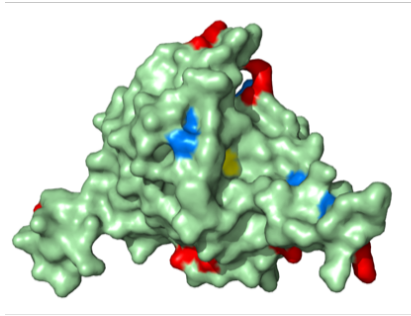


Abb. 53 (vorherige Seite): Durch ChemDiv #3470-5614 modifizierte Peptide in DegS und HTRA1

Die durch ChemDiv #3470-5614 modifizierten Peptide in DegS (A) und HTRA1 (B) sind in Tabellenform dargestellt, die modifizierten Positionen sind in rot eingefärbt, außerdem sind die Positionen innerhalb des tryptischen Peptides und innerhalb des Gesamtproteins angegeben. Die angegebene Score-Werte wurden durch die internen Algorithmen von MASCOT und Andromeda berechnet. Außerdem sind die Strukturen von DegS (PDB-Eintrag: 3LGI) und HTRA1 (PDB-Eintrag: 3NZI) mit den modifizierten Lysinen (rot), den nicht modifizierten Lysinen (blau) und dem *active-site* Serin (gelb) abgebildet.

Auffällig ist, dass im Falle von HTRA1 deutlich mehr Positionen modifiziert wurden als im Falle von DegS. Wenn man die Art der modifizierten Positionen betrachtet, welche zu einem Großteil Lysine sind, und dann mit dem Gesamtlysingehalt der Proteine (8 Lysine in DegS, 27 in HTRA1) in Zusammenhang bringt wird deutlich, dass dieses ganz einfach mit dem Lysingehalt des jeweiligen Proteins zusammenhängen könnte. Bei der einzigen modifizierten Position, die kein Lysin ist, handelt es sich um das Serin an Position 70 bei DegS. Außerdem sind die Lysine 95, 243 und 247 modifiziert, die Modifikation an K247 wird in zwei unterschiedlich langen Fragmenten gefunden. Im Falle von HTRA1 sind 13 Positionen modifiziert, dabei ist K233 in zwei verschiedenen tryptischen Fragmenten modifiziert.

In Abb. 53 (A) sind außerdem die Modifikationen an DegS in der Struktur (PDB-Eintrag: 3LGI) dargestellt, modifizierte Lysine sind in rot dargestellt, nicht modifizierte Lysine in blau. Das gleiche gilt für HTRA1 (PDB-Eintrag: 3NZI) in Abb. 53 (B), das *active-site* Serin ist jeweils in gelb angefärbt. Es fällt auf, dass auf der Seite von HTRA1, die auch die Öffnung zum aktiven Zentrum zulässt, keine Modifikationen stattgefunden haben. Alle identifizierten Modifikationen sind auf der anderen, dem aktiven Zentrum abgewandten, Seite lokalisiert. Für die Positionen S70, K95 und K247 in DegS sind in der Literatur keine Angaben über Funktion und eventuelle Mutationen zu finden. Bei Positionen K243 ist allerdings eine Funktion bekannt. So wurde beschrieben, dass K243 eine Interaktion mit E324 eingeht. Dies stellt eine inhibitorische Interaktion zwischen der Protease- und PDZ-Domäne dar (Chaba et al. 2011; Sohn et al. 2007).

5. Diskussion

5.1 Inhibition von DegS

Der erste potentiell spezifische Inhibitor für DegS

Schon vor dem Beginn dieser Arbeit wurde das erste *Screening* auf Inhibitoren von DegS durchgeführt und führte zu mehreren positiven Ergebnissen, die in orthogonalen Assays (*in-vitro*) auch zumeist bestätigt werden konnten. Wurden die Experimente allerdings auf weitere Assaysysteme und lebende Bakterien ausgeweitet, so konnte sich nur ein einziger *Compound* tatsächlich durch Wirksamkeit und Spezifität absetzen (LDC043908). Nur dieser konnte DegS in allen *in-vitro* Systemen wie auch das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur inhibieren. So wurde gezeigt, dass die Aktivität von DegS tatsächlich auch die Lebensfähigkeit der behandelten Bakterien betrifft, ob auch tatsächlich die Inhibition von DegS für diesen Effekt verantwortlich ist, sollte später in dieser Arbeit gezeigt werden. Die einfachste Erklärung für den nicht vorhandenen Effekt anderer „*in-vitro* Inhibitoren“ von DegS gegenüber lebenden Bakterien ist, dass diese nicht oder nicht in ausreichender Konzentration den Wirkort DegS erreichen konnten und so keine Inhibition von DegS stattfinden konnte. Dafür kann es verschiedene Gründe geben. Zum einen wäre es möglich, dass die entsprechende Chemikalie nicht in der Lage war über die Barriere der äußeren Membran (inkl. Lipopolysaccharidschicht) hinaus zu DegS zu gelangen. Andererseits ist es auch möglich, dass die Chemikalie in der komplexen Formulierung einer bakteriellen Flüssigkultur mit einer höheren Präferenz (durch höhere Affinität) an ein anderes Molekül (Chemikalie, Protein, Fett, LPS, usw.) gebunden hat und so nicht genügend Moleküle des Inhibitors an DegS binden konnte um einen messbaren Effekt hervorzurufen. Es wurden keine weiteren Arbeiten durchgeführt, um diese Unklarheiten weiter zu klären, da es zu dem entsprechenden Zeitpunkt wenig zielführend erschien.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde am LDC ein weiterer *Screen* mit anderen *Compound*-Bibliotheken durchgeführt, sodass insgesamt etwa 185.000 *Compounds* auf die Inhibition von DegS getestet werden konnten. Aus diesem zweiten *Screen* ergaben sich einige als positiv bewertete Ergebnisse, es folgten wiederum orthogonale Assays am ZMB. Allerdings konnte eine Inhibition von DegS durch keines der Moleküle bestätigt werden. Diese großen Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen am LDC und unserem Labor sind nicht einfach nur durch experimentelle Fehler zu erklären. Auch kommt die Anwendung unterschiedlicher Assaysysteme nicht vollends für diese Unterschiede in Betracht, es wurden jeweils die gleiche Protease und auch das gleiche Substrat benutzt. Einzig die Auslesetechnik war in beiden Systemen unterschiedlich. Während in unserem Labor der proteolytische Verdau von RseA weitestgehend direkt beobachtet wurde, indem Proben des Experimentansatzes

per SDS-PAGE aufgetrennt wurden, war am LDC die Energieübertragung zwischen zwei Fluorophoren über radikale Sauerstoffspezies ausschlaggebend. Das hat zwar den Vorteil, dass große Zahlen von Experimenten parallel ausgeführt und durch eine Maschine ausgelesen werden können, allerdings bieten sich auch mehr Angriffspunkte für die als potentielle Inhibitoren eingesetzten Chemikalien.

Erhöhung von Spezifität und Potenz des Inhibitors durch Derivatisierung

Nachdem das Molekül LDC043908 wie oben beschrieben als ein potentieller Inhibitor für DegS *in-vitro* wie auch in lebenden Bakterien bestätigt wurde, sollte mit dem Test von Derivaten des Moleküls eine Beziehung zwischen Struktur und Wirkung erarbeitet werden. Dazu wurden 55 Derivate aus den Beständen des LDC getestet und außerdem weitere 17 Derivate, welche Anna-Laura Schmitz (AG Kaiser, ZMB Essen) synthetisiert hatte. Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse soll hier noch einmal die Abbildung aus dem Ergebnisteil aufgegriffen werden (Abb. 54).

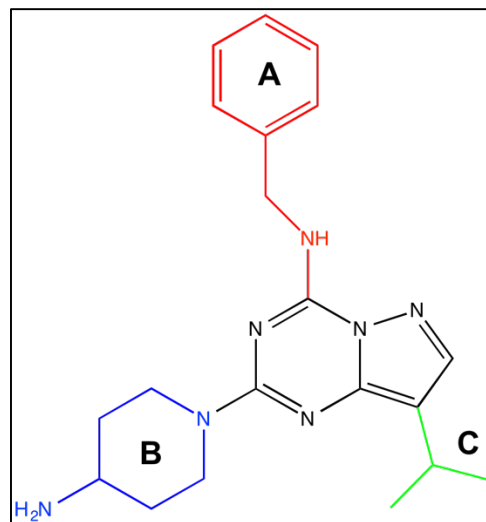


Abb. 54: Strukturzeichnung LDC043908 mit Verdeutlichung der derivatisierten Elemente.

Darstellung von LDC043908 als Strukturzeichnung mit Verdeutlichung der einzelnen Elemente. Das Grundgerüst ist in schwarz dargestellt, verschiedene Reste sind in rot (A; 4-Amin-N-benzyl), blau (B; 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)) und grün (C; 8-Isopropyl) dargestellt.

Bei den 55 Derivaten, welche aus den Bibliotheken des LDC stammten, handelte es sich ausschließlich um Veränderungen der Reste A und B. Rest C sowie das Grundgerüst blieben von der Derivatisierung völlig unangetastet. Es zeigte sich dabei, dass Rest B nicht verändert werden darf, um eine inhibitorische Wirkung auf DegS zu erhalten. Jede untersuchte Veränderung (Vergrößerung, Verkleinerung, andere Substituenten, Erweiterung des Ringsystems, Aufbruch des Ringsystems, ...) führte zu einem totalen Verlust der Inhibition von DegS. Änderungen an Rest A führten zu unterschiedlichen Ergebnissen, auch hier führten die meisten Veränderungen zu einem Totalverlust der inhibitorischen Wirkung auf DegS. Einige Veränderungen, wie etwa die Verlängerung des

linkers oder die Vergrößerung des Ringes, führten dazu, dass eine abgeschwächte aber deutlich erkennbare inhibitorische Wirkung des *Compounds* nachweisbar war. Keine der Veränderungen führte allerdings zu einer verbesserten Wirkung. Substitutionen des *linkers* werden nicht toleriert.

Daraus lässt sich schließen, dass es für diese Inhibitoriklasse eine sehr enge Beziehung zwischen Struktur und Wirkung gibt, kleinste Veränderungen an der falschen Stelle führen zum totalen Wirkverlust. Für Bindung und Wirkung besonders wichtig erscheint Rest B, welcher überhaupt nicht verändert werden darf.

Mit den Derivaten von Anna-Laura Schmitz sollte vor allem der bisher nicht veränderte Rest C und das Grundgerüst adressiert werden. Dabei zeigte sich ganz klar, dass kein Spielraum für die Veränderung des Grundgerüsts vorhanden ist (ALS100), ähnlich wie Rest B scheint er sehr wichtig für die Wirkung des Moleküls. Rest C ist deutlich variabler, ganz entfernt werden (ALS59) darf er allerdings auch nicht, ebenfalls wird einer Veränderung der Position von Rest C (ALS168) nicht toleriert. Vergrößerungen von Rest C, vor allem durch substituierte Aromaten, wirken sich zumeist auch positiv auf die Inhibition von DegS aus (ALS66, ALS207, ALS209). Allerdings gibt es auch hier Grenzen was etwa die Größe angeht. Eine doppelte Substitution des aromatischen Ringes in Rest C wie bei ALS167 führt zu einem Verlust der inhibitorischen Wirkung, eventuell wird dieser Rest durch die Veränderung zu groß für seine spezifische Bindetasche an DegS und bewirkt so einen Verlust der Bindung über diese Interaktion.

Verbesserungen der inhibitorischen Wirkung auf DegS lassen sich vor allem durch bestimmte Substitutionen des Ringsystems in Rest A und durch bestimmte Erweiterungen von Rest C erzielen. Bei den Substitutionen des Ringsystems von Rest A (wie -F in ALS138 und ALS139) kommt es auch auf die Position der Substitution an, so ist etwa LDC047871 die gleiche Gruppe an einer anderen Position substituiert, die Inhibition aber deutlich schlechter. So lässt sich sagen, dass die -F Substitution in ortho-Stellung gegenüber der meta-Stellung leicht und gegenüber para deutlich präferiert wird. Andere Substitutionen, wie meta-OCH₃ (ALS209) oder para-N₃ (ALS182) wirken sich ebenfalls positiv auf die inhibitorische Wirkung der *Compounds* aus. Was allerdings auffällt ist, dass die Kombination von Veränderungen an Rest A und C, die sich einzeln als positiv erwiesen, wie in ALS167 oder ALS179, nicht positiv auf die inhibitorische Wirkung des Moleküls auswirken, ja sogar zu einem Totalverlust dieser führen. Insgesamt wurde also eine Verbesserung der kleinsten Konzentration, bei der ein *Compound* DegS in diesem Assay inhibiert, um den Faktor 4 erreicht (ALS221, ALS209 und ALS207 gegenüber LDC043908). Die quantitative Erfassung dieser Inhibitionen durch IC₅₀-Werte (am LDC bestimmt), stimmt auch aus den oben beschriebenen Gründen nicht immer mit unseren Beobachtungen überein und war zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht für alle *Compounds* verfügbar. Auch

wenn einzelne Beziehungen zwischen Teilen der Struktur und der Wirkung herausgearbeitet werden konnten, lässt sich jedoch noch kein Gesamtbild festlegen, was auch an den teilweise widersprüchlichen Ergebnissen liegt. An dieser Stelle wäre es nötig und wichtig die genaue Bindestelle des Moleküls zu kennen, damit die Struktur-Wirkungs-Beziehung zu erklären und somit ein rationales Design neuer Derivate zu betreiben.

Ein weiterer, äußerst positiver, Effekt dieser Derivatisierung war, dass die Vergrößerung von Rest C zu einem sterischen Konflikt des Moleküls mit den Substraterkennungsstellen vieler Kinasen führte. Wurden mit dem Ausgangsmolekül noch viele Kinasen, wie etwa die wichtigen humanen Kinasen CDK2 und CDK9, inhibiert, ist das mit einer größeren Gruppe an Rest C (wie in ALS66) nicht mehr der Fall. Diese Entwicklung ist ein sehr wichtiger Schritt bei der Entwicklung eines Primärhits zu einem Arzneimittel, weil so verheerende Nebenwirkungen minimiert werden konnten. Zellzyklusabhängige Kinasen (*cell cycle dependent kinases* – CDKs) nehmen wichtige Rollen in der Regulation des Zellzyklus aller Eukaryoten ein und sind bei einer Dysregulation vor allem mit Krankheiten wie Krebs assoziiert, wie Barbacid und Malumbres in einem umfassenden Review-Artikel beschreiben (Malumbres & Barbacid 2009).

Messung von Inhibitionsstärken per pNA-Assay

Dieses Assay beruht auf der kolorimetrischen Messung von Nitroanilin, welches durch den spezifischen proteolytischen Schnitt eines synthetischen Substrates frei wird. In der Theorie ist damit eine quantitative Verfolgung der proteolytischen Aktivität bzw. Inhibition einer Protease möglich. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Aktivität von DegS in einem spezifischen pNA-Assay verfolgt werden kann, die Steigung der entstandenen Gerade ist während des gesamten Versuchszeitraumes linear. Auch eine dosisabhängige Inhibition von DegS durch LDC043908 ist nachweisbar. Bei einer Konzentration von 400 μM LDC043908 ist eine Inhibition von fast 90 % zu erkennen. Für DegP ist ebenfalls eine Aktivität in dem spezifischen pNA-Assay nachweisbar, ebenso wie eine dosisabhängige Inhibition durch LDC043908. Allerdings ist bei 400 μM LDC043908 nur eine Inhibition von knapp 60 % messbar. Problematisch ist hingegen, dass die Entwicklung der Absorption bei 405 nm für DegP nicht linear mit der Zeit zusammenhängt und so eine Feststellung der Aktivität nur in den ersten etwa 300 Sekunden des Experimentes möglich ist. Bezogen auf die Auswertung des gesamten Experimentes kann das leicht zu systematischen Fehlern bei der Beurteilung der Steigung führen.

Weitere Ergebnisse aus pNA-Assays (ohne Abbildung), die teilweise gegenläufige Ergebnisse zu allen anderen Tests lieferten oder überhaupt nicht auswertbar waren (z.B., weil keine befriedigende Löslichkeit von Inhibitor und synthetischem Substrat erreicht werden konnte), führten dazu, dass keine weiteren pNA-Assays mehr durchgeführt wurden.

Außerdem wurden keine quantitativen Werte, die aus einem pNA-Assay gewonnen wurden, für die weitere Diskussion über die Wirksamkeit von *Compounds* mehr herangezogen.

An dieser Stelle muss herausgestellt werden, dass durch dieses Assay offenbar mehr Fragen aufgeworfen als geklärt wurden. So sollte noch einige experimentelle Arbeit investiert werden um die genauen Mechanismen, welche Einfluss auf die Abbildungskraft eines pNA-Assays nehmen, zu festzustellen. Es ist wichtig zu bestimmen, in wie weit und durch welche Mechanismen sich die Wahl des Substrates auf die Inhibitionsfähigkeit einer Protease oder eines Enzyms im Allgemeinen auswirkt. Dabei muss beachtet werden, dass besonders bei potentiellen medizinischen Wirkstoffen immer die physiologische Situation ausschlaggebend sein sollte. So wurde für spätere Versuche und auch in ähnlichen Zusammenhängen immer ein möglichst physiologisches Substrat gewählt, um durch das entsprechende Experiment eine relevante Aussage tätigen zu können.

Inhibition des Wachstums von E. coli Kulturen durch LDC043908

Um die inhibitorische Wirkung des *Compounds* LDC043908 auf DegS nicht nur in isolierten *in-vitro* Systemen zu untersuchen, wurden natürlich auch Versuche mit Bakterienkulturen durchgeführt. Zunächst wurden unterschiedliche Varianten (WT und $\Delta degS$) des später noch wichtigen Reporterstammes in Flüssigkulturen über Nacht angezogen, auf definierte Konzentrationen verdünnt und mit LDC043908 in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Dann wurde das Wachstum anhand der OD_{600} über mehrere Stunden verfolgt (Abb. 27). Für den Stamm CAG16037 (WT) ist dabei eine deutliche Verringerung des Wachstums ab einer *Compound*-Konzentration von 200 μM zu erkennen, bei höheren Konzentrationen (300 und 400 μM) war kein Wachstum der Kultur mehr nachweisbar. Andere Ergebnisse wurden für den Stamm CAG33315 ($\Delta degS$) sichtbar, hier war eine deutliche Verringerung des Wachstums erst ab einer *Compound*-Konzentration von 400 μM LDC043908 messbar. Darüber hinaus gehenden Konzentrationen wurden nicht getestet. Eine andere Form der Darstellung dieser Ergebnisse (Abb. 28) macht die Auswirkungen steigender LDC043908-Konzentrationen auf die beiden untersuchten *E. coli* Stämme noch deutlicher. Während das relative Wachstum bei CAG16037 ab einer Konzentration von 100 μM LDC043908 deutlich und schnell abnimmt, ist dieses für CAG33315 erst ab etwa 300 μM LDC043908 erkennbar. Die untere Basislinie des Wachstums ist für CAG16037 ab einer Konzentration von knapp über 200 μM LDC043908 erreicht, für CAG33315 wird sie innerhalb der gemessenen Konzentrationen nicht erreicht.

So wird deutlich, dass für beide Stämme eine dosisabhängige Verringerung des Wachstums in Flüssigkultur durch Zugabe von LDC043908 erreicht wird. Für den wildtypischen Stamm wird diese Verringerung des Wachstums allerdings mit deutlich geringeren Konzentrationen erreicht und auch ein Nullwachstum ist relativ schnell zu erkennen. Der benutzte Stamm CAG33315 und seine Erstellung wurden zwar genau

beschrieben (Ades et al. 1999), wie genau die Zellen mit der Deletion eines als essentiell beschriebenen Genes allerdings überlebensfähig sind, konnte bisher nicht erklärt werden. Es wäre denkbar, dass durch Selektion eine Suppressormutante entstanden ist, welche den Verlust von *degS* auf eine bisher nicht beschriebene Art kompensiert. Von diesem Stamm wird im Idealfall erwartet, dass er nicht messbar durch LDC043908 im Wachstum inhibiert werden sollte, da hier schlicht das Ziel seiner Wirkung fehlt. Dass der Stamm allerdings doch bei sehr hohen Konzentrationen durch LDC043908 inhibiert wird zeigt, dass LDC043908 noch einen anderen Interaktionspartner in *E. coli* haben muss. Ein experimenteller Aufbau zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner ist über eine Massenspektrometrische Analyse denkbar. Dazu müssten in einer HPLC-Säule LDC043908-Moleküle immobilisiert werden, über diese Säule könnte dann ein Zellextrakt von *E. coli* gegeben werden, sodass Interaktionspartner an die stationäre Phase binden. Über passend gewählte Wasch- und Elutionsschritte könnten dann Interaktionspartner mit unterschiedlichen Affinitäten zu LDC043908 isoliert und massenspektrometrisch identifiziert werden.

Außerdem wurden Experimente mit BW30270, einem *E. coli* Wildtyp und dem Stamm MM518 ($\Delta galE$, $\Delta galK$, $\Delta tolC$) und dem LDC043908-Derivat ALS182 durchgeführt. Für BW30270 zeigte sich eine deutliche, dann aber auch vollständige Inhibition des Wachstums erst bei einer Konzentration von 400 μM ALS182. Obwohl ALS182 in *in-vitro* Experimenten bessere Ergebnisse gezeigt hatte als LDC043908 (Abb. 18), ist in diesem Versuch eine schwächere Inhibition des Wachstums als durch den Ausgangs-Compound zu erkennen. Stamm MM518 ist durch seine Mutationen sowohl im Efflux ($\Delta tolC$) als auch in der LPS-Schutzschicht ($\Delta galE$, $\Delta galK$) deutlich gegenüber einem wildtypischen Stamm benachteiligt. Die Ergebnisse im Zusammenhang mit ALS182 machen deutlich, dass ALS182 auch schon in niedrigen Konzentrationen äußerst wirksam ist, wenn es zu seinem molekularen Ziel gelangen kann. So ist bereits bei einer Konzentration von 25 μM ALS182 eine deutliche Verringerung des Wachstums zu verzeichnen, bei darüber hinaus steigenden Konzentrationen ist gar kein Wachstum mehr nachweisbar. Dieses zeigt, dass es sich zumindest bei ALS182 um einen sehr guten Inhibitor von DegS *in-vivo* handelt, durch gezielte medizinal-chemische Veränderungen des Moleküls hinsichtlich des Eindringens in lebendige Bakterien kann die Wirksamkeit noch deutlich erhöht werden. Es bleibt zu erwähnen, dass die gezeigten Versuche für LDC043908 und ALS182 eigentlich nicht miteinander verglichen werden können, da unterschiedliche Stämme genutzt wurden. Eine Wiederholung der Experimente in allen Stämmen wäre also zur besseren Vergleichbarkeit ratsam.

Der Inhibitor zeigt auch Wirkung auf pathogene Bakterien mit hoher Relevanz

Durch einen Kooperationspartner am Universitätsklinikum Essen konnten die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) von LDC043908 gegenüber diversen klinisch relevanten Bakterien bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass nur für fünf der 19 getesteten Arten kein MIC-Wert bestimmt werden konnten, also im getesteten Bereich (bis 600 μM) keine Inhibition nachweisbar war. Dabei wurden sowohl Gram-positive wie auch Gram-negative Stämme inhibiert. Die Ergebnisse zeigen, dass nicht nur der verwendete Modellorganismus *E. coli*, sondern auch klinische relevante Arten durch den vorliegenden *Compound* inhibiert werden. Besonders positiv zu bewerten ist die Tatsache, dass auch Arten der sog. ESKAPE Organismen (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter spp.*) durch LDC043908 inhibiert werden (siehe Einleitung; (Rice 2008)).

Wachstumshinhibition kann auf die Wechselwirkung von DegS und LDC043908 in-vivo zurückgeführt werden

Mit Hilfe des β -Galactosidase-Assays sollte gezeigt werden, dass speziell die Funktion von DegS auch *in-vivo* durch LDC043908 inhibiert wird. Dafür stand eine Reihe von Reporterstämmen zur Verfügung, die alle ein *lacZ* Gen unter Kontrolle des σ^E spezifischen Promotors *rpoH*:P3 tragen, sodass bei Stress über dem σ^E Signalweg β -Galactosidase exprimiert wird. Diese ist per Aktivitätsmessung über Umsatz eines synthetischen Substrates quantitativ nachweisbar. So ist die entstehende Gelbfärbung ein Maß für die Aktivität von DegS. Außerdem wurde ein künstlicher Induktor der DegS-Aktivität in das System eingebracht. Dazu wurde ein induzierbares Fusionsgen aus MBP (zur Stabilität) und den 50 N-terminalen AS von OmpC genutzt um von außen steuerbaren Stress und damit Aktivität von DegS zu generieren.

Es konnte gezeigt werden, dass das gewünschte Fusionsprotein nach Induktion in großen Mengen im Periplasma von Bakterien vorliegt, in Kontrollen nur in sehr geringen Mengen (nicht induziert) oder überhaupt nicht (Abb. 31). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression des Fusionsproteins die Aktivität des beobachteten Promotors, also auch die Aktivität von DegS, gegenüber der grundlegenden Kontrolle etwa um Faktor fünf erhöht. Das war für den wildtypischen Reporterstamm CAG16037 der Fall. Reporterstämmen, welche die Aktivität des Promotors von der DegS-Aktivität entkoppeln, wie CAG33315 ($\Delta degS$) und CAG22968 ($\Delta rseA$), zeigten ein anderes Bild (Abb. 32). Hier waren die nachweisbaren Aktivitäten des Promotors entweder deutlich verringert (CAG33315) oder deutlich erhöht (CAG22968) und in jedem Fall aber unabhängig von der Expression des Fusionsproteins. Zusammen genommen zeigen diese Daten, dass die Aktivität von DegS durch die Expression des Fusionsproteins gezielt erhöht werden kann und dass diese gesteigerte Aktivität von DegS durch das vorliegende β -Galactosidaseassay messbar ist.

Im Hauptexperiment wurde dann außerdem der *Compound* LDC043908 zugegeben um die Aktivität von DegS zu inhibieren (Abb. 33). Es zeigt sich, dass die spezifische β -Galactosidase-Aktivität durch die Zugabe von 200 μ M LDC043908 in den meisten Fällen nicht verringert werden kann. Das weist auf eine Art Grundaktivität des gesamten Signalweges hin, die nicht einfach inhibiert werden kann. Bei Induktion des Fusionsproteins mit Anhydrotetrazyklin (AHT) jedoch, wird die Grundaktivität etwa verdoppelt. Wird noch zusätzlich Inhibitor zugegeben, geht die gemessene spezifische Aktivität der β -Galactosidase wieder zurück auf das Grundniveau, welches auch schon vorher nicht inhibierbar war. Es konnte also gezeigt werden, dass die spezifische Inhibition von DegS-Aktivität auch in einem *in-vivo* System möglich und nachweisbar ist.

Unbeantwortet bleibt, warum die β -Galactosidase-Aktivität nach Gabe von AHT in der Kontrolle absinkt, bei Gabe von 200 μ M LDC043908 jedoch steigt (für das nicht induzierte Plasmid). Es ist möglich, dass hier, zumindest für den Fall der Zugabe von AHT, andere Signalwege getroffen werden und sich auf die gesamte auslesbare Aktivität auswirken. Daran zeigt sich, dass das ganze System, in welches der σ^E Signalweg eingebettet ist, deutlich komplexer ist als der zunächst betrachtete *in-vitro* Verdau von RseA.

Analysen des Wirkmechanismus zeigen eine Inhibition der allosterischen Aktivierung von DegS durch LDC043908

Um eine grobe Einordnung vornehmen zu können, bzw. um erste Hinweise auf den Wirkungsort von LDC043908 innerhalb von DegS zu erhalten, wurden Inhibitionstest mit Punktmutanten von DegS durchgeführt. Dazu wurden Punktmutanten von DegS ausgesucht, die eine genau beschriebene Auswirkung auf die Aktivitätsregulation der Protease aufweisen, sodass verschiedene Aspekte der Regulation und Aktivität abgedeckt sind. Einen ersten Hinweis ergab allerdings schon der Test mit einer PDZ-losen Form von DegS (DegS- Δ PDZ), welche durch LDC043908 nicht mehr inhibiert wurde (Abb. 23). Ein bestätigter Inhibitor von Serinproteasen, der über eine Bindung im aktiven Zentrum inhibiert, konnte den RseA-Verdau durch DegS- Δ PDZ nach wie vor unterbinden. Auch eine mutierte Version von DegS, welche das *oxyanion-hole* betrifft (H198P), kann nicht inhibiert werden. Diese beiden Teilergebnisse zusammen sind bereits ein deutlicher Hinweis darauf, dass eine Inhibition mit größter Wahrscheinlichkeit nicht im aktiven Zentrum der Protease stattfinden wird. Für diesen Fall hätte (1) die Entkopplung von der Notwendigkeit einer Aktivierung (wie in DegS- Δ PDZ) keinen Einfluss auf die Inhibition durch LDC043908 haben können. Und (2) hätte die Stabilisierung des *oxyanion-hole* und damit eine Verschiebung des dynamischen Gleichgewichtes zur aktiven Form hin keinen Totalverlust der Inhibierbarkeit von DegS zur Folge haben dürfen. Allerdings scheint die H198P-Variante eine so starke Aktivierung von DegS zu bedeuten, dass auch der *active-site* Inhibitor in

einer sehr hohen Konzentration (400 μM LDC917756) die Protease nicht mehr inhibieren kann (siehe Abb. 58 im Anhang).

Alle anderen Punktmutanten von DegS greifen an definierten Stellen in den Aktivierungsmechanismus ein, oft werden inhibitorische Verbindungen gestört, welche nur im inaktiven Zustand ausgebildet werden. Bei der genauen Betrachtung der Verdaureaktionen (teilweise ohne Abbildung) wird deutlich, dass es allerdings keine der Punktmutationen (abgesehen von H198P) vermag die Aktivierung durch Aktivatorpeptidbindung vollständig zu umgehen. Die Begründung dafür liegt zum einen in der Notwendigkeit der Feinjustierung der Aktivierungsdomäne durch die Interaktion von Loop L3 und dem gebundenen Aktivatorpeptid (siehe Abschnitt 2.3.4, Einleitung), und zum anderen daran, dass viele verschiedene inhibitorische Verbindungen parallel existieren. Die Bedeutung der Interaktion von Loop L3 und dem gebundenen Aktivatorpeptid auf die Wirkung von LDC043908 konnte leider nicht genau untersucht werden. Eine Mutante von DegS, in welcher die Interaktionsstelle T184 in veränderter Form vorlag (T184A) wies unter keiner untersuchten Bedingung eine Aktivität auf, die durch LDC043908 hätte unterbunden werden können. Es fällt außerdem auf, dass alle aktiven Varianten von DegS (mit Ausnahme von H198P) noch durch LDC043908 inhibiert werden können, zumindest zu einem gewissen Maß. Mit diesen Daten lässt sich also festlegen, dass keine der mutierten Stellen in DegS mit der Bindungs-/Wirkungsstelle von LDC043908 genau übereinstimmen kann, da sonst aller Voraussicht nach die Bindung des Moleküls an DegS deutlich gestört wäre, das würde den Verlust der inhibitorischen Wirkung von LDC043908 nach sich ziehen. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass durch diese Ergebnisse eine Wirkung von LDC043908 als klassischer *active-site* Inhibitor der Protease ausgeschlossen werden kann. Weitere Ergebnisse deuten darauf hin, dass LDC043908 in die Weitergabe des Stresssignals, also die allosterische Aktivierung von DegS eingreift. An welcher Stelle genau dieses geschieht, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht festgestellt werden. Dazu wäre die Untersuchung weiterer Punktmutanten von DegS nötig. Deutlich zielgerichteter wäre allerdings auch hier die strukturelle Auflösung des an DegS gebundenen Inhibitors, etwa durch Röntgenstrukturaufklärung oder NMR-Experimente.

Eingrenzung der Inhibitor-Wechselwirkung auf die Bindestelle des Aktivatorpeptides

Anknüpfend an die letzten Feststellungen zeigte sich eine weitere Besonderheit der Inhibition von DegS durch LDC043908. Wurde DegS mit einem anderen Aktivatorpeptid als FFF aktiviert (z.B. IVALGLVYQF, DNRLGLVYQF oder DNRLGLVYWF) war eine Inhibition durch LDC043908 nicht mehr möglich, während der *active-site* Inhibitor LDC198181 seine Wirkung noch voll ausbilden konnte (Abb. 26). Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Eine Möglichkeit wäre, dass die längeren Aktivatorpeptide,

welche nur mit den drei oder vier letzten Positionen (VYQF bzw. VYWF) an die PDZ-Domäne bzw. Loop L3 binden (Wilken et al. 2004; Hasselblatt et al. 2007), die Bindung des Inhibitors sterisch blockieren. Dabei wäre davon auszugehen, dass der Inhibitor in Reichweite des ungebundenen Teils des Aktivatorpeptides an DegS binden würde, etwa in der Furche zwischen PDZ- und Proteasedomäne. Diese Erklärungsmöglichkeit konnte durch ein weiteres Experiment ausgeschlossen werden, dabei wurden kürzere Aktivatorpeptide VYQF und VYWF verwendet um DegS zu aktivieren. Diese zeigen schlechtere Werte für die Aktivierung (mind. 100 μM Peptid werden für eine deutliche Aktivierung benötigt), DegS lässt sich in diesen Experimenten jedoch auch nicht durch die Zugabe von 400 μM LDC043908 inhibieren (Abb. 25). Bei diesem Experiment waren keine ungebundenen Reste der Aktivatorpeptide mehr vorhanden, sodass ausgeschlossen werden konnte, dass der Inhibitor LDC043908 an einer bisher undefinierten Stelle im Umkreis der Aktivator-Bindestelle an DegS bindet. Es muss also von einer weiteren Möglichkeit ausgegangen werden. Diese geht davon aus, dass es zu einer direkten Konkurrenz zwischen LDC043908 und dem Aktivatorpeptid um Bindung an DegS kommt. Diese könnte sowohl direkt an der Bindestelle der PDZ-Domäne als auch an der Interaktionsstelle (T184) des Loop L3 mit Position -1 des Aktivatorpeptides bestehen, sodass eine Weitergabe des Aktivierungssignals direkt am Anfang unterbunden würde. In jedem Fall unterstreicht diese Theorie auch die Tatsache, dass auch nach verbessernder Derivatisierung noch sehr hohe Konzentrationen des Inhibitors benötigt werden um DegS vollständig zu inhibieren. Der Inhibitor muss hier nicht nur die Affinität aufbringen um überhaupt an die Protease zu binden, sondern auch (zumindest teilweise) mit einem physiologischen Liganden um die Bindestelle konkurrieren. Bisher konnten leider die Affinitäten von LDC043908 und FFF zu DegS nicht bestimmt werden, lediglich die K_D -Werte von DNRLGLVYQF (53 μM) und DNRLGLVYWF (3 μM) wurden bisher beschrieben (Hasselblatt et al. 2007). Um diese bisher nur durch Hinweise gestützte Theorie zu bestätigen, wären Bindungsexperimente durchzuführen. Das wäre etwa durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) oder Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) möglich. Leider haben aufgrund von Löslichkeitsproblemen entsprechende Messungen per ITC bisher nicht stattfinden können. Eine Messung der Bindungs-Konkurrenz zwischen Inhibitor und Aktivatorpeptid über Fluoreszenzanisotropie ist in Planung. Dabei wird ein fluoreszierendes *label* chemisch an ein Aktivatorpeptid konjugiert und die Änderung der Anisotropie in verschiedenen Konkurrenzsituationen verfolgt.

Außerdem kann auch hier die Modellierung der Bindung an die Aktivatorbindestelle innerhalb der PDZ-Domäne bzw. deren nähere Umgebung *in-silico* per *Molecular Docking* entscheidende Informationen über die Vorgänge bieten. Diese Ergebnisse müssten dann natürlich noch durch Experimente abgesichert werden. So könnten etwa Punktmutanten

von DegS erstellt werden, die das Bindungsverhalten an entscheidenden Stellen so verändern würden, dass auch Inhibitor und Aktivatorpeptid anders binden würden, der Nachweis dessen wäre über verschiedenste experimentelle Designs möglich (Verdau, Affinität, ...).

Zusammengefasst zeigen die Versuche mit LDC043908 und Derivaten, dass DegS auch in realen physiologischen Systemen recht spezifisch inhibiert werden kann. Diese Inhibition wirkt sich weit über die Aktivität von DegS hinaus auch auf die Lebensfähigkeit des gesamten Bakteriums aus. So kann durch die Inhibition von DegS das Wachstum verschiedenster Bakterien stark verringert oder gar ganz unterbunden werden. LDC043908 und Derivate haben damit also ein weiteres wichtiges Kriterium auf dem Weg zu einem medizinisch anwendbaren Wirkstoff erfüllt. Widersprüchlich bleibt zunächst, dass die Inhibition von DegS im physiologischen System gut funktioniert, in *in-vitro* Versuchen mit einem physiologischen Aktivatorpeptid allerdings nicht. Diese Diskrepanz könnte durch das Zusammenspiel von Konzentration und Affinität erklärt werden. So bildet sich auch im physiologischen System ein dynamisches Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem DegS durch die dynamische Bindung des auslösenden Signalpeptides aus. Ob dieses Zusammenspiel mit korrekten Konzentrationen in dem *in-vitro* System jedoch treffend nachgebildet wurde, kann bisher nicht beantwortet werden, da nicht bekannt ist wie viele Kopien von DegS und RseA in einem Bakterium vorliegen, wie viel LDC043908 in die Zelle gelangen kann, und wie hoch konzentriert das stressauslösende Signal vorliegen kann. Erste Hinweise auf das Zusammenspiel könnten die bereits angesprochenen Versuche zu Affinität und Konkurrenz zwischen Aktivatorpeptiden und Inhibitoren um Bindung an DegS liefern. Zunächst scheint also das benutzte *in-vitro* System eine höhere Hürde für die Auswahl passender Inhibitoren darzustellen als physiologisch-relevant tatsächlich benötigt würde.

5.2 Inhibition von HTRA1

Warum soll HTRA1 inhibiert werden?

Wie bereits in der Einleitung beschrieben führt die Hochregulation der HTRA1 Expression zu erhöhter Zellproliferation *in-vitro* und Tumorwachstum *in-vivo* (Baldi et al. 2002; Oka et al. 2004; Hou et al. 2005; Launay et al. 2008; Campioni et al. 2010). Seine degradierende Wirkung auf viele sekretierte Proteine in der extrazellulären Matrix (Grau et al. 2005; Grau et al. 2006; An et al. 2010; Oka et al. 2004; Tsuchiya et al. 2005) und seiner Hochregulation in vielen Patientenuntersuchungen verknüpfen HTRA1 außerdem mit Arthritis, wo es an der Degradation von Knorpelgewebe und Entzündungsprozessen beteiligt sein könnte (Milner et al. 2008). Außerdem ist die erhöhte Expression von HTRA1 durch eine kleine Nukleotidveränderung (*single nucleotide polymorphism* – SNP) mit der Entstehung einer altersbedingten Makuladegeneration (AMD) verknüpft (Yang et al. 2006). Etwa jeder zweite Patient mit der entsprechenden Genveränderung wird im Laufe seines Lebens an AMD erkranken, die Krankheit ist der häufigste Grund für den Verlust des Sehvermögens in den entwickelten Ländern (Attebo et al. 1996). Es lässt sich also feststellen, dass die erhöhte Expression und damit auch erhöhte Aktivität von HTRA1 mit dem Auftreten einiger schwerwiegender Krankheiten assoziiert ist. Die Verringerung der Aktivität von HTRA1 durch einen medizinischen Wirkstoff könnte also einigen Patienten das Leben erleichtern, das Sehvermögen erhalten oder sogar das Leben deutlich verlängern (im Falle von Krebs). Im Falle der AMD sind zwar antikörperbasierte Therapieverfahren möglich und erfolgreich, diese sind jedoch mit sehr hohen Kosten und einige Hürden verbunden (Volz & Pauly 2015). Ein Wirkstoff in Form eines kleinen Moleküls könnte hier einige Verbesserungen schaffen.

HTRA1 kann inhibiert werden

Um einen potenten und spezifischen Inhibitor von HTRA1 zu finden, wurde schon vor Beginn dieser Arbeit ein Assay etabliert, welches auf die automatisierte Plattform am LDC in Dortmund übertragen werden kann (Melisa Merdanovic). Dieses Assay beruht wie auch bei DegS auf dem proteolytischen Verdau von gelabeltem RseA. Wird ein geringeres Ausgabesignal gemessen als in den Kontrollproben, wird davon ausgegangen, dass RseA verdaut wurde und sich so die beiden *label* nicht mehr in räumlicher Nähe befinden, wodurch die Energieübertragung unterbrochen ist. Systematisch bedingt machen diese Ergebnisse keine Aussage über Spezifität der Inhibition, oder ob tatsächlich eine Inhibition der untersuchten Protease vorlag. Es ist auch vorstellbar, dass der entsprechende *Compound* einen direkten Einfluss auf die Energieübertragung hat, das Ausgabesignal stört oder eine unspezifische und ungewollte Beeinflussung der Protease zum Nachteil der katalytischen Aktivität vorliegt. In den orthogonalen Assays, die auch im Zuge dieser Arbeit

durchgeführt wurden, sollte deshalb auf diese Punkte eingegangen werden. Bereits vor Beginn dieser Arbeit wurden die ersten *hits* aus dem *Screen* durch Melisa Merdanovic auf ihre Wirksamkeit gegenüber HTRA1 und anderen Serinproteasen getestet. Aufgrund dieser Daten, der Daten aus dem *Screen* und medizinal-chemischen Gesichtspunkten wurde dann eine Einteilung der Moleküle in sechs Klassen vorgenommen (siehe Tabellen 12 bis 16). Aus diesen sechs Klassen wurden Derivate zugekauft oder synthetisiert und dann im Zuge dieser Arbeit analysiert. Dazu wurde eine systematische Charakterisierung der *Compounds* und ihrer Wirkung auf HTRA1/2/3/4, DegS, DegP, Elastase, Trypsin und Chymotrypsin vorgenommen.

Klasse A Compounds inhibieren gut, sind aber instabil

Vor allem zu Klasse A zählen recht viele Vertreter, deshalb kann hier am besten im Sinne einer Struktur-Wirkungs-Beziehung argumentiert werden. Es handelt sich um einer Klasse von 1,2,4-Triazolen, die aus den primären *hits* LDC070404 und LDC091675 hervorgegangen sind. In der Literatur gibt es auch schon Hinweise auf die Inhibition der Serinprotease Kallikrein durch 1,2,4-Triazole (Tan et al. 2013), ein Reaktionsmechanismus wird postuliert. Der beschriebene Reaktionsmechanismus konnte in dieser Arbeit für *Compounds* der Klasse A und DegS bestätigt werden. Dabei wird, ähnlich wie in der physiologischen Reaktion, die intramolekulare „Amidbindung“ durch das Serin des aktiven Zentrums angegriffen und es kommt zu einem transienten Übergangszustand (Acyl-Enzym), der nicht in der normalen Geschwindigkeit durch das Enzym wieder aufgelöst werden kann. Der Übergangszustand zerfällt allerdings auch nach einer gewissen Zeit wieder, oder wird durch die Zugabe von Hydroxylamin (NH₂OH) schnell aufgelöst. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in den untersuchten Zeiträumen zwar sehr unterschiedliche Inhibitionsstärken der *Compounds* gegenüber Serinproteasen gemessen, eine transiente Inhibition konnte aber unter den untersuchten Rahmenbedingungen nicht nachgewiesen werden. Es wäre allerdings an dieser Stelle näher zu untersuchen, ob bei längeren Versuchszeiten eine solche transiente Wirkung nachzuweisen wäre. Für die *Compounds* dieser Klasse lassen sich Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung ziehen. Aufgrund dessen, dass für alle Moleküle dieser Klasse vom gleichen Reaktionsmechanismus ausgegangen wird, muss davon ausgegangen werden, dass die benachbarten funktionellen Gruppen Wechselwirkungen mit den Substratspezifitätstaschen des Enzyms eingehen, ähnlich wie ein physiologisches Substrat der Protease.

So lässt sich erkennen, dass sich eine 3-Phenyl Substitution günstig auf die Spezifität gegenüber humanen HTRA-Proteasen auswirkt, so sind LDC070404 und LDC198173 bis auf den 3-Phenyl/3-Furanyl – Austausch identisch, beide zeigen sehr gute Inhibition von HTRA1, LDC070404 inhibiert aber auch DegS und HTRA2 sehr gut. In den meisten

Molekülen ist ein 5-Methylthioether zu finden, dieser scheint eine wichtige Funktion bei der Wirksamkeit auf HTRA1 einzunehmen. Bei den Molekülen LDC198919, LDC199317/8/9 ist er durch ein Ethyl bzw. Methyl ersetzt und dort zeigt sich keine oder deutlich weniger Wirkung gegenüber HTRA1. Einzig die Kombination aus 3-Phenyl und 5-Ethyl zeigt noch eine Wirkung gegenüber HTRA1. Alle anderen 3-Ethyl/Methyl substituierten Moleküle zeigen dafür eine sehr hohe Spezifität gegenüber DegS, einzig DegP wird noch merkbar inhibiert, dabei scheint es keine Präferenz bei 3-Phenyl oder 3-Furanyl zu geben. Allerdings zeigt die 5-Amin Substitution eine recht hohe Spezifität gegenüber den human HTRA-Proteasen, die bakteriellen Vertreter werden auch inhibiert und die anderen humanen Serinproteasen werden nicht oder in sehr geringem Maße inhibiert.

In weiteren Untersuchungen am LDC zeigten sich für die Vertreter der Klasse A eher größere Probleme bei der Stabilität in wässrigen Lösungen (persönliche Kommunikation), da diese wahrscheinlich auch nach Art einer Ester-Hydrolyse zerfallen. Einzig für *Compounds* mit elektronenschiebenden R3-Substituenten (wie -OCH₃) zeigten sich deutlich bessere Werte in der Stabilität als für *Compounds* mit elektronenziehenden Substituenten (wie etwa Fluor). Einzig für den *Compound* LDC197756 zeigte sich eine sehr gute Wirkung auf HTRA1 und recht hohe Spezifität gegenüber den anderen untersuchten Proteasen, allerdings wurde auch Trypsin noch merklich inhibiert. Der *Compound* LDC198181 ist gegenüber diesem nur durch den 3-Furanyl -> 3-Phenyl Austausch verändert, zeigt allerdings keinerlei Spezifität innerhalb der HTRA-Proteasen mehr. Die höchste Potenz bei der HTRA1-Inhibition zeigte *Compound* LDC198174 mit einer Inhibition von 1 µM HTRA1 im β-Casein-Verdau ab 1,25 µM.

Insgesamt sind sicherlich noch deutlich mehr Rückschlüsse auf die Beziehung zwischen Struktur und Wirkung möglich, aber solange die Stabilität der Moleküle in wässrigen Lösungen nicht gewährleistet ist, ließe sich sicherlich keines der Moleküle medizinisch relevant anwenden, sodass zuerst dieses Problem gelöst werden sollte. Alle bisherigen Anstrengungen die Stabilität entscheidend zu verbessern, wie etwa der Austausch eines Stickstoffes im Triazol, führten zum totalen Verlust der inhibitorischen Wirkung (LDC, persönliche Kommunikation). Auch die Spezifität der *Compounds* dieser Klasse ist nicht völlig überzeugend. Einzig die Moleküle mit 5-Ethyl oder 5-Methyl Substituenten zeigen eine sehr gute Spezifität gegenüber DegS, so kann LDC198919 auch noch bei 5 µM DegS deutlich inhibieren. Auf diesen Ergebnissen aufbauend sollten weitere Untersuchungen folgen. So könnte etwa per *Molecular Docking* der Mechanismus der Bindung dieser Moleküle an DegS aufgeklärt werden. Mit Hilfe der daraus gewonnenen Informationen kann die Spezifität und Bindungsstärke an DegS zielgerichtet weiter verbessert werden. Auch die Stabilität könnte hier weiter adressiert werden, es muss eine gute Möglichkeit gefunden

werden die spezifische Bindung und Reaktion zu erhalten, aber den nukleophilen Angriff von Wasser auf die Bindung weitestgehend zu verhindern.

Compounds anderer Klassen inhibieren HTRA1 eher schlecht

In den anderen Klassen zeigt sich eher ein anderes Bild. Aus Klasse B wurde im Rahmen dieser Arbeit nur ein einziger Vertreter, LDC197757, getestet. Dieser weist zunächst eine recht hohe Ähnlichkeit zu den *Compounds* der Klasse A auf, ist jedoch stark verkleinert. Er zeigt genau die gleiche N-Benzoyl-Bindung, anhand derer er wahrscheinlich auch mit der Protease reagiert, dieser Reaktionsmechanismus wurde allerdings nicht im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen. LDC197757 zeigt eine gute Inhibition von HTRA1 und HTRA2, aber auch HTRA3, DegS und DegP werden merklich inhibiert. Die verringerte Größe könnte einen entscheidenden Vorteil beim Eindringen in Bakterien oder humane Zellen darstellen, zur Stabilität des Moleküls in wässriger Lösung liegen mangels passender Messtechnik keinerlei Daten vor. Insgesamt lassen sich also wenig Aussagen zu dieser *Compound*-Klasse ziehen, aufgrund seiner guten Inhibition der HtrA-Proteasen wäre allerdings eine Untersuchung weiterer Derivate sinnvoll. Auch die Stabilität des Moleküls in wässriger Lösung sollte adressiert werden. Auch wenn keine Messung der Stabilität in der Routine des LDC möglich ist, sollten andere Wege, wie etwa Langzeit-NMR Experimente gewählt werden, um diese für die Wirkstoffentwicklung besonders wichtigen Parameter bestimmen zu können.

Compounds der Klasse C zeigen in unseren orthogonalen Assays keinerlei Inhibition von HTRA1, LDC198179 inhibiert jedoch HTRA2, HTRA3 und DegP. Für alle *Compounds* dieser Klasse zeigt sich recht deutlich eine Beschleunigung des proteolytischen Verdau von RseA durch DegS (Abb. 36). Dabei zeigen sich allen Fällen die typischen Abbauprodukte von RseA (im Gel), allerdings sind auch Proteine oder Proteinkomplexe im höher-molekularen Bereich zu erkennen. Diese Banden könnten auf eine stabile Aggregation von DegS und/oder von DegS und RseA hindeuten, das sollte allerdings noch genauer untersucht werden, etwa durch analytische Gelfiltration und eventuell anschließender Massenspektrometrie der interessanten Fraktionen. So könnte man die Größen der entstandenen Aggregate genauer bestimmen und falls nötig auch die Zusammensetzung genau feststellen. Auf der anderen Seite haben die beiden *Compounds* LDC198178 und LDC198179 Defizite bei der Stabilität in wässrigen Lösungen, selbst in DMSO-*stock*-Lösungen sind die *Compounds* nach zehn Tagen Lagerung nicht mehr nachweisbar (LDC, persönliche Kommunikation). Die beiden Derivate LDC199760 und LDC200455 wurden in Bezug auf ihre Stabilität optimiert, indem die zentrale Dreifachbindung gegen einen Aromaten getauscht wurde. Diese Derivate zeigen zwar keinerlei Inhibition von HTRA1 mehr (LDC), aber die gleiche deutliche Aktivierung von DegS. Weil alle *Compounds* dieser Klasse aufgrund der höher-molekularen Proteine oder Proteinkomplexe (im Gel) allerdings

eher auf einen unspezifischen Wirkmechanismus gegenüber DegS hindeuten, wurden sie zunächst nicht in die genaueren Untersuchungen zu DegS-Aktivatoren (siehe Abschnitt 4.4) aufgenommen. Eine weitere Betrachtung wäre aber im akademischen Sinne durchaus lohnenswert, da sie evtl. neue Mechanismen der allosterischen Regulation von DegS aufzeigen könnten. Die Entwicklung weiterer Derivate am LDC wurde aufgrund der geringen Stabilität in wässriger Lösung und der nicht vorhandenen Variabilität der Verbindungen eingestellt.

Für die Klassen D und E zeigte sich in den orthogonalen Assays zunächst keinerlei Inhibition von HTRA1 oder einer anderen untersuchten Serinprotease, mit Ausnahme einer sehr leichten Inhibition von DegS durch *Compounds* der Klasse E. Aufgrund dessen, dass *Compounds* der Klasse D am LDC eine überragende Selektivität gegenüber HTRA1 und eine hohe Variabilität zeigten, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Tests durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass diese Moleküle zwar den Verdau von β -Casein durch HTRA1 nicht inhibieren können, dafür aber den Verdau von RseA durch HTRA1. Diese Reaktion entspricht auch dem im HTS am LDC angewandten Versuchsaufbau. Diese Ergebnisse bestätigen zumindest, dass die Ergebnisse des HTS durch unser orthogonales Assay reproduzierbar sind. Diese Erkenntnisse könnten außerdem darauf hindeuten, dass es sich bei β -Casein nicht unbedingt um ein geeignetes Substrat für den Test von Inhibitoren handelt. Es ist möglich, dass β -Casein ein zu gutes Substrat für diese Art von Tests darstellt und die untersuchte Protease nur durch bestimmte Gruppen von Inhibitoren überhaupt noch gehemmt werden kann. Dabei bleibt außer Acht, dass der Verdau des physiologischen Substrates vielleicht ganz anderen Parametern untergeordnet ist und Inhibition durch einen *Compound* möglich wäre, auch wenn diese bei dem Verdau von β -Casein nicht zu beobachten ist. Es bleibt also festzuhalten, dass der Test eines potentiellen Inhibitors (oder Aktivators) möglichst nicht mit dem besten Substrat durchgeführt werden sollte, sondern mit dem Substrat, welches dem physiologisch relevanten Substrat möglichst nahekommt, im Idealfall natürlich genau dem physiologischen Substrat. So sollte auch der Test von Derivaten der Klasse E anderen Substraten wiederholt werden, um die Wirkung und Kontinuität der Assays zu bestätigen. Dafür wäre RseA aufgrund seiner geordneten Struktur sicherlich ein Schritt in die richtige Richtung, eines der physiologischen Substrate, wie etwa Tau, aber sicherlich am besten geeignet. Es ist möglich, dass sich bei Durchführung aller Tests mit physiologisch relevanteren Substraten ein anderes Bild zeigen würde.

Der Reaktionsmechanismus von *Compounds* der Klassen, C, D und E bleibt weiterhin ungeklärt, der von Klasse B wird bisher nur vermutet und sollte bestätigt werden. Bei genauer Betrachtung durch Medizinal-Chemiker (Gerd Rüther, LDC; Markus Kaiser, ZMB Essen) wurden auch mögliche (kovalente) Reaktionsmechanismen für *Compounds* der

Klassen D und E vorgeschlagen, die es per Massenspektrometrie zu überprüfen gilt. Auf Grundlage von bestätigten Reaktionsmechanismen und *Molecular Docking* Experimenten könnten auch diese *Compounds* zielgerichtet zu potenten Inhibitoren von Proteasen der HTRA-Familie weiterentwickelt werden.

Compounds der Klasse A gehen eine kovalente Bindung mit dem active-site Serin ein

Zur Aufklärung des postulierten Reaktionsmechanismus von *Compounds* der Klasse A wurden massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. In der Literatur wurden zu sehr ähnlichen 1,2,4-Triazolen und Serinproteasen wie Kallikrein Wirkungsmechanismen und deren chemische Umkehrung erwähnt (Adibekian et al. 2011; Tan et al. 2013). Die Reaktivität dieser Klasse von Molekülen beruht auf dem Elektronenpaar, welches sowohl in die Amid-Bindung als auch in das quasi-aromatische System des Triazols eingebunden ist (Koistinen et al. 2008) und wurde schon 2008 durch Koistinen et al. in einem Hochdurchsatzscreen als peptidomimetisches, inhibitorisches Substrat gefunden und seitdem vielfach weiterentwickelt. Mittlerweile sind *Compounds* dieser Klasse in klinischen Tests als Medikamente gegen Krebs durch die Inhibition von Methionin Aminopeptidasen des Typs II (Hou et al. 2011) und gegen Alzheimer durch Inhibition von β -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) (Monceaux et al. 2011), weitere Wirkungen wurden ebenfalls schon beschrieben (Kharb et al. 2011).

Zur Bestätigung des postulierten Reaktionsmechanismus für *Compounds* der Klasse A wurde die Modifikation durch den beschriebenen Rest (Abb. 42) an tryptischen Peptiden von DegS nach gemeinsamer Inkubation des *Compounds* und des Enzyms nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die Modifikation zu einem sehr großen Anteil (etwa 99 % der gefundenen Modifikationen) am *active-site* Serin S201 stattgefunden hat. Somit konnte der Reaktionsmechanismus für DegS nachgewiesen werden, für die anderen HtrA-Proteasen wird vom gleichen Reaktionsmechanismus ausgegangen. Wie oben bereits beschrieben sollten nun *Molecular Docking* Experimente den genaueren Mechanismus und die Koordination des (noch) vollständigen Moleküls im Enzym, sowie die Interaktionen der *Compound*-Seitengruppen mit Substratspezifitätstaschen aufklären. Diese wichtigen strukturellen Daten können einen Weg zum zielgerichteten Design spezifischerer und potenterer Derivate zeigen.

5.3 Aktivierung von DegS/Aktivierung der Autoproteolyse von HTRA1

Ein Aktivator für DegS aus dem HTRA1-Inhibitorscreen

Die Entdeckung der *Compound*-Klasse um LDC054905 beruht auf der systematischen Untersuchung aller Moleküle, die im HTRA1-Inhibitorscreen eine Wirkung auf den proteolytischen Verdau von doppelt gelabeltem RseA durch HTRA1 zeigten. Da der *Compound* auch auf seine Wirkung gegenüber DegS getestet wurde, zeigte sich schnell ein unerwartetes Ergebnis, RseA wurde durch DegS deutlich schneller verdaut, wenn auch *Compound* LDC054905 anwesend war (Abb. 43). Die anderen *Compounds*, die auf gleiche Weise auffielen, zeigten auch diese Wirkung, allerdings in deutlich schwächerer Ausprägung, deshalb lag der Fokus weiterhin auf LDC054905. Während in der Kontrolle ein vollständiger Verdau von 10 μM RseA durch 5 μM DegS nach etwa 40 Minuten zum ersten Mal vorlag, war dies bei Anwesenheit von 50 μM LDC054905 schon nach zehn Minuten der Fall, es handelt sich also um eine etwa vierfache Beschleunigung des Verdau.

Katalytische Aktivierung von DegS

Um genau festlegen zu können, ob es an der proteolytischen Aktivität von DegS oder an der internen Stabilität von RseA liegt, wurden auch alle Komponenten einzeln mit LDC054905 inkubiert und ihre Stabilität kontrolliert (Abb. 46). Wie sich zeigte, wiesen alle Komponenten einzeln die gleiche (hohe) Stabilität auf, egal ob sie mit oder ohne LDC054905 inkubiert wurden. Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass tatsächlich die katalytische Aktivität von DegS beeinflusst wird. Dafür spricht auch, dass die homologe Protease HTRA1 ebenfalls durch den *Compound* beeinflusst wird, initial aufgefallen war ein verringerter Abbau von RseA im *Screening*. Bei genauerer Betrachtung der Wirkung in einem orthogonalem Assay (Abb. 47) wird deutlich, dass der Abbau von RseA durch HTRA1 tatsächlich stark verlangsamt wird. Dafür nimmt aber die Intensität der HTRA1-Bande deutlich ab, diese Beobachtung kann auch gemacht werden, wenn nur HTRA1 und LDC054905 zusammen inkubiert werden. Zwar gibt es auch eine leichte Autoproteolyse von HTRA1, diese ist in dem Fall ohne LDC054905 jedoch deutlich geringer (siehe Anhang). Eine Überprüfung weiterer Proteasen aus der HtrA-Familie (DegP) und katalytisch verwandter Serinproteasen (Elastase, Trypsin und Chymotrypsin) verlief ohne Ergebnisse, keine dieser Proteasen wurde durch LDC054905 nennenswert beeinflusst. Eine PDZ-lose Variante von DegS wurde ebenfalls leicht aktiviert, die basale Aktivität (ohne Aktivatorpeptid) von DegS wurde gesteigert.

Eine Vermutung könnte also zunächst sein, dass die sehr rigide Spezifität der beiden Proteasen für ihre Substrate (vor von allem DegS) durch die Zugabe von LDC054905

teilweise verloren geht. Es ist einfach, sich vorzustellen, dass geringere Hürden für das Substrat das katalytische Zentrum zu erreichen auch einen höheren Substrat-Umsatz bedeuten können. Diese Veränderung würde sich dann bei DegS vor allem durch die erhöhte katalytische Aktivität bemerkbar machen, bei HTRA1 ginge nach diesem Modell die Substratspezifität soweit verloren, dass das nächste verfügbare Protein, HTRA1 selbst, verdaut würde. Für dieses Modell müsste angenommen werden, dass der *Compound* Veränderungen in der Nähe des aktiven Zentrums vornimmt, an den Bindungstaschen, die für die Substratspezifität verantwortlich sind. Dafür spräche auch, dass eine Aktivierung des PDZ-losen DegS möglich ist, welches sonst in seiner Regulation sehr eingeschränkt ist, hier fehlenden die inhibitorischen Kontakte zwischen PDZ- und Proteasedomäne. Außerdem fehlt die Bindestelle für einen Aktivator, welcher die Lage von Loop L3 und sukzessive dem Rest der Aktivierungsdomäne beeinflussen könnte.

Eine weitere Beobachtung spricht allerdings gegen die These, LDC054905 würde an den Substratbindungstaschen Einfluss nehmen. Es zeigte sich, dass das für DegS verwendete Aktivatorpeptid die Auswirkung des verwendeten Aktivator-*Compounds* (mehrere Derivate wurden bestellt und getestet) auf die katalytische Aktivität von DegS stark verändert (Tab. 18). So kann etwa der *Compound* ChemDiv #3470-5592 bei der Verwendung des FFF-Aktivatorpeptides kaum Wirkung zeigen (1,86 x kürzere Halbwertszeit von RseA), allerdings ist die Wirkung bei der Benutzung des C-Terminus von OmpC (IVALGLVYQF) deutlich verstärkt (4,6 x). Die höchste erreichte Steigerung der Aktivität (gemessen als Halbwertszeit von RseA) beträgt einen Faktor von 7,31 für die Kombination aus ChemDiv #3470-5614 und dem Peptid ITTAGLKYTF. Auch für HTRA1 zeigten sich Unterschiede bei der Wirkung der Derivate von LDC054905, die über eine normale Struktur-Wirkungs-Beziehung hinauszugehen scheinen. So zeigte etwa der *Compound* ChemDiv #3470-5592 ab einer Konzentration von 15 μ M eine komplette Inhibition des RseA-Verdau durch HTRA1, jedoch ohne eine Autoproteolyse von HTRA1 zu initiieren (Tab. 19 und Abb. 47).

An dieser Stelle sollten zukünftige Experimente ansetzen, um eine mögliche Inhibition von HTRA1 durch diese *Compound* - Klasse weiter zu testen und zu verbessern. Neben der vielleicht veränderten Bindung an HTRA1 (Massenspektrometrie, evtl. NMR) sollten hier weitere Derivate untersucht werden. Es wäre außerdem sinnvoll weitere pharmakologische Parameter dieses *Compounds* (Toxizität, Membrangängigkeit, Stabilität, usw.) zu bestimmen um herauszufinden, ob eine Weiterentwicklung dieses Moleküls generell zielführend wäre.

Modifikation von Lysin in DegS und HTRA1

Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten *Compounds* in wässrigen Puffern und nach Lagerung in DMSO zunächst stabil sind (Abb. 49). Jedoch nach längerer Lagerung in dem wässrigen System ist die entsprechende Masse per LC-MS nicht mehr nachweisbar.

Dafür entstanden neue prominente Peaks, welche nach Rücksprache mit Markus Kaiser einer Hydrolyse des Moleküls nach Art einer Ester-Hydrolyse mit Wasser als angreifendem Nukleophil entstanden seien könnten. Beim Vergleich des postulierten Mechanismus (Abb. 50) und den gefundenen Massen wird deutlich, dass aller Wahrscheinlichkeit nach genau diese Reaktion abläuft, alle entsprechenden (theoretischen) Massen konnten gefunden werden.

Bei Kontakt mit einem Protein könnte eine ähnliche Reaktion ablaufen, dabei wäre das angreifende Nukleophil jedoch in der Seitengruppe einer Aminosäure zu suchen. Dabei müsste es zu einer kovalenten Modifikation des Proteins durch die dargestellte Abgangsgruppe (Abb. 52) kommen. Aus chemischer Sicht kämen dazu die nukleophilen Aminosäuren Serin, Threonin, Tyrosin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Lysin in Betracht, die stärksten nukleophilen Eigenschaften werden allerdings Lysin zugesprochen. Bei der massenspektrometrischen Untersuchung von DegS und HTRA1, welche durch Inkubation mit 50 μM ChemDiv #3470-5614 modifiziert wurden, konnte genau diese Vermutung bestätigt werden. In DegS wurden drei Lysine und ein Serin modifiziert. In HTRA1 wurden deutlich mehr Modifikationen gefunden, nach Anwendung zweier Such- und Bewertungsalgorithmen wurden 13 modifizierte Lysine positiv bewertet. Eine Betrachtung der Modifikationen zeigt, dass kein einfaches Muster an Modifikation vorliegt, welches die beobachtete Wirkung der Moleküle direkt aufzeigen könnte. Im Falle von HTRA1 liegen vor allem Modifikationen in Bereichen vor, die den HTRA1 Protomeren normalerweise zur Oligomerisierung dienen. Die drei Hauptakteure Tyr169, Phe171 und Phe278 gehen dabei *ring-stacking* Interaktionen ein (Truebestein et al. 2011) und stabilisieren die Interaktion zweier Protomere so. Direkt betroffen von einer Modifikation ist keiner dieser wichtigen Reste, mit der Modifikation von Lys168 und Lys178 sind allerdings benachbarte Reste betroffen. Es ist möglich, dass die Modifikation eines (recht langen) Lysinrestes Einfluss auf das gesamte Kräftegefüge in der Nachbarschaft haben könnte und somit auch die Interaktion zweier HTRA1-Protomere stört. Die Veränderung von katalytischer Aktivität oder Substratspezifität lässt sich allerdings nicht direkt erklären, Hinweise auf den Zusammenhang von Oligomerisierungs-Fähigkeit und Substratspezifität finden sich in der Literatur nicht. Andere modifizierte Lysine (K243, K248) befinden sich in der Nähe zu Asp250 (katalytische Triade) und könnten hier eventuell die Aktivität beeinflussen. Das modifizierte Lysin an Position 305 ist Bestandteil des Loop L3 und damit auch der Aktivierungsdomäne, diese muss einige Änderungen durchlaufen, um das inaktive HTRA1 in den aktiven Zustand zu überführen. Insgesamt spricht man von einem *disorder-to-order* Übergang (Truebestein et al. 2011), welcher die Aktivierung ausmacht. Es ist vorstellbar, dass die Modifikation eines an der Aktivierung beteiligten Loops den beschriebenen Prozess auf eine bisher nicht bestimmte Art beeinflusst und so auch Einfluss auf die

gesamte Aktivierung und Substratspezifität nimmt. Der Einfluss dieses *disorder-to-order* Übergangs auf die Ausbildung eines funktionalen *oxyanion-hole* und einer voll ausgebildeten S1-Substrattasche ist beschrieben (Truebestein et al. 2011). Vor allem in Bezug auf ChemDiv #3470-5592 und seine Wirkung auf HTRA1 sollten dringend mehr Experimente durchgeführt werden. So könnte schon eine Titration des *Compounds* in weiteren massenspektrometrischen Experimenten Aufschluss darüber geben, welche der gefundenen Bindestellen wirklich relevant sind, und welche nur bei einem starken Überfluss des *Compounds* abgesättigt werden. Mit einer reduzierten Anzahl eventuell relevanter Bindestellen könnten Experimente mit Punktmutationen von HTRA1 dabei helfen, diejenige Bindestelle zu identifizieren, die für den beobachteten Effekt verantwortlich ist. Wird diese modifiziert, würde kein Effekt des Moleküls auf HTRA1 mehr erwartet werden. Unter Zuhilfenahme dieser Informationen und eines zielgerichteten *Molecular Docking* Experimentes könnte der genaue Binde- und Wirkungsmodus des Moleküls bestimmt werden. Dieser kann bei der Entwicklung eines spezifischen Inhibitors auf der Grundlage von ChemDiv #3470-5592 helfen.

Bei DegS liegen insgesamt deutlich weniger Modifikationen vor. Von acht Lysinen, die in der untersuchten Variante von DegS vorkommen, wurden drei modifiziert (K95, K243 und K247), ebenso wurde ein Serin modifiziert (S70). Das modifizierte Serin liegt in Loop LA von DegS und gehört damit auch zur Aktivierungsdomäne, eine Modifikation hier könnte auch Folgen für die Aktivierung von DegS haben. Allerdings sind bisher keine Veränderungen in Loop LA beschrieben worden. In DegS ist der Loop LA deutlich kürzer als in homologen Proteasen wie AlgW (Cezairliyan & Sauer 2009) und DegP (Krojer et al. 2002), dort hat LA eine inhibitorische Wirkung indem er den Eingang zum aktiven Zentrum in inaktiven Zustand versperrt. Nichtsdestotrotz wird der Loop LA auch bei DegS zur Aktivierungsdomäne gezählt. So wäre es möglich, dass LA auch in DegS homologe Funktionen (in vermindertem Umfang) erfüllt und die entsprechende Modifikation auf diese Weise Auswirkungen auf die Aktivität von DegS haben, also durch den Zugang zum aktiven Zentrum. Lys95 liegt direkt neben His96, welches ein Bestandteil der katalytischen Triade ist, hier kann man sich sehr einfach vorstellen, dass eine Modifikation an dieser Stelle einen direkten Einfluss auf die katalytische Aktivität haben kann. So könnte etwa die Positionierung von His96 im Raum verändert werden, oder aber die Modifikation wirkt sich auf das gesamte elektrostatische Kräftegleichgewicht in dieser Region aus. Die S1-Spezifitätstasche, die besonders wichtig für die Substratspezifität ist und aus Ile196, Leu218 und Ser219 besteht, ist nicht direkt betroffen (Wilken et al. 2004; Zeth 2004; Sohn et al. 2009). Dieser Befund macht eine frühere Vermutungen, dass die Substratspezifität

von DegS durch die Modifikation stark verändert wird und daraus auch die erhöhte katalytische Aktivität folgt, deutlich unwahrscheinlicher.

Die beiden anderen Modifikationen in DegS, K243 und K247, erscheinen aber besonders interessant. Für K243 ist eine wichtige Interaktion in Form einer Salzbrücke zu E324 beschrieben (Wilken et al. 2004; Zeth 2004), diese sorgt neben anderen Interaktionen in dieser Region wie D122-R256 und R178-E317/D320 für eine starre Verbindung von PDZ- und Proteasedomäne. Es handelt sich vornehmlich um inhibitorische Verbindungen, die vor allem zur Stabilisierung der inaktiven Konformation von DegS wichtig sind. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt (Tab. 10), zeichnen sich Mutationen an K243 und D320 durch eine stark erhöhte Basalaktivität aus, die auf dem Fehlen der inhibitorischen Interaktion beruht. Eine Mutation an R178 zieht den kompletten Verlust der katalytischen Aktivität von DegS nach sich. Die Unterbrechung der Interaktion D122-R256 durch Mutation verringert zwar die Gesamtaktivität, erhöht jedoch nicht die Basalaktivität von DegS. Die Basalaktivität einer K243D Mutation (Tab. 10; ohne Abbildung) zeigte sich leicht erhöht gegenüber dem wildtypischen DegS, ähnlich derer, die für wildtypisches DegS mit *Compounds* der LDC054905-Klasse gezeigt werden konnte (Abb. 43).

In einer Struktur (1SOT, inaktiver Zustand) lässt sich mit der Software PyMol ein Abstand K243-E324 von 5,3 Å messen, der Abstand für K247-E324 beträgt sogar weniger, nur 3,3 Å. Obwohl die inhibitorische Interaktion für K243-E324 beschrieben ist (Sohn & Sauer 2009; Sohn et al. 2007), gibt es keinerlei Hinweise in der Literatur auf eine Interaktion zwischen K247 und E324, obwohl diese aufgrund der hier gezeigten Messungen (Abb. 55) zumindest auch sehr wahrscheinlich scheint. Es ist sehr gut vorstellbar, dass beide Lysine Interaktionen mit E324 ausbilden können und so einen Einfluss auf die inhibitorische Fixierung der PDZ-Domäne nehmen.

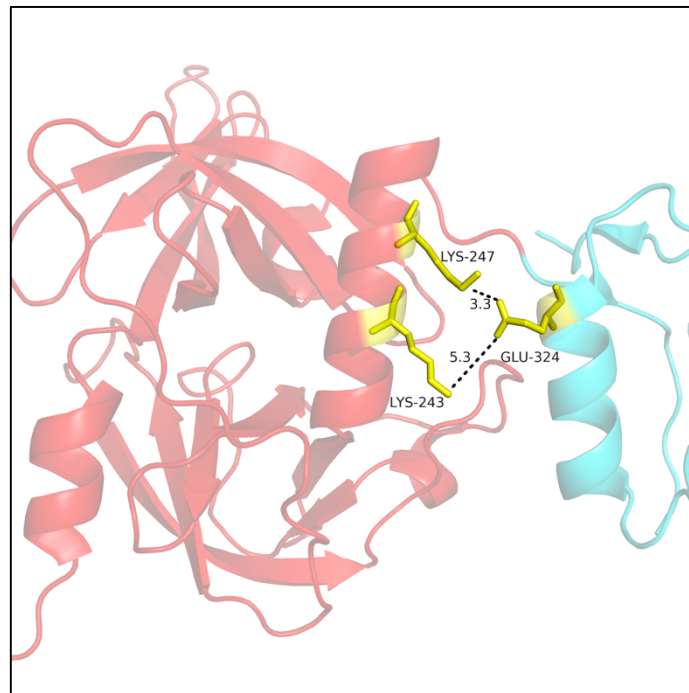


Abb. 55: Darstellung K243 und K247 mit Kontakt zu E324 im inaktiven DegS.

Darstellung basierend auf Struktur des inaktiven DegS (PDB-Eintrag:1SOT, (Wilken et al. 2004)), die Proteasedomäne ist in rot dargestellt, die PDZ-Domäne in cyan, die Positionen K243, K247 sowie E324 in sticks Darstellung in gelb mit Beschriftung. Die gestrichelten Linien mit Zahl entsprechend der Abstandsmessung zwischen den verbundenen Atomen, Angabe in Å.

Aussicht DegS-Aktivierung und HTRA1-Inhibition

Es wird deutlich, dass besonders zu diesem Unterthema noch recht viele Daten fehlen um bessere Vermutungen zum Reaktions- und Wirkungsmechanismus dieser *Compound*-Klasse abgeben zu können. Zum einen sind für eine wirkliche Struktur-Wirkungs-Beziehung bisher deutlich zu wenige Derivate dieser Klasse untersucht worden. Hier sollte noch die Untersuchung andere Derivate erfolgen, von der Firma ChemDiv wären dazu noch 16 weitere Derivate mit einer Ähnlichkeit >0,8 käuflich erhältlich. Für den Fall von HTRA1 sollten weitere Untersuchungen zur Autoproteolyse durchgeführt werden. Dieser wurde bisher auf Grund des abnehmenden Gehaltes an nativen HTRA1-Monomeren im Gel ohne sichtbare Aggregation o. Ä immer nur angenommen. Die Autoproteolyse könnte zum Beispiel per Massenspektrometrie nachgewiesen werden, die Untersuchung der wahrscheinlich entstandenen Fragmente könnte außerdem Hinweise auf den unterliegenden Reaktionsmechanismus geben. Auch ein Vergleich der entstandenen Proteolyseprodukte bei Zugabe eines *Compounds* und den Bestandteilen der Probe nach Zugabe des *Compounds* ChemDiv #3470-5592 wäre ein wichtiger Schritt um feststellen zu können, ob dieses spezielle Molekül wirklich nicht auch zu einer Autoproteolyse von HTRA1 führt. Zum anderen sollte die Aufklärung des Wirkungsmechanismus weiter vorangetrieben werden. Dazu wäre im Fall beider Proteine wichtig, die Modifikation mit anschließender Massenspektrometrie mit geringeren Konzentrationen der *Compounds* durchzuführen, um

erkennen zu können, welche der gefundenen Modifikationen besonders wichtig sind und welche nur bei einer Sättigung des *Compounds* hinzukommen. Im Falle von DegS wäre es auch sinnvoll die beiden Lysine K243 und K247 zu verschiedenen Aminosäuren zu mutieren und die entstandenen Mutanten in *in-vitro* Experimenten genauer zu charakterisieren. So könnte zum Einem gezeigt werden, ob tatsächlich auch K247 an inhibitorischen Kontakten mit E324 beteiligt ist und ob tatsächlich die Modifikation dieser Aminosäuren die entscheidende Wirkung dieser *Compounds* auf DegS ausmacht. Da der *Compound* chemisch gesehen nicht in der Lage sein sollte ein Alanin zu modifizieren, könnten durch Experimente mit den entsprechenden Varianten von DegS einzelne Mechanismen ausgeschlossen werden. Um derartige Mutanten-Experimente bei HTRA1 durchführen zu können, sollte zuerst die wichtigsten Modifikationspunkte bestimmt werden.

Neben all diesen praktischen Methoden wäre es auch sinnvoll durch *in-silico* Experimente, wie *Modelling* und *Molecular Docking* den Bindungsmechanismus und -ort genauer zu charakterisieren. Mit diesen Erkenntnissen könnten viele Aussagen über die Auswirkungen der Modifikationen getroffen werden. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf der gezielten Weiterentwicklung der *Compounds*. So ist bereits für *Compound* ChemDiv #3470-5592 eine starke inhibitorische Wirkung auf HTRA1 zu erkennen, ohne dass es zu einer sichtbaren Autoproteolyse der Protease kommt. Von dieser Erkenntnis aus, lassen sich noch weitere Verbesserungen, bis hin zu einem potenten Inhibitor von HTRA1, entwickeln. Dazu könnte das Bindungsmotiv für die spezifische Position genutzt werden, es müsste allerdings eine Entwicklung weg von der Modifikation fast sämtlicher Lysine angestrebt werden. Für DegS macht die Entwicklung eines potenten Aktivators keinen Sinn, die Aufklärung des unterliegenden Mechanismus kann aber ein entscheidendes Verständnis der regulatorischen Prozesse innerhalb des Proteins bedeuten und so auch die (Grundlagen-)Forschung in diesem Bereich deutlich beeinflussen.

6. Referenzen

- Ades, S.E. et al., 1999. The Escherichia coli sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes & Development*, 13(18), pp.2449–2461.
- Adibekian, A. et al., 2011. Click-generated triazole ureas as ultrapotent in vivo-active serine hydrolase inhibitors. *Nature Chemical Biology*, 7(7), pp.469–478.
- Ajayi, F. et al., 2008. Elevated expression of serine protease HtrA1 in preeclampsia and its role in trophoblast cell migration and invasion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199(5), pp.557
- Alba, B.M. et al., 2002. DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the σ^E -dependent extracytoplasmic stress response. *Genes & Development*, 16(16), pp.2156–2168.
- Allsop, A.E., 1998. New antibiotic discovery, novel screens, novel targets and impact of microbial genomics. *Current Opinion in Microbiology*, 1(5), pp.530–534.
- Amann, E., Ochs, B. & Abel, K.J., 1988. Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in Escherichia coli. *Gene*, 69(2), pp.301–315.
- An, E. et al., 2010. Identification of novel substrates for the serine protease HTRA1 in the human RPE secretome. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(7), pp.3379–3386.
- Anon, 1987. Erratum. *Analytical Biochemistry*, 163(1), p.279.
- Attebo, K., Mitchell, P. & Smith, W., 1996. Visual acuity and the causes of visual loss in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*, 103(3), pp.357–364.
- Baldi, A. et al., 2002. The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene*, 21(43), pp.6684–6688.
- Barker, J.J., 2006. Antibacterial drug discovery and structure-based design. *Drug Discovery Today*, 11(9-10), pp.391–404.
- Beleford, D., Rattan, R., et al., 2010. High temperature requirement A3 (HtrA3) promotes etoposide- and cisplatin-induced cytotoxicity in lung cancer cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(16), pp.12011–12027.
- Beleford, D., Liu, Z., et al., 2010. Methylation induced gene silencing of HtrA3 in smoking-related lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(2), pp.398–409.
- Blair, J.M.A., Richmond, G.E. & Piddock, L.J. V, 2014. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 9(10), pp.1165–1177.
- Bosch, F. & Rosich, L., 2008. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology*, 82(3), pp.171–179.
- Boucher, H.W. et al., 2013. 10 x '20 Progress--development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(12), pp.1685–1694.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp.248–254.

- Brötz-Oesterhelt, H., Bandow, J.E. & Labischinski, H., Bacterial proteomics and its role in antibacterial drug discovery. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(4), pp.549–565.
- Brown, M.S. et al., 2000. Regulated Intramembrane Proteolysis. *Cell*, 100(4), pp.391–398.
- Brown, R.N. & Gulig, P.A., 2009. Roles of RseB, σ^E , and DegP in virulence and phase variation of colony morphotype of *Vibrio vulnificus*. *Infection & Immunity*, 77(9), pp.3768–3781.
- Bryan, L.E., 1989. Two forms of antimicrobial resistance: bacterial persistence and positive function resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 23(6), pp.817–820.
- Campioni, M. et al., 2010. The serine protease HtrA1 specifically interacts and degrades the tuberous sclerosis complex 2 protein. *Molecular Cancer Research : MCR*, 8(9), pp.1248–1260.
- Casadaban, M.J. & Cohen, S.N., 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 138(2), pp.179–207.
- Cassell, G.H. & Mekalanos, J., 2001. Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. *Journal of the American Medical Association*, 285(5), pp.601–605.
- Cezairliyan, B.O. & Sauer, R.T., 2009. Control of *Pseudomonas aeruginosa* AlgW protease cleavage of MucA by peptide signals and MucB. *Molecular Microbiology*, 72(2), pp.368–379.
- Chaba, R. et al., 2011. Signal integration by DegS and RseB governs the σ^E -mediated envelope stress response in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 108(5), pp.2106–2111.
- Chien, J., Campioni, M., et al., 2009. HtrA serine proteases as potential therapeutic targets in cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 9(4), pp.451–468.
- Chien, J., Ota, T., et al., 2009. Serine protease HtrA1 associates with microtubules and inhibits cell migration. *Molecular and Cellular Biology*, 29(15), pp.4177–4187.
- Chien, J. et al., 2006. Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7), pp.1994–2004.
- Clausen, T. et al., 2011. HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nature reviews: Molecular Cell Biology*, 12(3), pp.152–162.
- Clausen, T., Southan, C. & Ehrmann, M., 2002. The HtrA Family of Proteases: Implications for Protein Composition and Cell Fate. *Molecular Cell*, 10(3), pp.443–455.
- Coates, A. & Hu, Y., 2014. Conventional Antibiotics - Revitalized by New Agents. In D. A. Phoenix, F. Harris, & S. R. Dennison, eds. *Novel Antimicrobial Agents and Strategies*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 17–30.
- Cohen, S., 1977. A strategy for the chemotherapy of infectious disease. *Science*, 197(4302), pp.431–432.
- Cox, J. et al., 2011. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of Proteome Research*, 10(4), pp.1794–1805.
- Cox, J. & Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26(12), pp.1367–1372.
- D'Costa, V.M., Griffiths, E. & Wright, G.D., 2007. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Current Opinion in Microbiology*, 10(5), pp.481–489.

- Dartigalongue, C., Missiakas, D. & Raina, S., 2001. Characterization of the Escherichia coli sigma E regulon. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(24), pp.20866–20875.
- Davies, J., 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264(5157), pp.375–382.
- Debono, M. et al., 1987. A21978C, a complex of new acidic peptide antibiotics: isolation, chemistry, and mass spectral structure elucidation. *The Journal of Antibiotics*, 40(6), pp.761–777.
- Dodson, G. & Wlodawer, A., 1998. Catalytic triads and their relatives. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(9), pp.347–352.
- Dorovska, V.N. et al., 1972. The influence of the geometric properties of the active centre on the specificity of -chymotrypsin catalysis. *Federation of European Biochemical Societies letters*, 23(1), pp.122–124.
- Ehrlich, P. & Bertheim, A., 1912. Über das salzsaure 3.3'-Diamino-4.4'-dioxy-arsenobenzol und seine nächsten Verwandten. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 45(1), pp.756–766.
- Ehrmann, M. & Clausen, T., 2004. Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annual Reviews of Genetics*, 38, pp.709–724.
- Fischbach, M.A. & Walsh, C.T., 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 325(5944), pp.1089–1093.
- Fleming, A., Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae by Alexander Fleming, Reprinted from the British Journal of Experimental Pathology 10:226-236,. *Reviews of Infectious Diseases*, 2(1), pp.129–139.
- Flynn, J.M. et al., 2004. Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. *Genes & Development*, 18(18), pp.2292–2301.
- Forrest, R.D., 1982. Early history of wound treatment. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 75(3), pp.198–205.
- Gandour, R.D., 1981. On the importance of orientation in general base catalysis by carboxylate. *Bioorganic Chemistry*, 10(2), pp.169–176.
- Gandour, R.D., Nabulsi, N.A.R. & Fronczek, F.R., 1990. A structural model of a short carboxyl-imidazole hydrogen bond with a nearly centrally located proton: implications for the Asp-His dyad in serine proteases. *Journal of the American Chemical Society*, 112(21), pp.7816–7817.
- Gottesman, S., 2003. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, pp.565–587.
- Grau, S. et al., 2005. Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(17), pp.6021–6026.
- Grau, S. et al., 2006. The role of human HtrA1 in arthritic disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(10), pp.6124–6129.
- Gray, C.W. et al., 2000. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *European Journal of Biochemistry*, 267(18), pp.5699–5710.
- Hamilton-Miller, J.M.T., 1990. The emergence of antibiotic resistance: Myths and facts in clinical practice. *Intensive Care Medicine*, 16(S3), pp.206–211.

- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), pp.557–580.
- Hasenbein, S. et al., 2010. Conversion of a Regulatory into a Degradative Protease. *Journal of Molecular Biology*, 397(4), pp.957–966.
- Hasselblatt, H. et al., 2007. Regulation of the σ^E stress response by DegS: how the PDZ domain keeps the protease inactive in the resting state and allows integration of different OMP-derived stress signals upon folding stress. *Genes & Development*, 21(20), pp.2659–2670.
- Hedstrom, L., 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), pp.4501–4523.
- Henderson, R., 1970. Structure of crystalline alpha-chymotrypsin. IV. The structure of indoleacryloyl-alpha-chymotrypsin and its relevance to the hydrolytic mechanism of the enzyme. *Journal of Molecular Biology*, 54(2), pp.341–354.
- Hou, J., Clemmons, D.R. & Smeekens, S., 2005. Expression and characterization of a serine protease that preferentially cleaves insulin-like growth factor binding protein-5. *Journal of Cellular Biochemistry*, 94(3), pp.470–484.
- Hou, Y.-P. et al., 2011. Synthesis and antitumor activity of 1,2,4-triazoles having 1,4-benzodioxan fragment as a novel class of potent methionine aminopeptidase type II inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(20), pp.5948–5954.
- Huber, R. et al., 1974. Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 89(1), pp.73–101.
- Huber, R. & Bode, W., 1978. Structural basis of the activation and action of trypsin. *Accounts of Chemical Research*, 11(3), pp.114–122.
- Huesgen, P.F., Schuhmann, H. & Adamska, I., 2009. Deg/HtrA proteases as components of a network for photosystem II quality control in chloroplasts and cyanobacteria. *Research In Microbiology*, 160(9), pp.726–732.
- Hughes, D., 2003. Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. *Nature Reviews: Genetics*, 4(6), pp.432–441.
- Huttunen, H.J. et al., 2007. HtrA2 regulates beta-amyloid precursor protein (APP) metabolism through endoplasmic reticulum-associated degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(38), pp.28285–28295.
- Infectious National Institute of Allergy and Diseases, 2014. NIAID 's Antibacterial Resistance Program : Current Status and Future Directions.
- Iwanczyk, J. et al., 2007. Role of the PDZ domains in *Escherichia coli* DegP protein. *Journal of Bacteriology*, 189(8), pp.3176–3186.
- Johansen, J. et al., 2006. Conserved small non-coding RNAs that belong to the σ^E regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins. *Journal of Molecular Biology*, 364(1), pp.1–8.
- Kanehara, K., Ito, K. & Akiyama, Y., 2002. YaeL (EcfE) activates the sigma(E) pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti-sigma(E), RseA. *Genes & Development*, 16(16), pp.2147–2155.
- Kerényi, L. & Gallyas, F., 1973. [Errors in quantitative estimations on agar electrophoresis using silver stain]. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 47(3), pp.425–436.

- Kharb, R., Sharma, P.C. & Yar, M.S., 2011. Pharmacological significance of triazole scaffold. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*.
- Kirby, W.M., 1944. Extraction of a Highly Potent Penicillin Inactivator From Penicillin Resistant Staphylococci. *Science*, 99(2579), pp.452–453.
- Kitamoto, O., N. Kasai, K.F. and A.K., 1956. Drug sensitivity of the Shigella strains isolated in 1955. *Journal of the Japanese Association of Infectious Diseases*, (30), pp.403–404.
- Koistinen, H. et al., 2008. Novel small molecule inhibitors for prostate-specific antigen. *The Prostate*, 68(11), pp.1143–1151.
- Kolmar, H., Waller, P.R. & Sauer, R.T., 1996. The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *Journal of Bacteriology*, 178(20), pp.5925–5929.
- Krojer, T. et al., 2002. Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature*, 416(6879), pp.455–459.
- Krojer, T. et al., 2008. Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature*, 453(7197), pp.885–890.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.
- Landsberg, H., 1949. Prelude to the Discovery of Penicillin. *The Isis Magazine*, 40(3), p.225.
- Launay, S. et al., 2008. HtrA1-dependent proteolysis of TGF-beta controls both neuronal maturation and developmental survival. *Cell Death and Differentiation*, 15(9), pp.1408–1416.
- Leclercq, R. et al., 1989. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(1), pp.10–15.
- Lima, S. et al., 2013. Dual molecular signals mediate the bacterial response to outer-membrane stress. *Science*, 340(6134), pp.837–841.
- Limbird, L.E., 2004. The receptor concept: a continuing evolution. *Molecular Interventions*, 4(6), pp.326–336.
- Lindblad, W.J., 2008. Review Paper: Considerations for Determining if a Natural Product Is an Effective Wound-Healing Agent. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 7(2), pp.75–81.
- Long, K.S. et al., 2006. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(7), pp.2500–2505.
- Malumbres, M. & Barbacid, M., 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews. Cancer*, 9(3), pp.153–166.
- Marquez, B., 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*, 87(12), pp.1137–1147.
- Martinez, J.L. & Baquero, F., 2000. Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), pp.1771–1777.
- Martínez, J.L., Baquero, F. & Andersson, D.I., 2007. Predicting antibiotic resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(12), pp.958–965.
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A. & Jacoby, G.A., 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351(9105), pp.797–799.

- Mecsas, J. et al., 1993. The activity of sigma E, an Escherichia coli heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes & Development*, 7(12B), pp.2618–2628.
- Meltzer, M. et al., 2009. Structure, function and regulation of the conserved serine proteases DegP and DegS of Escherichia coli. *Research in Microbiology*, 160(9), pp.660–666.
- Merril, C.R., Switzer, R.C. & Van Keuren, M.L., 1979. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), pp.4335–4339.
- Miesel, L., Greene, J. & Black, T.A., 2003. Genetic strategies for antibacterial drug discovery. *Nature Reviews. Genetics*, 4(6), pp.442–456.
- Miller, J.H., 1972. *Experiments in Molecular Genetics*,
- Miller JH, M.D.E.Z.G.S.W., 1972. Detection and Isolation of the Repressor Protein for the Tryptophan Operon of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(5), pp.1100–1103.
- Milner, J.M., Patel, A. & Rowan, A.D., 2008. Emerging roles of serine proteinases in tissue turnover in arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 58(12), pp.3644–3656.
- Moiso, N. et al., 2009. Mitochondrial dysfunction triggered by loss of HtrA2 results in the activation of a brain-specific transcriptional stress response. *Cell Death and Differentiation*, 16(3), pp.449–464.
- Monceaux, C.J. et al., 2011. Triazole-linked reduced amide isosteres: an approach for the fragment-based drug discovery of anti-Alzheimer's BACE1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(13), pp.3992–3996.
- Neu, H.C. & Heppel, L.A., 1964. The release of ribonuclease into the medium when E. coli cells are converted to spheroplasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (14), pp.109–112.
- O'Neill, J., 2014. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*, (December), pp.1–16.
- Oka, C. et al., 2004. HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development*, 131(5), pp.1041–1053.
- Page, M.J. & Di Cera, E., 2008. Evolution of peptidase diversity. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(44), pp.30010–30014.
- Paget, M.S., 2015. Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules*, 5(3), pp.1245–1265.
- Park, H.-J. et al., 2006. Beta-amyloid precursor protein is a direct cleavage target of HtrA2 serine protease. Implications for the physiological function of HtrA2 in the mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(45), pp.34277–34287.
- Perkins, D.N. et al., 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18), pp.3551–3567.
- Poepsel, S. et al., 2015. Determinants of amyloid fibril degradation by the PDZ protease HTRA1. *Nature Chemical Biology*, 11(11), pp.862–869.
- Rabilloud, T., Carpentier, G. & Tarroux, P., 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis*, 9(6), pp.288–291.

- Raivio, T.L., 2005. Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 56(5), pp.1119–1128.
- Rawlings, N.D. et al., 2014. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), pp.D503–D509.
- Redford, P., Roesch, P.L. & Welch, R.A., 2003. DegS is necessary for virulence and is among extraintestinal *Escherichia coli* genes induced in murine peritonitis. *Infection & Immunity*, 71(6), pp.3088–3096.
- Redford, P. & Welch, R.A., 2006. Role of sigma E-regulated genes in *Escherichia coli* uropathogenesis. *Infection & Immunity*, 74(7), pp.4030–4038.
- Renart, J., Reiser, J. & Stark, G.R., 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(7), pp.3116–3120.
- Rezuchova, B. et al., 2003. New members of the *Escherichia coli* σ^E regulon identified by a two-plasmid system. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 225(1), pp.1–7.
- Rhodus, V.A. et al., 2006. Conserved and variable functions of the σ^E stress response in related genomes. *Public Library of Science Biology*, 4(1), p.e2.
- Rice, L.B., 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8), pp.1079–1081.
- Saecker, R.M., Record, M.T. & Dehaseth, P.L., 2011. Mechanism of bacterial transcription initiation: RNA polymerase - promoter binding, isomerization to initiation-competent open complexes, and initiation of RNA synthesis. *Journal of Molecular Biology*, 412(5), pp.754–771.
- Sambrook J Maniatis T, F.E.F., 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*.
- Schechter, I. & Berger, A., 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27(2), pp.157–162.
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer ' s Disease : Genes , Proteins , and Therapy. *Perspective*, 81(2), pp.741–767.
- Shen, Q.-T. et al., 2009. Bowl-shaped oligomeric structures on membranes as DegP's new functional forms in protein quality control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), pp.4858–4863.
- Silver, L.L., 2011. Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), pp.71–109.
- Silver, L.L. & Bostian, K.A., 1993. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(3), pp.377–383.
- Singh, N., Kuppili, R.R. & Bose, K., 2011. The structural basis of mode of activation and functional diversity: a case study with HtrA family of serine proteases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 516(2), pp.85–96.
- Smith, P.K. et al., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), pp.76–85.

- Sohn J Sauer RT, G.R.A., 2010. Allostery is an intrinsic property of the protease domain of DegS: implications for enzyme function and evolution.
- Sohn, J., Grant, R.A. & Sauer, R.T., 2007. Allosteric activation of DegS, a stress sensor PDZ protease. *Cell*, 131(3), pp.572–583.
- Sohn, J., Grant, R.A. & Sauer, R.T., 2009. OMP peptides activate the DegS stress-sensor protease by a relief of inhibition mechanism. *Structure*, 17(10), pp.1411–1421.
- Sohn, J. & Sauer, R.T., 2009. OMP peptides modulate the activity of DegS protease by differential binding to active and inactive conformations. *Molecular Cell Biology*, 33(1), pp.64–74.
- Spiess, C. et al., 1997. Biochemical characterization and mass spectrometric disulfide bond mapping of periplasmic alpha-amylase MalS of Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(35), pp.22125–22133.
- Spiess, C., Beil, A. & Ehrmann, M., 1999. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, 97(3), pp.339–347.
- Stoscheck, C.M., 1990. Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 182, pp.50–68.
- Strauch, K.L. & Beckwith, J., 1988. An Escherichia coli mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(5), pp.1576–1580.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A., 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), pp.113–130.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. & Morris, J.G., 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), pp.649–659.
- Switzer, R.C., Merrill, C.R. & Shifrin, S., 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 98(1), pp.231–237.
- Sykes, R., 2001. Penicillin: from discovery to product. *Bulletin of the World Health Organization*, 79(8), pp.778–779.
- Sztanke, K. et al., 2008. Synthesis, determination of the lipophilicity, anticancer and antimicrobial properties of some fused 1,2,4-triazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(2), pp.404–419.
- Tan, X. et al., 2013. 1,2,4-Triazole derivatives as transient inactivators of kallikreins involved in skin diseases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(16), pp.4547–4551.
- Thiel, K., 2004. Old dogma, new tricks—21st Century phage therapy. *Nature Biotechnology*, 22(1), pp.31–36.
- Thompson, K.M., Rhodius, V.A. & Gottesman, S., 2007. σ^E regulates and is regulated by a small RNA in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 189(11), pp.4243–4256.
- Tocharus, J. et al., 2004. Developmentally regulated expression of mouse HtrA3 and its role as an inhibitor of TGF-beta signaling. *Development, Growth & Differentiation*, 46(3), pp.257–274.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), pp.4350–4354.
- Truebestein, L. et al., 2011. Substrate-induced remodeling of the active site regulates human HTRA1 activity. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(3), pp.386–368.

- Tsuchiya, A. et al., 2005. Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone*, 37(3), pp.323–336.
- Udekwi, K.I. & Wagner, E.G.H., 2007. Sigma E controls biogenesis of the antisense RNA MicA. *Nucleic Acids Research*, 35(4), pp.1279–1288.
- Volz, C. & Pauly, D., 2015. Antibody therapies and their challenges in the treatment of age-related macular degeneration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 95, pp.158–172.
- Wainwright, M., 1989. Moulds in ancient and more recent medicine. *Mycologist*, 3(1), pp.21–23.
- Vande Walle, L., Lamkanfi, M. & Vandenabeele, P., 2008. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death and Differentiation*, 15(3), pp.453–60.
- Walsh, C., 2003. Where will new antibiotics come from? *Nature Reviews. Microbiology*, 1(1), pp.65–70.
- Walsh, N.P. et al., 2003. OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell*, 113(1), pp.61–71.
- WHO, 2013. The world health report 2013. *World Health Organization Press*, p.146.
- Wiechelmann, K.J., Braun, R.D. & Fitzpatrick, J.D., 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 175(1), pp.231–237.
- Wilken, C. et al., 2004. Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease. *Cell*, 117(4), pp.483–494.
- Winklhofer, K.F. & Haass, C., 2010. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(1), pp.29–44
- Woods, D.F. & Bryant, P.J., 1991. The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell*, 66(3), pp.451–464.
- Yang, Z. et al., 2006. A Variant of the HTRA1 Gene Increases Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration. *Science*, 314(5801), pp.992–993.
- Yura, T., 1996. Regulation and conservation of the heat-shock transcription factor sigma32. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 1(3), pp.277–284.
- Zeth, K., 2004. Structural analysis of DegS, a stress sensor of the bacterial periplasm. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 569(1-3), pp.351–358.
- Zhang, J., Yang, P.L. & Gray, N.S., 2009. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 9(1), pp.28–39.
- Zhang, N. & Buck, M., 2015. A perspective on the enhancer dependent bacterial RNA polymerase. *Biomolecules*, 5(2), pp.1012–1019.

7. Anhang

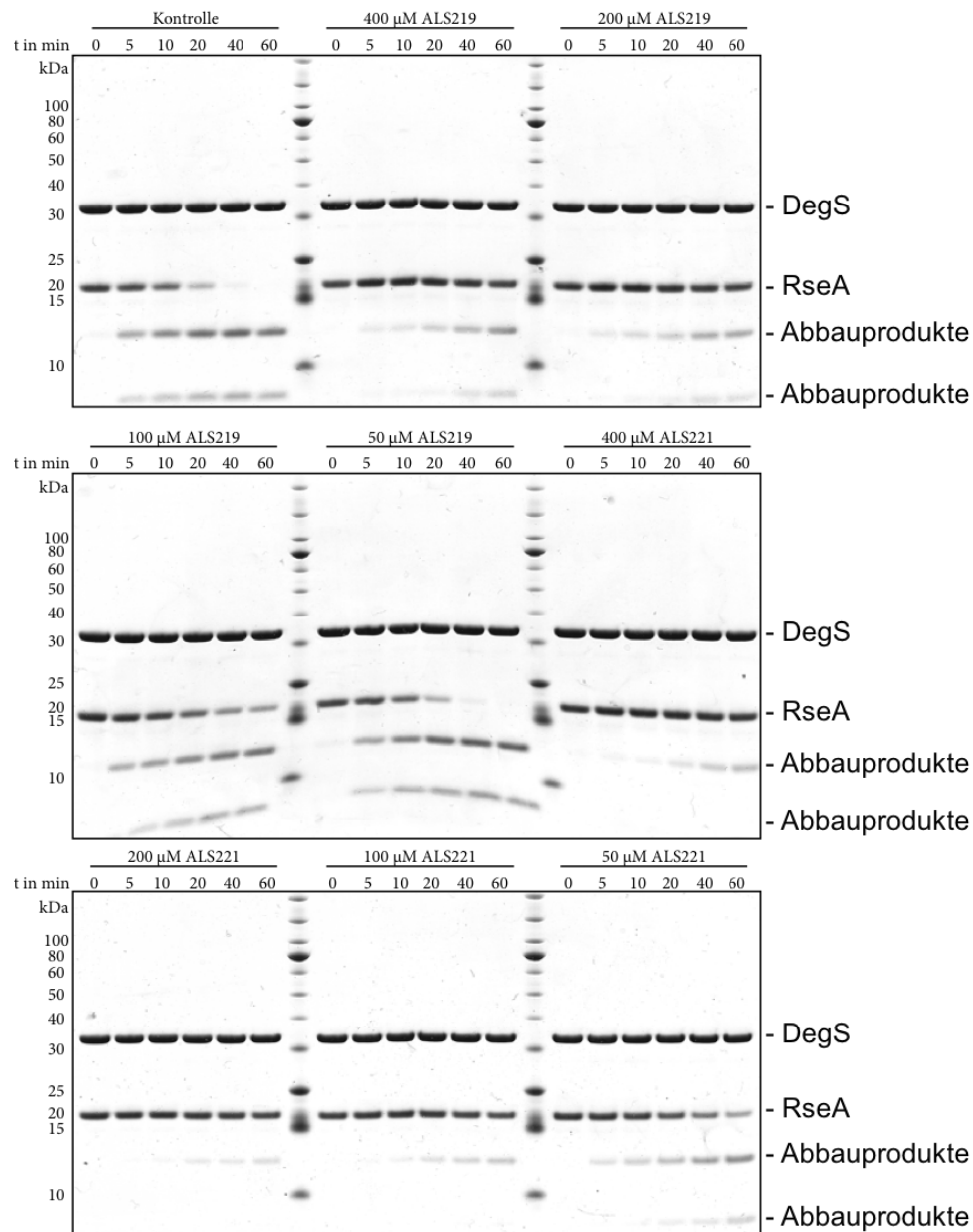


Abb. 56: Inhibition von DegS im RseA-Verdau durch ALS219 und ALS221

10 μM RseA wurden durch 5 μM DegS in Anwesenheit von 50 μM FFF verdaut, Pufferbedingungen: 150 mM NaH₂PO₄ (pH 8,3), 380 mM NaCl, 10 % Glycerin; 37°C und 500 rpm. Sinkende Konzentrationen der Inhibitoren wurden aus DMSO-Lösungen zugegeben, als Kontrolle dient die Zugabe einer volumenmäßig gleichen Menge DMSO. Auftrennung und Coomassiefärbung.

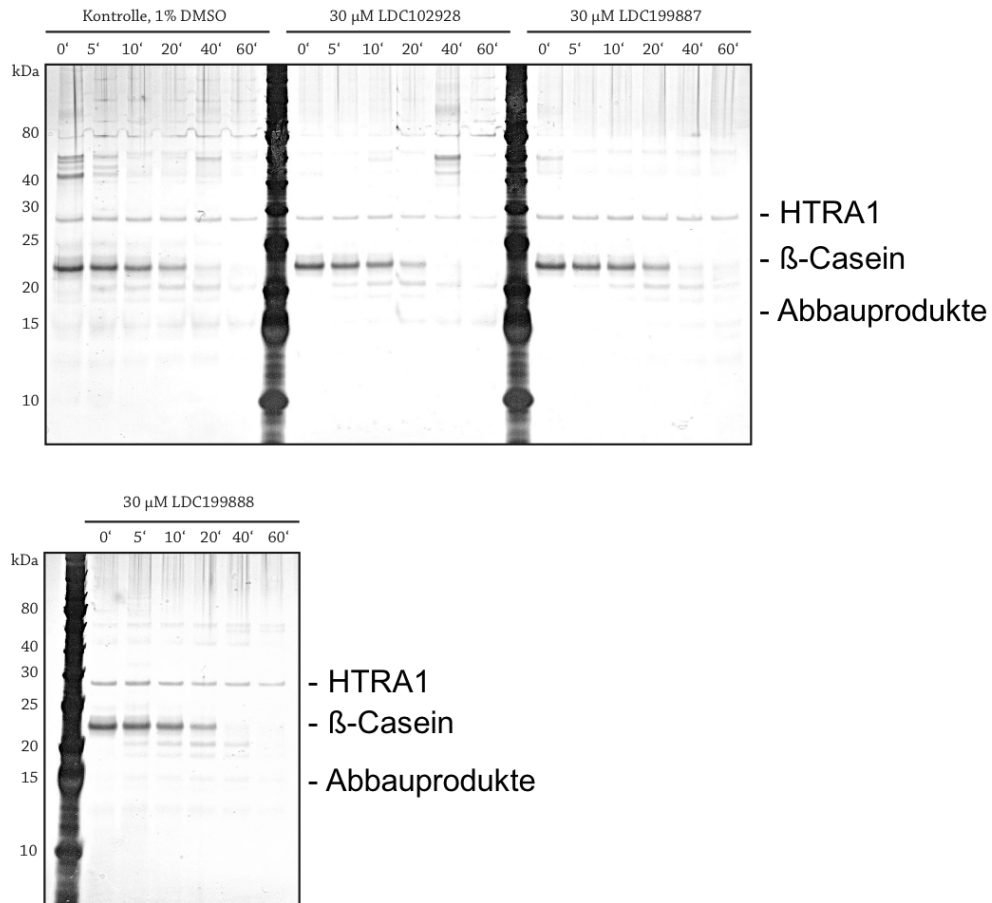


Abb. 57: β -Casein Verdau durch HTRA1 mit Klasse D Compounds

Test des Klasse D Compounds unter LDC-Standardbedingungen (25 nM HTRA1, 250 nM β -Casein), Reaktion in 150 mM NaH_2PO_4 (pH 8.3), 380 mM NaCl bei 37°C und 500 rpm. Auftrennung und Silbernitratfärbung.

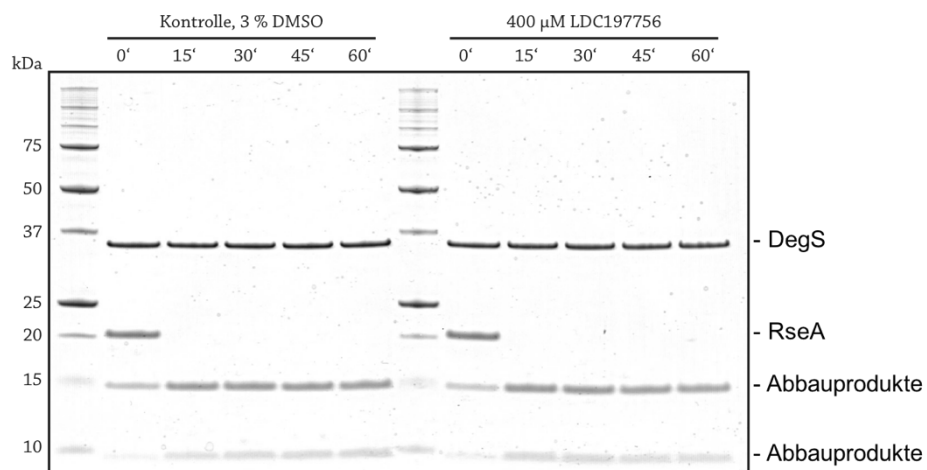


Abb. 58: RseA-Verdau durch DegS H198P mit active-site Inhibitor LDC197756

Test der Wirksamkeit des active-site Inhibitors LDC197756 auf die H198P Variante von DegS. Verdau von 10 μ M RseA durch 5 μ M Protease in 150 mM NaH_2PO_4 (pH 8.3), 380 mM NaCl und 10 % Glycerin bei 37°C und 500 rpm. Als Kontrolle diente die voluminmäßig gleiche Menge DMSO. Auftrennung per SDS-PAGE und Coomassiefärbung.

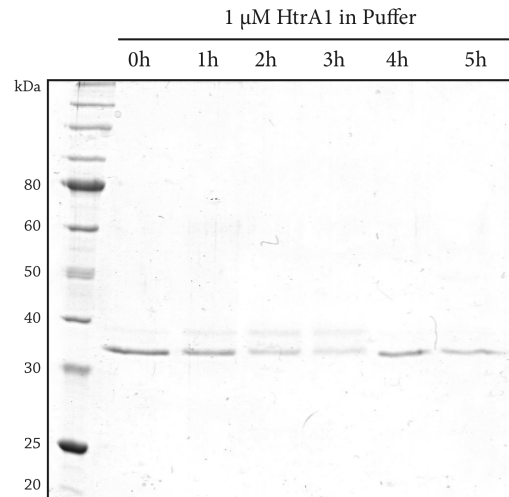


Abb. 59: Kontrolle der Autoproteolyse von HTRA1 in Puffer

1 μ M HTRA1 wurde für fünf Stunden in 150 mM NaH_2PO_4 (pH 8.3), 380 mM NaCl bei 37°C und 500 rpm inkubiert und zu den indizierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, Auftrennung der SDS-PAGE und Coomassiefärbung.

8. Danksagung

In besonderer Weise möchte ich Prof. Dr. Michael Ehrmann für die Überlassung dieses spannenden Themas zur selbstständigen Bearbeitung danken. Zahlreiche offene Diskussion „auf Augenhöhe“, sein Engagement und sein offenes Ohr trugen maßgeblich zum Gelingen bei.

Außerdem danke ich der ganze Arbeitsgruppe Mikrobiologie II und ehemaligen Mitgliedern für das freundliche Klima, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die tägliche Dosis Wahnsinn. Namentlich sind das: Svenja, Adam, Helmut, Simon, Melisa, Michael, Vanda, Juliane, Jasmin, Katharina, Yvonne, Kamilla, Linda, Juliana, Anika, Marian und Kenny. Besonders danken möchte ich Dr. Melisa Merdanovic für tausende Ratschläge, unermüdliches Wissen und stete Hilfsbereitschaft, Dr. Michael Meltzer für viele Diskussionen und Tipps, Marian Lorenz für viele Aufgaben die wir gemeinsam gemeistert haben und Adam und Helmut dafür, dass immer alles rund lief. Über Freundschaften, die aus der Gruppe entstanden sind freue ich mich sehr.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Markus Kaiser danken, durch zahlreiche Diskussionen und Erklärungen half er mir auch die chemischen Aspekte besser zu verstehen und trug somit auch entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei. Aus seiner Gruppe danke ich außerdem besonders Dr. Farnusch Kaschani für seine große Hilfe bei den Massenspektrometrie-Untersuchungen, Yvonne Blaß und Steffen Köcher für viele LC-MS Experimente und natürlich Anna-Laura Schmitz für die vielen, vielen Moleküle – wir bleiben dran!

Ich danke meiner Familie für viel Zeit und Unterstützung in allen Lebenslagen und Darja, Miri, Teresa, Matthias, Martin, Mirko, Luzia und Oskar für tolle Momente, Ablenkung und eure Freundschaft.

Ganz besonders danken möchte ich aber den beiden wichtigsten Personen in meinem Leben, Nelly und Emma. Ihr seid immer da gewesen, auch in schwereren Zeiten, habt mich unterstützt und so geliebt wie ich bin. Ganz besonders freue ich mich auch darauf, dass Leo bald ein Teil dieser tollen Familie sein wird.

V. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

VI. Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie und Geographie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Chemische Modulation der medizinisch relevanten HtrA-Proteasen DegS und HTRA1“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Jens Bongard befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg - Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden