



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Chemie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters

**Ligandenbindung und Proteindynamik bei
humaner Blutgruppe B Galactosyltransferase und
*West-Nil Virus Protease NS2B-NS3***

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Lena Lisbeth Grimm
aus Starnberg

Lübeck 2015

1. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters
2. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Hübner

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.09.2015

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden Bindungsstudien sowie Untersuchungen zur Proteindynamik an Enzymen mittels NMR-Spektroskopie, Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie (SPR) und isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) durchgeführt. Untersucht wurde die humane Blutgruppe B Galactosyltransferase (GTB) sowie die Protease des West-Nil-Virus (WNV).

Die GTB katalysiert den letzten Schritt der Biosynthese des humanen Blutgruppenantigens B. Hierbei wird die Galactoseeinheit von UDP- α -D-Galactose (UDP-Gal) auf das H-Antigen transferiert. Da die Übertragung des anomeren Kohlenstoffatoms unter Erhalt der Konfiguration stattfindet, zählt die GTB zu den konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen (GTs). Der Mechanismus der konfigurationserhaltenden GTs ist im Gegensatz zu dem der invertierenden GTs noch immer unbekannt. Um weitere Details des Reaktionsmechanismus aufzuklären, wurde in dieser Arbeit die GTB als Modell für konfigurationserhaltende GTs verwendet. Kristallstrukturen zeigen, dass es bei der GTB zwei flexible Schleifen gibt, die bei Substratbindung und während der Katalyse eindeutige Konformationsänderungen durchlaufen. Über die Bewegungen dieser beiden flexiblen Bereiche im freien und im gebundenen Zustand ist bisher wenig bekannt. Ein besseres Verständnis dieser Bewegungen sowie der Bindung von Substraten können dazu beitragen, neue Erkenntnisse über den Reaktionsmechanismus zu erhalten und einen besseren Einblick in die Funktionsweise dieser Enzyme zu bekommen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Bindung von Donor- und Akzeptorsubstraten sowie von Substratanaloga genauer untersucht. Hierfür wurden die Affinitätskonstanten und thermodynamische Parameter mittels SPR-Spektroskopie und ITC ermittelt. Es konnte bestätigt werden, dass bei der Bindung an die GTB ein kooperativer Effekt zwischen Donor- und Akzeptorsubstrat vorliegt. Aus den thermodynamischen Daten ist ein deutlicher Unterschied in den enthalpischen und entropischen Beiträgen bei der Bindung des natürlichen Donorsubstrats UDP-Gal im Gegensatz zum Substratanalog UDP-Glucose zu erkennen und könnte Hinweise auf die Substratspezifität der GTB geben. Neben der Untersuchung der Substrate und Substratanaloga konnte auch die Bindung eines Inhibitors der GTB hilfreiche Informationen zum Mechanismus der GTs liefern. Die Bindung des Inhibitors, der aus einem Screening gegen die Akzeptorbindungsstelle der GTB identifiziert wurde, wurde mit STD-NMR- sowie SPR-Experimenten genauer charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor neben der Akzeptorbindungsstelle auch die Donorbindungsstelle blockiert und bevorzugt die GTB bindet. Dabei spielt die Form der Bindungstasche eine große Rolle bei der Selektivität des Inhibitors.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Protein-Ligand-Wechselwirkung und die daraus resultierende Veränderung der Proteindynamik mittels NMR-Spektroskopie von der Proteinseite aus betrachtet. Für diese Untersuchungen sollte eine Signalzuordnung mit Hilfe von Tripelresonanzexperimenten erfolgen. Da die GTB als Homodimer mit einem Molekulargewicht von 69 kDa für NMR-Verhältnisse sehr groß ist, waren Sensitivität und Auflösung der Spektren nicht ausreichend für eine Zuordnung der Proteinresonanzen. Es konnten lediglich sechs Aminosäurereste zugeordnet werden. Titrationsexperimente mit UDP

zeigten, welche komplexen Veränderungen die Bindung von UDP an GTB hervorruft. Da eine Zuordnung der Proteinresonanzen mit den Tripelresonanzexperimenten nicht möglich war, wurden die δ 1-Methylgruppen der Isoleucine selektiv mit $^{13}\text{CH}_3$, in einem ansonsten deuterierten Protein, markiert. Diese Methode eignet sich besonders für große Proteine. Die Anzahl der Signale wird deutlich reduziert und somit das Problem der Signalüberlagerung minimiert. Zusätzlich ist die Sensitivität aufgrund der drei Protonen in den Methylgruppen deutlich erhöht. Aus vorliegenden kinetischen Daten konnte angenommen werden, dass Konformationsänderungen der GTB im Mikro- bis Millisekundenbereich stattfinden. Daher sollten Carr-Purcell Meiboom-Gill (CPMG)-Relaxations-Dispersions Messungen durchgeführt werden, die speziell diesen Bereich von dynamischen Prozessen erfassen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Dynamik des flexiblen Bereichs der GTB durch Bindung von UDP und anschließender Bindung von H-Disaccharid einer deutlichen Veränderung unterzieht. Dies könnte ein Hinweis auf das Vorhandensein der offenen, halbgeschlossenen und geschlossenen Konformation des internen Loops sein. Im restlichen Protein konnte jedoch keine Veränderung und keine Bewegung in diesem Zeitbereich beobachtet werden.

Neben den NMR-spektroskopischen Untersuchungen der GTB, sollte in dieser Arbeit auch die Dynamik der WNV-Protease genauer untersucht werden. Das West-Nil-Virus gehört zum Genus *Flavivirus* in der Familie der *Flaviviridae* und ist ein humanpathogener Erreger der durch Moskitos übertragen wird. Obwohl eine WNV-Infektion schwere neurologische Schäden zur Folge haben kann und bereits eine globale Bedrohung ist, existieren bisher noch keine zugelassenen Therapien oder Impfungen. Die virale Protease ist verantwortlich für die proteolytische Spaltung des viralen Polyproteins und stellt damit ein attraktives Ziel für die Entwicklung von Inhibitoren dar. Kristallstrukturen zeigen einen flexiblen Bereich in der WNV-Protease. Dieser nimmt ohne Inhibitor eine offenen Konformation an, bei dem sich der flexible Bereich weit weg vom aktiven Zentrum befindet. Bindet ein Inhibitor, legt sich dieser flexible Bereich um das Protein und bildet so das aktive Zentrum. Es wird vermutet, dass die geschlossenen Konformation die Voraussetzung für eine vollständige katalytische Aktivität der Protease ist. Eine Möglichkeit der Inhibition der Protease beruht auf der Inhibition dieser Konformationsänderung und der daraus resultierenden Bildung des aktiven Zentrums.

In dieser Arbeit wurde die Veränderung der Dynamik der WNV-Protease bei Bindung von zwei bekannten Inhibitoren charakterisiert. Mit Hilfe von CPMG-Relaxations-Dispersions Experimenten der selektiv $^{13}\text{CH}_3$ markierten δ 1-Methylgruppen der Isoleucine konnte gezeigt werden, dass sich der flexible Bereich in Abwesenheit eines Inhibitors mit einer Austauschrate im mittleren Mikrosekundenbereich zwischen einer offenen und einer geschlossenen Konformation bewegt. Die Bindung von Inhibitoren stabilisierte die geschlossenen Konformation und es konnte kein Austausch im Mikro- bis Millisekundenbereich zwischen offener und geschlossener Konformation beobachtet werden. Diese Experimente legen eine gute Grundlage für die genauere Charakterisierung der Bindung sowie für die Entwicklung neuer Inhibitoren, die eine Konformationsänderung von dem offenen in den geschlossenen Zustand unterbinden.

ABSTRACT

Ligand binding and dynamic processes were studied using NMR spectroscopy, surface plasmon resonance spectroscopy (SPR) as well as isothermal titration calorimetry (ITC). The human blood group B galactosyltransferase (GTB) and the West Nile virus (WNV) protease are the focus of this thesis.

GTB catalyses the last step of the biosynthesis of the blood group B. The galactose from UDP- α -D-galactose (UDP-Gal) is transferred to the H antigen acceptor under retention of the anomeric center of the donor sugar. Therefore GTB belongs to the class of retaining glycosyltransferases. While the mechanism of inverting glycosyltransferases is mainly understood, the mechanism of the retaining glycosyltransferases is still under elucidation. For further details on the mechanism of retaining glycosyltransferases, GTB was used as a model. From crystal structures, two flexible regions which undergo significant conformational changes during substrate binding and catalysis could be identified. Until now, nearly nothing is known about these dynamics of the open and closed conformation. A deeper understanding of these conformational changes and the binding of substrates could lead to new insights of the mechanism and function of these enzymes.

First the binding of donor and acceptor substrates as well as analogs to GTB were analyzed to obtain dissociation constants and thermodynamic data. Measurements were done with SPR spectroscopy and ITC. These data validate the finding of mutual allosteric control of binding of donor and acceptor substrates to GTB. The thermodynamic data also reveals significant differences in enthalpic and entropic contributions to the binding of the natural donor substrate UDP-Gal, when compared with its substrate analog UDP-Glucose. These findings show a possible way of GTB to discriminate between the natural donor substrate and its analogs. Additionally, the binding of a glycosyltransferase inhibitor was analyzed by STD-NMR- and SPR-experiments. The inhibitor was identified by a previous NMR screening against the acceptor binding site and was demonstrated to be an effective inhibitor of GTB. It was found that the binding of the inhibitor is specific for GTB and interferes with both the acceptor and donor binding. The shape of the binding pocket plays a crucial role for the selectivity of the inhibitor.

Further, the protein-ligand interactions and the resulting changes in protein dynamics were analyzed by NMR spectroscopy. For these experiments the resonance assignment of the protein is necessary and isotopically labeled GTB was prepared for the assignment with triple resonance experiments. Due to the large size of the 69 kDa GTB dimer, sensitivity and resolution of the NMR spectra did not allow straightforward assignment of the protein. Only a chain of six amino acids could be identified. The complexity of the binding of UDP to GTB was shown by monitoring the chemical shift perturbation during titration of the donor substrate to GTB by NMR spectroscopy. Since the resonance assignment with triple resonance spectra showed no success further labeling strategies were necessary. The δ 1-methyl groups of isoleucine residues were labeled with $^{13}\text{CH}_3$ in an otherwise deuterated protein. The number of signals and therefore

the complexity of the resulting spectrum is dramatically reduced. Furthermore, the sensitivity of the signals is much higher since there are three protons for each methyl group compared to the one exchanging proton for each amide group. Kinetic data suggested the conformational change of the flexible regions to be in the micro- to millisecond time scale. They can be measured by NMR spectroscopy with Carr-Purcell Meiboom-Gill (CPMG) relaxation dispersion experiments. A clear change in the dynamics of the internal loop of GTB is shown upon binding of the donor substrate UDP following by the binding of the acceptor substrate H-disaccharide. These findings could be an evidence for the existence of the open, semi-closed and closed conformation of the internal loop. In the rest of the protein no dynamics in this time scale could be observed.

Another focus of this thesis is the dynamic investigation of the West Nil virus protease. West Nil virus is a human pathogen which belongs to the genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae*. Spread through mosquitoes a WNV infection causes severe human diseases. Despite its growing distribution and epidemic character, no antiviral treatments have been developed that can prevent or cure this infection. The viral protease of WNV is essential for viral replication and therefore an attractive target for drug development. Crystal structures reveal a flexible part in the protein. In the absence of an inhibitor, this part is located far away from the active site. In the presence of inhibitors it wraps around the protein forming the active site. The closed conformation appears to be a requirement for full proteolytic activity. A possible inhibition of the WNV protease is to trap the enzyme in the open inactive conformation.

To get a better view, the change of dynamic processes upon binding of two known inhibitors to the WNV protease was investigated. CPMG relaxation dispersion experiments of selective $^{13}\text{CH}_3$ labeled δ 1-methyl groups of isoleucine residues were performed. In the absence of inhibitors, dynamic exchange between the open and closed conformation in a time scale of microseconds could be observed. The binding of inhibitors stabilized the closed conformation and no exchange on this time scale could be measured. These experiments are not only a good way to characterize the binding of inhibitors, but also provide insights for the development of new inhibitors trapping the open conformation of the WNV protease.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung.....	5
Abstract.....	7
Inhaltsverzeichnis.....	9
Abkürzungsverzeichnis	13
1 Einleitung.....	17
1.1 Glycobiologie.....	17
1.2 Glycosyltransferasen.....	18
1.2.1 Klassifikation und Strukturen	18
1.2.2 Katalysemechanismen	19
1.2.3 Proteindynamik.....	23
1.2.4 Glycosyltransferaseinhibitoren	24
1.3 Humane Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen	24
1.3.1 Das AB0-Histo-Blutgruppensystem	25
1.3.2 Strukturelle Eigenschaften und Ligandenbindung.....	26
1.4 West-Nil-Virus.....	30
1.4.1 Virales Genom, Struktur und Replikation	31
1.4.2 West-Nil-Virus Protease.....	32
1.5 Zielsetzung.....	34
2 Methoden	39
2.1 Präparation rekombinanter humaner Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen...39	
2.1.1 Plasmide und Bakterienstamm	39
2.1.2 Gerichtete Mutagenese	40
2.1.3 Proteinbiosynthese.....	42
2.1.4 Proteinreinigung	45
2.2 Präparation rekombinanter West-Nil-Virus Protease.....48	
2.2.1 Plasmide und Bakterienstämme.....	48
2.2.2 Proteinbiosynthese.....	48
2.2.3 Proteinreinigung	49
2.3 Proteinanalytik.....	51
2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	51
2.3.2 Spektroskopische Proteinbestimmung.....	52
2.3.3 Kolorimetrische Proteinbestimmung	52

2.3.4	Aktivitätstest	53
2.4	Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie	54
2.4.1	Grundlagen.....	54
2.4.2	Experimente	55
2.5	Isotherme Titrationskalorimetrie	57
2.5.1	Grundlagen.....	57
2.5.2	Experimente	57
2.6	NMR-Spektroskopie.....	59
2.6.1	NMR-Spektroskopie mit Makromolekülen	60
2.6.2	Bestimmung von Bindungsepitopen mittels STD-NMR-Spektroskopie ...	65
2.6.3	Tripelresonanzexperimente.....	67
2.6.4	Protonen-Deuterium Austausch bei GTB	68
2.6.5	$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experimente zur Untersuchung der Bindung von UDP an GTB.....	69
2.6.6	Methyl-TROSY-Experimente mit GTB.....	70
2.6.7	Methyl-TROSY-Experimente zur Untersuchung der Bindung von UDP und H-Disaccharid an GTB	70
2.6.8	CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit GTB	72
2.6.9	Methyl-TROSY-Experimente mit Lanthanoiden.....	72
2.6.10	NMR-Untersuchungen an der West-Nil-Virus Protease.....	73
3	Ergebnisse	77
3.1	Charakterisierung der Bindung von Substraten und Substratanaloga an die humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen	77
3.1.1	Bestimmung der Bindungskonstanten mit Oberflächen-Plasmonen- Resonanzspektroskopie.....	77
3.1.2	Bestimmung der thermodynamischen Parameter mit isothermer Titrationskalorimetrie	84
3.2	Bindungsstudien mit einem Inhibitor der humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen	88
3.2.1	Bestimmung der Bindungskonstanten mit Oberflächen-Plasmonen- Resonanzspektroskopie.....	88
3.2.2	Bestimmung der Bindungsepitope mit STD-NMR-Spektroskopie.....	90
3.3	Struktur- und Dynamikuntersuchungen von GTB mittels NMR-Spektroskopie ...	96
3.3.1	Präparation isotopenmarkierter GTB	96
3.3.2	Aufnahme und Auswertung von Tripelresonanzexperimenten.....	103
3.3.3	Protonen-Deuterium Austausch bei GTB	108
3.3.4	$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experimente zur Untersuchung der Bindung von UDP an GTB.....	109
3.3.5	Methyl-TROSY-Experimente mit GTB.....	112

3.3.6	Methyl-TROSY-Experimente zur Untersuchung der Bindung von UDP und H-Disaccharid an GTB	113
3.3.7	Methyl-TROSY CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit GTB	116
3.3.8	Strukturelle Untersuchungen an der GTB mit Lanthanoiden	121
3.4	Charakterisierung der strukturellen Dynamik der West-Nil-Virus Protease.....	128
3.4.1	Präparation isotopenmarkierter West-Nil-Virus Protease	128
3.4.2	Methyl-TROSY-Experimente mit der West-Nil-Virus Protease.....	131
3.4.3	Methyl-TROSY-Experimente zur Untersuchung der Bindung von Aprotinin an die West-Nil-Virus Protease.....	133
3.4.4	Methyl-TROSY CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit der West-Nil-Virus Protease.....	135
4	Diskussion	143
4.1	Präparation unmarkierter humaner Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen ...	143
4.2	Charakterisierung der Bindung von Substraten und Substratanaloga an die humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen.....	144
4.3	Bindungsstudien mit einem Inhibitor der humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen.....	151
4.4	Präparation isotopenmarkierter GTB	154
4.5	Struktur- und Dynamikuntersuchungen der GTB	156
4.6	Charakterisierung der strukturellen Dynamik der West-Nil-Virus Protease.....	162
4.7	Schlussfolgerung und Ausblick	166
5	Literaturverzeichnis.....	169
6	Anhang	182
6.1	Materialien	182
6.1.1	Chemikalien.....	182
6.1.2	Gebrauchsmaterialien	184
6.1.3	Geräte.....	185
6.2	Protein Präparation.....	186
6.2.1	Mutageneseprimer	186
6.2.2	Sequenzierungsergebnis	187
6.3	NMR-Pulsprogramme.....	188
6.4	Substrate und Substratanaloga	208
6.4.1	SPR-Daten	208
6.4.2	ITC-Daten.....	221

6.5	Glycosyltransferase Inhibitor	228
6.5.1	SPR-Daten	228
6.5.2	STD-NMR-Daten.....	232
6.6	NMR-Experimente	232
6.6.1	Zuordnungstabelle.....	232
6.6.2	CPMG-Relaxations-Dispersion Messungen mit der GTB.....	240
6.6.3	Untersuchungen der GTB mit Lanthanoiden	242
6.6.4	Untersuchungen der West-Nil-Virus Protease	243
	Lebenslauf	247
	Danksagung.....	249

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CAZy	engl. Carbohydrate-Active EnZymes
3AD	α -L-Fuc-(1,2)- β -D-3-amino-3-deoxy-Gal-O-methyl
3AM	α -D-3-amino-3-deoxy-Gal-O-octyl
3DD	α -L-Fucp-(1,2)- β -D-(3-desoxy)-Galp-(1,O)-(CH ₂) ₇ CH ₃
A	Aktivität
BGG	Bovines Gammaglobulin
BSA	Bovines Serumalbumin
BPTI	pankreatischer Trypsin-Inhibitor, <i>engl.</i> Bovine pancreatic trypsin inhibitor
CPMG	Carr-Purcell Meiboom-Gill
C-Protein	Capsid-Protein
D ₂ O	Deuteriumoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
E-Protein	envelope-Protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fc	Flusszelle, <i>engl.</i> flow cell
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetyl-D-Galactosamin
Glc	Glucose
GT	Glycosyltransferase
GTA	humane α -1,3-N-Acetylgalactosaminyltransferase, humane Blutgruppe A Glycosyltransferase
GTB	humane α -1,3-Galactosyltransferase, humane Blutgruppe B Galactosyltransferase
H-Dis	H-Disaccharid, α -L-Fucp-1,2- β -D-Galp
HSQC	<i>engl.</i> Heteronuclear single quantum correlation
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
Kre2p/Mnt1p	α -1,2-Mannosyltransferase
LB	Luria-Bertani
LgtC	Lipopolysaccaryl- α -1,4-Galactosyltransferase C
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NCR	nichtkodierende Regionen, <i>engl.</i> Noncoding regions
NA	NeutrAvidin [®]
NMR	kernmagnetische Resonanz, <i>engl.</i> Nuclear magnetic resonance
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NS	Nicht-Strukturprotein

OD	optische Dichte
OtsA	Trehalose-6-Phosphat-Synthase
prM-Protein	membran precursor Protein
RU	Resonanzeinheiten, <i>engl.</i> Resonance units
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
S _N 1	unimolekulare nucleophile Substitution
S _N 2	bimolekulare nucleophile Substitution
S _N i	innere nucleophile Substitution
SOB	Super Optimal Broth
SPR	Oberflächen-Flasmonen-Resonanz, <i>engl.</i> Surface plasmon resonance
SP-	Sulfopropyl
STD	Sättigungstransfer-Differenz
TB	<i>engl.</i> Terrific Broth
TROSY	<i>engl.</i> Transverse relaxation-optimized spectroscopy
TSP-d ₄	3-(Trimethylsilyl)-1-propionsäure-2,2,3,3,-d ₄
u-	uniform
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UMP	Uridin-5'-monophosphat
WNV	West-Nil-Virus

Aminosäuren

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit liefert wesentliche neue Erkenntnisse zu der Funktionsweise der humanen Blutgruppe B Galactosyltransferase (GTB). Daraus ergeben sich neue Ansätze für zukünftige Untersuchungen bis hin zur Aufklärung des Katalysemechanismus. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Protease des West-Nil-Virus auf strukturelle Dynamikänderungen bei Bindung bekannter Inhibitoren untersucht und somit der Weg für das Design weiterer Inhibitoren bereitet.

Die Arbeit ist in vier Abschnitte eingeteilt. Zu Beginn werden die biochemischen Grundlagen beider Enzyme sowie deren biologische Relevanz dargestellt. Im zweiten Teil werden die verwendeten Methoden erläutert sowie die experimentellen Bedingungen aufgeführt. Im dritten Kapitel werden die Ergebnisse der Charakterisierung der Bindung von Substraten und eines Inhibitors an die GTB gezeigt. Protein-NMR-spektroskopische Untersuchungen wurden sowohl mit der GTB als auch mit der West-Nil-Virus Protease durchgeführt. Die erhobenen Daten werden im vierten Abschnitt diskutiert und abschließend ein Ausblick auf fortführende Projekte gegeben.

1.1 Glycobiologie

Die Molekularbiologie beruht darauf, dass Informationen von der DNA zur RNA zu Proteinen weitergegeben wird. Mit dem Wissen dieses linearen Informationsflusses ist die Möglichkeit gegeben, Manipulationen auf allen Ebenen dieses Systems durchzuführen, Sequenzhomologien zu untersuchen und damit verwandte Funktionen und evolutionäre Verbindungen vorherzusagen. Für den Aufbau von Zellen, Geweben, Organen und intakten Organismen sind jedoch zwei weitere Molekülklassen von essentieller Bedeutung. Hierbei handelt es sich um Lipide und Kohlenhydrate. Diese sind unter anderem wichtige Bestandteile im Energiestoffwechsel, bei Signal- und Erkennungswegen sowie ein essentieller Teil struktureller Eigenschaften. Zusätzlich gehört die Modifikation von Proteinen mit Lipiden und Kohlenhydraten zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen. Dies erklärt auch wie aus einer relativ kleinen Anzahl an Genen, eine so enorme biologische Komplexität in Form von Entwicklung, Wachstum und der Funktion intakter Organismen entstehen kann (Rademacher, Parekh et al. 1988; Varki, Cummings et al. 2009). Die Glycobiologie untersucht Kohlenhydrate in biologischen Systemen. Hierbei beschäftigt sie sich im Allgemeinen mit deren Strukturen, Chemie, Biosynthese und der Funktion von Proteinen die sie tragen, erkennen, auf- oder abbauen. Die Grundbausteine von Kohlenhydraten sind Monosaccharide, welche durch Glycosyltransferasen über glycosidische Bindungen zu Oligo- und Polysacchariden zusammengefügt werden. Die große Anzahl an Monosacchariden und mögliche Vernetzungen dieser führt zu einer enormen Vielfalt unterschiedlicher Oligo- und Polysaccharide. Diese Glycane kommen als separate Einheiten, aber auch als sogenannte Glycokonjugate vor. Hier werden sie kovalent an weitere Biomoleküle, wie zum Beispiel Proteine oder Lipide gebunden. Glycokonjugate spielen in verschiedenen Prozessen von Wirt-Pathogen Interaktionen bis zur Immunantwort eine wichtige Rolle und sind daher von großem Interesse (Varki 1993; Dwek

1996; Ohtsubo and Marth 2006). Veränderungen im Glycosylierungsmuster von Proteinen oder auf Zellmembranen können direkt mit ernsthaften Krankheiten wie Krebserkrankungen und Alzheimer verbunden sein (Fuster and Esko 2005; Yuzwa, Macauley et al. 2008; Varki, Cummings et al. 2009).

1.2 Glycosyltransferasen

Da Kohlenhydrate eine wichtige Rolle in unterschiedlichen biologischen Systemen spielen, ist es von großer Bedeutung die Funktionsweise von Glycosidasen und Glycosyltransferasen zu verstehen. Die katalysierte Hydrolyse der glycosidischen Bindungen durch die Glycosidasen konnte bereits gut charakterisiert werden (Davies, Mackenzie et al. 1998; Zechel and Withers 2000). Hingegen ist der Mechanismus der Glycosyltransferasen, welche die glycosidischen Bindungen formen, noch nicht vollständig geklärt. Glycosyltransferasen katalysieren den Transfer eines Monosaccharids von einem aktivierten Donorzucker auf einen Akzeptor. Bei den Donorzuckern handelt es sich am häufigsten um Nukleotidzucker. Jedoch können auch Lipidphosphate und unsubstituierte Phosphatzucker als Donorzucker dienen (Weadge and Palcic 2008). Neben Monosacchariden können auch ganze Oligosaccharideinheiten übertragen werden (Silberstein and Gilmore 1996; Hug and Feldman 2011). Akzeptorsubstrate enthalten meistens Zucker, können aber auch Lipide, Proteine, DNA, Antibiotika oder andere kleine Moleküle sein (Lairson, Henrissat et al. 2008; Weadge and Palcic 2008). Glycosyltransferasen sind spezifisch für ihre Donor- und Akzeptorsubstrate und arbeiten regio- und stereospezifisch.

1.2.1 Klassifikation und Strukturen

Glycosyltransferasen können anhand ihrer Primärstruktur, ihrer Donor- und Akzeptorsubstratspezifität sowie dem entstandenen Produkt in unterschiedliche Familien eingeteilt werden (Campbell, Davies et al. 1997; Coutinho, Deleury et al. 2003). In der *Carbohydrate-Active EnZymes* Datenbank (CAZy: <http://www.cazy.org>) können 97 Familien anhand ihrer Primärstruktur klassifiziert werden (Stand April 2015) (Cantarel, Coutinho et al. 2009). Obwohl die Glycosyltransferasen in ihrer Primärstruktur eine große Diversität zeigen, können die Glycosyltransferasen (GT) in zwei grundsätzliche Faltungsmuster, die GT-A und GT-B sowie Varianten davon, eingeteilt werden (siehe Abbildung 1.1) (Bourne and Henrissat 2001; Breton, Snajdrova et al. 2006). Zusätzlich wurde eine lysozym-ähnliche Faltung für Peptidoglycan-Glycosyltransferasen (Lovering, de Castro et al. 2007), sowie eine weitere Faltung von integralen Membranprotein-Glycosyltransferasen, die GT-C, beobachtet (Liu and Mushegian 2003; Igura, Maita et al. 2008; Alderwick, Lloyd et al. 2011).

Der Faltungstyp GT-A besitzt zwei nah beieinander liegende $\beta/\alpha/\beta$ -Rossmann-ähnliche Faltungsmotive, die an der Nukleotidbindung mit beteiligt sind. Die meisten Enzyme mit GT-A Faltung besitzen ein konserviertes DXD-Motiv (Asp-X-Asp) im Zentrum des Proteins, welches ein bivalentes Kation für die Donorbindung koordiniert (Unligil and Rini 2000). Der Faltungstyp GT-B besitzt ebenfalls zwei $\beta/\alpha/\beta$ -Rossmann-ähnliche Faltungsmotive, die jedoch flexibler miteinander verbunden sind und bei denen sich das aktive Zentrum zwischen diesen

beiden Domänen befindet. Im Gegensatz zu Glycosyltransferasen mit einer GT-A Faltung ist die Aktivität von Glycosyltransferasen mit einer GT-B Faltung unabhängig vom Metallionen.

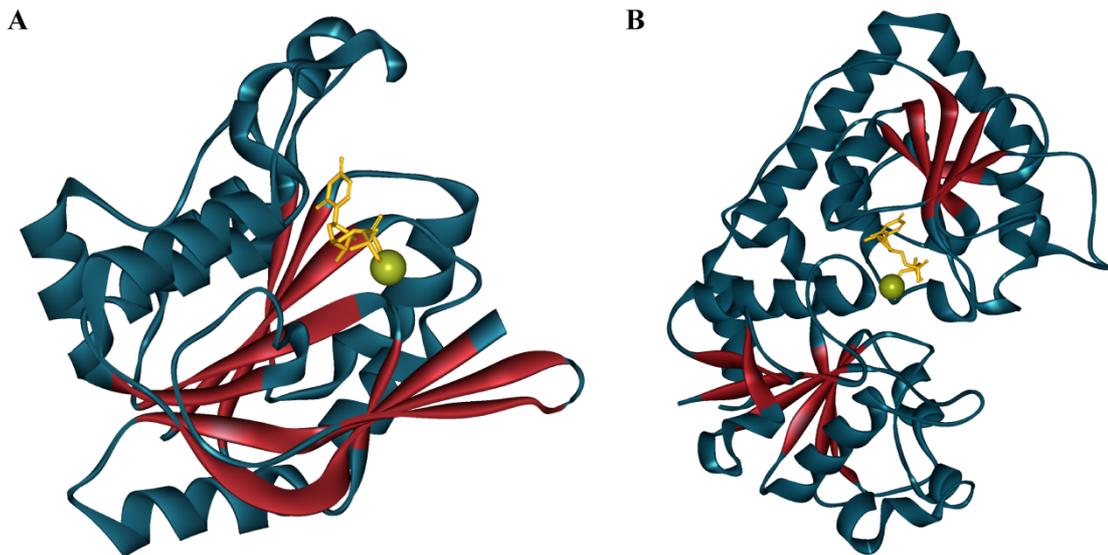


Abbildung 1.1 | Faltungsmuster von Glycosyltransferasen. Gezeigt sind die katalytischen Domänen mit den Faltungsmustern des Typs (A) GT-A und (B) GT-B am Beispiel der SpsA von *Bacillus subtilis* (PDB ID: 1QGQ) (Charnock and Davies 1999) und am Beispiel der β -Glucosyltransferase aus T4-Phagen (PDB ID: 1JG7) (Morera, Lariviere et al. 2001).

Glycosyltransferasen sind in eukaryotischen Zellen weit verbreitet. Sie befinden sich im endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-Apparat, im Cytoplasma an der Plasmamembran sowie im Zellkern (Spiro 2002; Lairson, Henrissat et al. 2008). Generell haben alle golgiständigen Glycosyltransferasen den gleichen Aufbau. Sie besitzen einen kurzen N-terminalen cytoplasmatischen Schwanz, daran eine Transmembrandomäne, die über eine Stammregion mit der C-terminalen katalytischen Domäne verbunden ist. Damit gehören sie zu den Transmembranproteinen Typ II (Paulson and Colley 1989; Varki, Cummings et al. 2009). Neben den membranständigen Glycosyltransferasen existieren auch lösliche Formen von Glycosyltransferasen. Diese sind in Sekreten und Körperflüssigkeiten zu finden und entstehen durch proteolytische Spaltung im Bereich der Stammregion (Beyer, Sadler et al. 1981; Paulson and Colley 1989).

1.2.2 Katalysemechanismen

Neben der strukturellen Einteilung können die Glycosyltransferasen auch anhand ihrer Stereospezifität eingeteilt werden. Hier wird zwischen den invertierenden und konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen unterschieden (Sinnott 1990). Der Donorzucker wird entweder unter Erhalt oder unter Umkehr der Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom übertragen (siehe Abbildung 1.2). Die Einteilung nach der Stereospezifität ist gänzlich unabhängig vom Faltungstyp der Glycosyltransferasen. Es existieren sowohl

invertierende als auch konfigurationserhaltende Glycosyltransferasen mit dem Faltungstyp GT-A bzw. GT-B (Coutinho, Deleury et al. 2003).

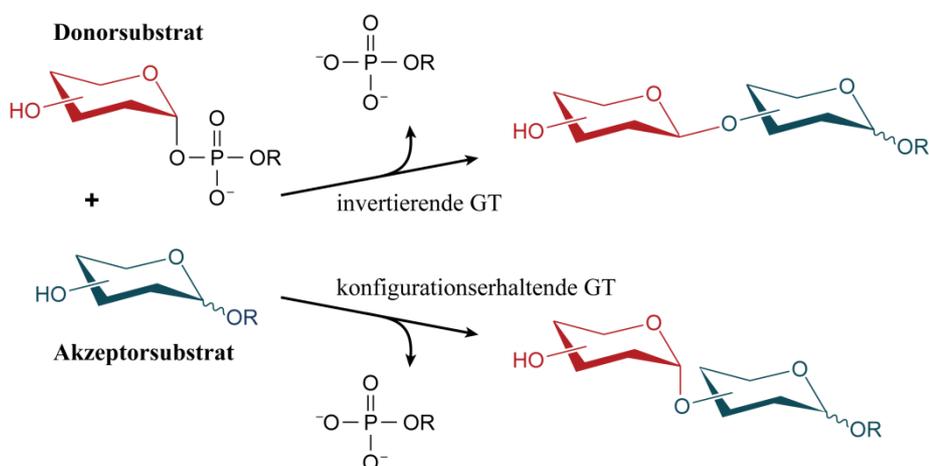


Abbildung 1.2 | Stereoselektivität von invertierenden und konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen (GTs). Übernommen von (Lairson, Henrissat et al. 2008) mit R als Rest von Donor- bzw. Akzeptorsubstrat.

Es ist offensichtlich, dass sich der Mechanismus der invertierenden und konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen unterscheidet. Der Mechanismus der invertierenden Glycosyltransferasen ist gut untersucht und entspricht im wesentlichen einem sogenannten *direct displacement* S_N2 -like Mechanismus (Abbildung 1.3). Der direkte nucleophile Angriff der Hydroxylgruppe des Akzeptors an das anomere Kohlenstoffatom des Donors wird durch eine basische Seitenkette im aktiven Zentrum der Glycosyltransferase katalysiert. Ein bivalentes Kation bzw. ein weiterer Aminosäurerest stabilisiert dabei die Abgangsgruppe.

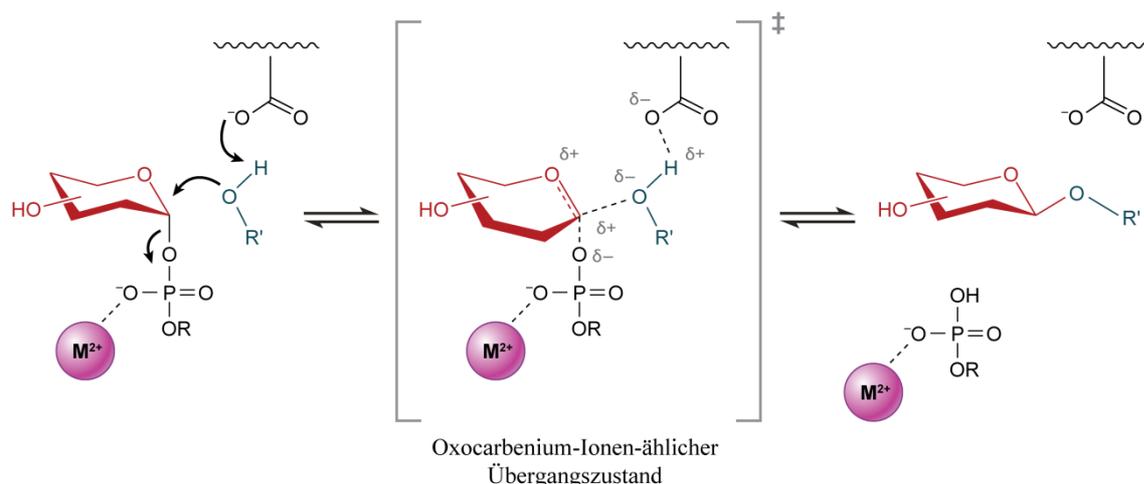


Abbildung 1.3 | Katalysemechanismus invertierender Glycosyltransferasen. Gezeigt ist ein Beispiel einer metallionenabhängigen Glycosyltransferase. Die Reaktion verläuft über einen sogenannten *direct displacement* S_N2 -like Mechanismus mit einem Oxocarbenium-Ionen-ähnlichen Übergangszustand. Übernommen von (Lairson, Henrissat et al. 2008) mit R als Rest von Donor- bzw. Akzeptorsubstrat.

Für die konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Zum einen könnte ein doppelter S_N2 -Mechanismus und zum anderen ein S_{Ni} -ähnlicher Mechanismus (innere nucleophile Substitution) stattfinden (siehe Abbildung 1.4) (Davies 2001; Lairson, Henrissat et al. 2008; Soya, Fang et al. 2011). Bei dem doppelten S_N2 -Mechanismus kommt es zu einem nukleophilen Angriff einer Seitenkette des Enzyms auf das anomere Kohlenstoffatom des Donorzuckers und es bildet sich ein Glycosyl-Enzym-Intermediat mit invertierter Konfiguration. In einem zweiten Schritt findet ein nucleophiler Angriff des Akzeptors auf das anomere Kohlenstoffatom des Donorzuckers statt, wobei sich die Konfiguration erneut umkehrt. Für einige Glycosyltransferasen, wie zum Beispiel der bovinen α -1,3-Galactosyltransferase oder den humanen Blutgruppen-Glycosyltransferasen, konnten geeignete funktionelle Gruppen in den aktiven Zentren identifiziert werden, die als Nukleophil dienen könnten (Gastinel, Bignon et al. 2001; Persson, Ly et al. 2001; Patenaude, Seto et al. 2002). Einige Studien mittels Massenspektrometrie, *chemical rescue* und theoretischen Berechnung weisen auf die Bildung eines Glycosyl-Enzym-Intermediats hin (Andre, Tvaroska et al. 2003; Monegal and Planas 2006; Soya, Fang et al. 2011). Bisher konnte das Intermediat jedoch nur an zwei Mutanten der Glycosyltransferasen nachgewiesen werden (Lairson, Chiu et al. 2004; Soya, Fang et al. 2011). Ein Nachweis der Intermediate an Wildtyp Enzymen konnte bisher noch nicht erfolgen. Neuere theoretische Berechnungen (Bobovska, Tvaroska et al. 2015) weisen darauf hin, dass bei den Blutgruppen-Glycosyltransferasen ein S_{Ni} -ähnlicher Mechanismus wahrscheinlicher ist.

Bei dem S_{Ni} -ähnlichen Mechanismus kommt es zu einem nukleophilen Angriff der Hydroxygruppe des Akzeptors auf das anomere Kohlenstoffatom des Donors. Der Angriff geschieht von der gleichen Seite wie der Bindungsbruch der Abgangsgruppe. Die Reaktion könnte entweder konzertiert oder schrittweise über ein sehr kurzlebiges Intermediat ablaufen (siehe Abbildung 1.4) (Breton, Snajdrova et al. 2006; Lairson, Henrissat et al. 2008; Lee, Hong et al. 2011). Bei einigen konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen wird dieser Mechanismus vermutet. Hierzu zählen unter andern die Lipopolysaccharyl- α -1,4-Galactosyltransferase C (LgtC) (Persson, Ly et al. 2001; Tvaroska 2004), die Trehalose-Phosphorylase (Goedl, Griessler et al. 2006), die Trehalose-6-Phosphat-Synthase (OtsA) (Gibson, Turkenburg et al. 2002; Ardevol and Rovira 2011) sowie die α -1,2-Mannosyltransferase (Kre2p/Mnt1p) (Lobsanov, Romero et al. 2004; Bobovska, Tvaroska et al. 2014). Dieser Mechanismus kann aber nicht auf alle konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen übertragen werden, denn bei all diesen Glycosyltransferasen konnte bisher noch kein mögliches katalytisches Nukleophil im aktiven Zentrum identifiziert werden.

Trotz dieser vielversprechenden Untersuchungen und Erkenntnissen der letzten Jahre, konnte der Mechanismus der konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen bisher nicht geklärt werden. Neben diesen drei bisher untersuchten Mechanismen ist es auch vorstellbar, dass Mechanismen vorliegen, die sowohl S_N2 - als auch S_{Ni} - bzw. S_N1 -Charakter besitzen (Lairson, Henrissat et al. 2008; Bobovska, Tvaroska et al. 2015).

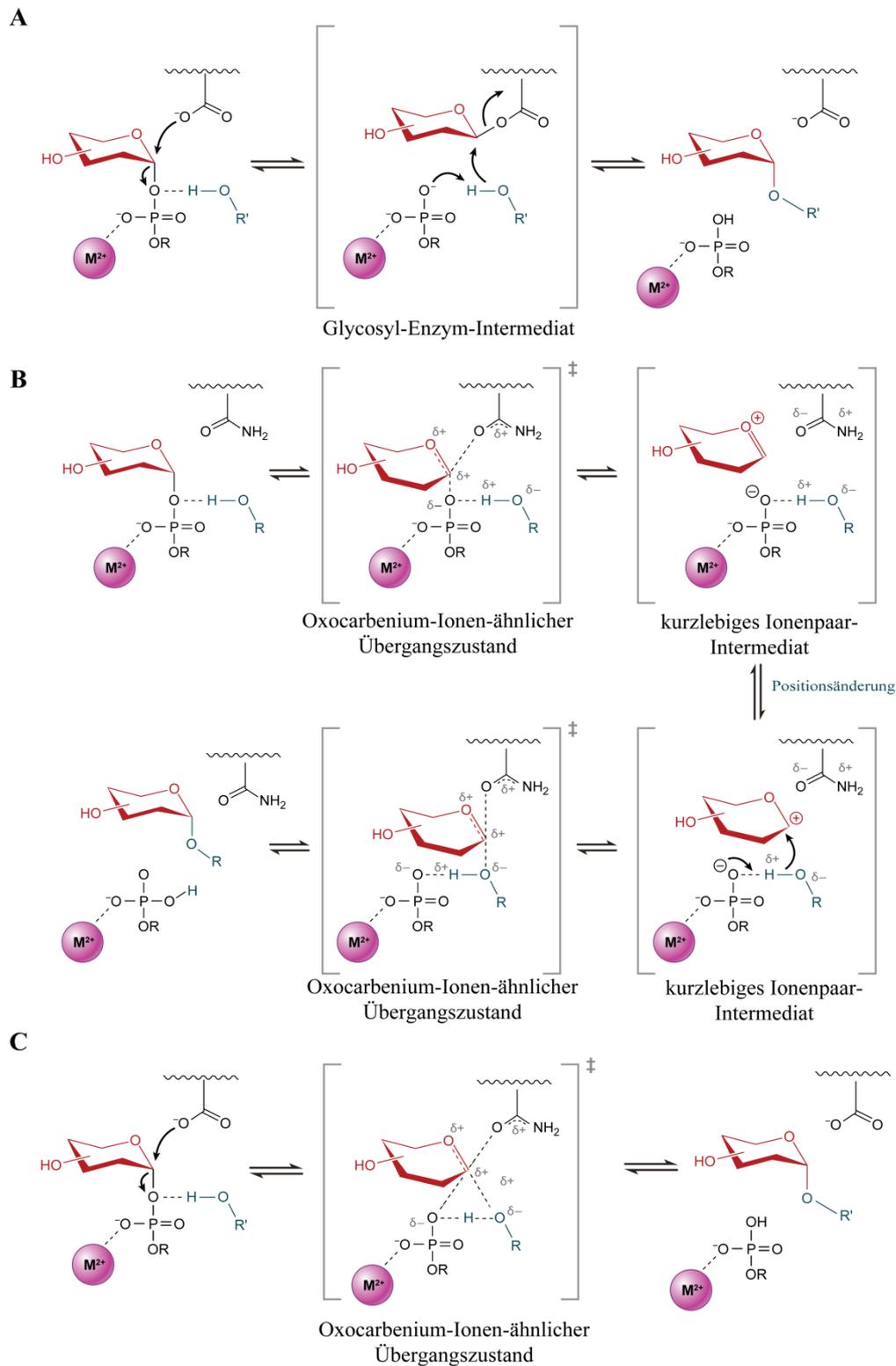


Abbildung 1.4 | Mögliche Katalysemechanismen konfigurationserhaltender Glycosyltransferasen. Gezeigt ist ein Beispiel einer metallionenabhängigen Glycosyltransferase. Mögliche Mechanismen sind der (A) doppelte S_N2 -Mechanismus oder der S_Ni -Mechanismus der entweder (B) schrittweise über ein sehr kurzlebiges Ionenpaarintermediat abläuft oder (C) konzertiert. Übernommen von (Davies 2001; Lairson, Henrissat et al. 2008; Soya, Fang et al. 2011) mit R als Reste von Donor- bzw. Akzeptorsubstrat.

1.2.3 Proteindynamik

Um den Mechanismus der Glycosyltransferasen vollständig aufzuklären, sind Untersuchungen der strukturellen Dynamik unerlässlich. Proteine weisen unterschiedliche dynamische Prozesse im Bereich von Pikosekunden bis Sekunden und länger auf. Hierzu zählen Bindungsvibrationen, Rotation der Seitenketten, Loop-Bewegungen und die Bewegung einzelner Domänen (Henzler-Wildman and Kern 2007). Diese Bewegungen haben einen Einfluss auf verschiedene Prozesse wie zum Beispiel auf die enzymatischen Funktionen von Proteinen (Boehr, Dyson et al. 2006; Loria, Berlow et al. 2008; Namanja, Wang et al. 2010), Signal- und Regulationswege (Smock and Gierasch 2009) sowie Thermostabilität (Kamerzell and Middaugh 2008). Auch nehmen sie Einfluss auf die Faltung sowie Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen (Dyson and Wright 2005; Neudecker, Lundstrom et al. 2009). Konformationsänderungen in Proteinen gehen einher mit Protein-Protein, Protein-Ligand Interaktionen sowie katalytischen Mechanismen. Auch Übergangszustände die während der enzymatischen Katalyse entstehen, werden durch Bewegungen im Protein stabilisiert. Daher ist es sehr wichtig diese Bewegungen in Proteinen zu untersuchen, um den Mechanismus der enzymatischen Katalyse zu verstehen.

In den humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen finden zum Beispiel bei Substratbindung eindeutige Konformationsänderungen statt. Kristallstrukturen ohne Substrat weisen zwei hochflexible Bereiche auf. Diese flexiblen Bereiche konnten in Kristallstrukturen mit Substrat aufgelöst werden (Alfaro, Zheng et al. 2008). Diese konformationellen Änderungen konnten auch in weiteren Glycosyltransferasen beobachtet werden (Persson, Ly et al. 2001; Chiu, Watts et al. 2004).

Es gibt viele Methoden, Bewegungen von Enzymen zu untersuchen. Am aussagekräftigsten ist die NMR-Spektroskopie in Kombination mit Dynamiksimulationen. Hierbei kann die Bewegung lokaler Strukturen sehr gut untersucht werden (Doniach and Eastman 1999; Wand 2001). Die meisten dreidimensionalen Strukturen von Glycosyltransferasen wurden mit Hilfe von Kristallographie aufgeklärt. Die Strukturaufklärung von Glycosyltransferasen mittels NMR-Spektroskopie war bisher noch nicht möglich. Glycosyltransferasen werden mit einem Molekulargewicht von über 30 kDa in den Bereich der großen Proteine eingeteilt. Große Proteine bewegen sich in Lösung langsam und besitzen eine schnelle transversale Relaxation. Dies führt zu einer Linienverbreiterung der Signale. Auch steigt die Anzahl der Signale mit der Proteingröße und die Spektren werden unübersichtlicher. Obwohl neue Methoden in der NMR-Spektroskopie, wie zum Beispiel die selektive Deuterierung und das selektive ^{13}C Markieren von Methylgruppen in Kombination mit TROSY-Experimenten (Kay 2011) entwickelt wurden, gestaltet sich das Arbeiten mit Glycosyltransferasen weiterhin als problematisch. Dies liegt unter anderem daran, dass Glycosyltransferasen meistens membrangebunden sind und die Löslichkeit auch bei Abspaltung der Membrandomäne sehr gering ist. Zusätzlich weisen Glycosyltransferasen Bewegungen im Mikro- bis Millisekundenbereich auf, was zu Linienverbreiterungen der NMR-Signale durch konformationellen Austausch führen kann. Daher sollten sowohl die Kristallstrukturen als auch die Ergebnisse der NMR-Spektroskopie mit Dynamiksimulationen verbunden werden, um einen genaueren Einblick in die Mechanismen der Glycosyltransferasen zu erhalten.

1.2.4 Glycosyltransferaseinhibitoren

Wie bereits zuvor beschrieben, spielen Glycane und Glycosyltransferasen in vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Die Funktionsweise und auch die Rolle verschiedener Glycosyltransferasen bzw. Glycosylierungsmuster in Zellen, Geweben und Organismen sind noch nicht im Detail bekannt. Veränderungen in Glycosyltransferasen oder das Fehlen dieser Gene können in einigen Fällen letal sein. Um ein besseres Verständnis dafür zu bekommen, ist die Entwicklung von Inhibitoren bzw. Modulatoren der Glycosyltransferasen von allgemeinem wissenschaftlichem Interesse. Dabei sind vor allem Inhibitoren für therapeutische Anwendungen (Yuriev, Farrugia et al. 2005; Brown, Crawford et al. 2007), aber auch für die Produktion von Glykokonjugaten mit speziellen Glycosylierungsmustern (Hamilton and Gerngross 2007) von Interesse.

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten nur wenige Inhibitoren für Glycosyltransferasen entwickelt werden (Compain and Martin 2001; Schaefer, Albers et al. 2012; Schaefer, Sindhuwinata et al. 2013). Glycosyltransferasen sind Zwei-Substrat Enzyme mit einem Donor- und Akzeptorsubstrat. Die Entwicklung möglicher Inhibitoren basiert hauptsächlich auf der Blockierung des aktiven Zentrums. Substratanaloga blockieren entweder die Donorbindungsstelle, die Akzeptorbindungsstelle oder beide Bindungsstellen gleichzeitig. Die Affinität der Donorsubstratanaloga ist meist höher als die der Akzeptorsubstratanaloga. Die Akzeptorsubstratanaloga sind meist jedoch spezifischer und wirken gegen einzelne Glycosyltransferasen wohingegen Donorsubstratanaloga oft gegen ganze Klassen von Glycosyltransferasen wirken. Die Affinitäten unterscheiden sich jedoch nicht signifikant von den K_M -Werten der natürlichen Donor- und Akzeptorsubstrate. Die Entwicklung von Bisubstratanaloga führte zu besserer Affinität und höherer Spezifität (Izumi, Yuasa et al. 2009). Daher sollten auch neue Ansätze untersucht werden, wie zum Beispiel das Blockieren des Enzyms in einer katalytisch inaktiven Konformation (Pesnot, Jorgensen et al. 2010) oder die Entwicklung von Übergangszustandsanaloga (Skropeta, Schworer et al. 2004). Neben den Substratanaloga müssen auch neue Leitstrukturen für das Design von Inhibitoren identifiziert werden. Hierfür wurde im Bezug auf Glycosyltransferasen bereits das Screening von Bibliotheken kleiner Moleküle mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie angewandt (Hosoguchi, Maeda et al. 2010; Rademacher, Landstrom et al. 2010; Jorgensen, Grimm et al. 2012).

1.3 Humane Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen

Die Charakterisierung von Glycosyltransferasen ist von großer Bedeutung für das Verständnis der biologischen Funktion dieser Klasse von Enzymen und verspricht eine Reihe von biotechnologischen Anwendungen. Als Modell für konfigurationserhaltende Glycosyltransferasen wurde in dieser Arbeit die humane Blutgruppe B Glycosyltransferasen weiter charakterisiert. Teilweise fanden Vergleiche mit der verwandten humanen Blutgruppe A Glycosyltransferase statt. Diese beiden humanen Glycosyltransferasen sind zwei der wenigen

Glycosyltransferasen, deren Struktur bekannt ist und die für systematische Studien rekombinant in ausreichenden Mengen hergestellt werden können.

1.3.1 Das AB0-Histo-Blutgruppensystem

Das AB0-Histo-Blutgruppensystem ist das wichtigste Blutgruppenmerkmal der Transfusionsmedizin und wurde erstmals 1901 von Landsteiner und ein Jahr später von Decastello und Sturli beschrieben (Landsteiner 1901; Von Decastello and Sturli 1902). Es umfasst die vier Blutgruppen A, B, 0 und AB, die um weitere Subgruppen erweitert wurden (Yamamoto 2004). Blutgruppenantigene sind Glycanstrukturen die hauptsächlich auf Oberflächen von roten Blutkörperchen, aber auch auf weiteren Zellen in unterschiedlichen Geweben an Proteinen und Lipiden verankert sind. Zusätzlich sind sie auch an sekretierten Glycoproteinen oder Glycolipiden, sowie als freie Oligosaccharide im menschlichem Serum zu finden (Varki, Cummings et al. 2009). Individuen besitzen jeweils die Antikörper in ihren Seren, die gegen die fehlenden Blutgruppenantigene gerichtet sind. Bei Blutgruppe A sind anti-B-Antikörper, bei Blutgruppe B anti-A-Antikörper, bei Blutgruppe AB keine und bei Blutgruppe 0 sowohl anti-A- als auch anti-B-Antikörper vorhanden.

Durch Aufklärung der Struktur der Oligosaccharide als Antigen-Determinanten konnten die an der Biosynthese beteiligten Glycosyltransferasen charakterisiert werden (Morgan and Watkins 1959; Morgan and Watkins 1969). Das H-Antigen bildet das Grundgerüst der Histo-Blutgruppenantigene und wird durch eine Reihe von Glycosyltransferasen aus Monosacchariden entlang des Sekretionsweges aufgebaut. Als terminales Disaccharid besitzt es α -L-Fucp-1,2- β -D-Galp welches auch als H-Disaccharid (H-Dis) bezeichnet wird. Das H-Antigen liegt in sechs verschiedenen Varianten vor (Typ I-VI) (Milland and Sandrin 2006; Stanley and Cummings 2009), die als Akzeptorsubstrat für die Bildung der A- und B-Antigene dienen. Für diese Synthese sind die humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen (GTA und GTB) verantwortlich (Kobata, Grollman et al. 1968; Kobata, Grollman et al. 1968). Die Gene für diese Blutgruppenglycosyltransferasen sind auf dem AB0-Genlocos kodiert, werden durch Vererbung weitergegeben und verhalten sich kodominant zueinander. Sind beide Gene vorhanden, werden sowohl das A- also auch das B-Antigen synthetisiert. Die Blutgruppe 0 kann durch defekte Allele, zum Beispiel durch Deletion oder Punktmutation, entstehen, wodurch das H-Antigen unverändert vorliegt (Yamamoto, Clausen et al. 1990).

Die beiden Glycosyltransferasen GTA und GTB katalysieren den Transfer der letzten Zuckereinheit auf das H-Antigen unter Erhalt der Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms des Donorzuckers. Bei der GTA handelt es sich um eine α -1,3-N-Acetylgalactosaminyltransferase, die das N-Acetyl-D-Galactosamin (GalNAc) vom aktivierten Zucker UDP-N-Acetyl- α -D-Galactosamin (UDP-GalNAc) auf das H-Antigen überträgt und das A-Antigen bildet. Die GTB ist eine α -1,3-Galactosyltransferase und überträgt die Galactoseeinheit von UDP- α -D-Galactose (UDP-Gal) auf das H-Antigen und bildet dabei das B-Antigen (siehe Abbildung 1.5).

Die humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen gehören zu den konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen und werden laut CAZy Datenbank in die

Familie 6 der Glycosyltransferasen eingeteilt. Wie bereits unter 1.2.2 beschrieben, ist für diese Glycosyltransferasenklasse der Mechanismus noch nicht geklärt. Es konnte zwar bereits ein mögliches Nucleophil (Glu 303) identifiziert werden (Patenaude, Seto et al. 2002). Bei einer Cysteinmutante (Glu 303 Cys) konnte das entsprechenden Glycosyl-Enzym-Intermediat nachgewiesen werden, welches auf einen doppelten S_N2 -Mechanismus hindeutet (Soya, Fang et al. 2011). Jedoch weisen neue theoretische Berechnungen eher auf einen S_{Ni} -ähnlichen Mechanismus hin (Bobovska, Tvaroska et al. 2015).

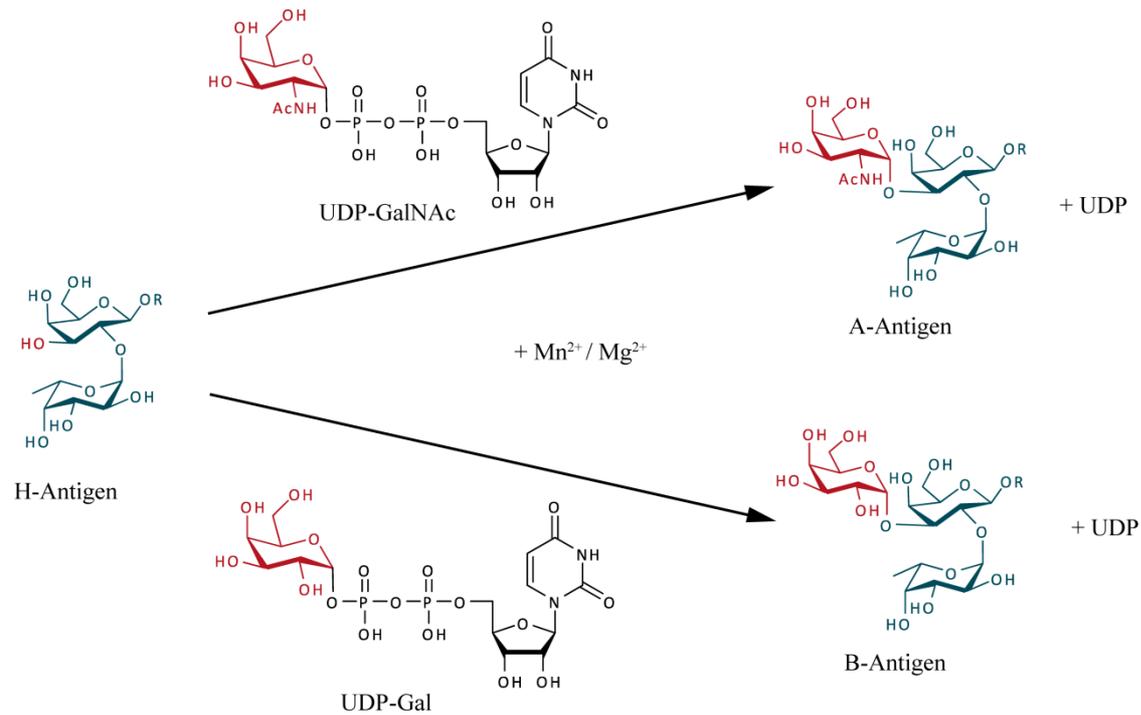


Abbildung 1.5 | Bildung der Blutgruppen A- und B-Antigene durch GTA bzw. GTB. Die kleinste Einheit die von GTA und GTB als Akzeptorsubstrat akzeptiert wird, ist das H-Disaccharid. GTA transferiert die GalNAc- und GTB die Gal-Einheit vom UDP-aktivierten Donorsubstrat auf das H-Antigen. Die Anwesenheit eines bivalenten Kations ist für diese Reaktion essentiell. Mit R als Rest des Akzeptorsubstrats.

1.3.2 Strukturelle Eigenschaften und Ligandenbindung

Die humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen sind in der Membran des Golgi-Apparates lokalisiert und zählen zu den Transmembranproteinen Typ II. Sie besitzen eine kurze N-terminale cytoplasmatische Domäne, eine einfache Transmembrandomäne, eine Stammregion und eine große C-terminale katalytische Domäne, die in das Lumen des Golgi-Apparates hineinragt. Die C-terminale katalytische Domäne kann zu einem aktiven löslichen Protein in die Körperflüssigkeiten abgespalten werden (Paulson and Colley 1989). Die membranständigen humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen bestehen aus 354 Aminosäureresten und haben etwa ein Molekulargewicht von 41 kDa.

Für systematische Studien konnten rekombinante Gene hergestellt werden, die für die löslichen Domänen der Glycosyltransferasen codieren. Die etwa 35 kDa großen Enzyme bestehen aus der katalytischen Domäne und Teilen der Stammregion und sind in ausreichenden Mengen in *E.*

coli synthetisierbar. Die Aktivität sowie Substratspezifität sind vergleichbar mit löslichen, aus humanen Seren isolierten Formen von GTA und GTB (Seto, Palcic et al. 1995; Seto, Palcic et al. 1997; Marcus, Polakowski et al. 2003). Mittels Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass die rekombinant hergestellten Proteine stabile, nicht kovalent miteinander verbundene Homodimere mit äquivalenten Substratbindungsstellen bilden (Abbildung 1.6) (Shoemaker, Kitova et al. 2007; Soya, Shoemaker et al. 2009). Die Bildung von homo- und heterodimeren Enzymkomplexen ist nicht ungewöhnlich für Glycosyltransferasen und könnte eventuell dazu beitragen, dass diese im Golgi-Apparat verbleiben und zusätzlich ihre Effizienz sowie ihre Präzision erhöht werden (Colley 1997; de Graffenried and Bertozzi 2004; Hassinen, Rivinoja et al. 2010).

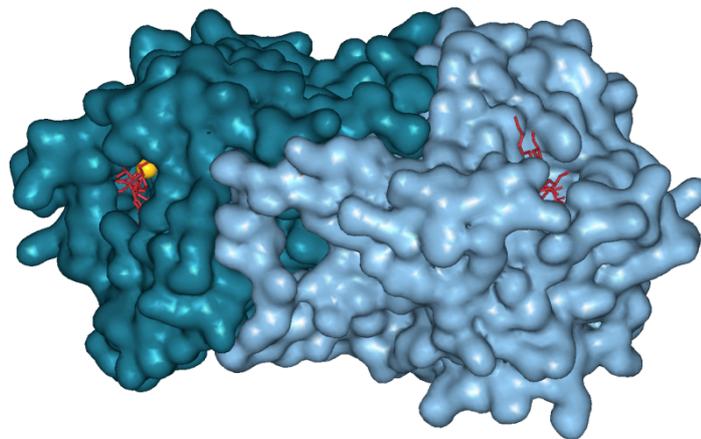


Abbildung 1.6 | Kristallstruktur eines Homodimers. Dargestellt ist das Homodimer der Mutante AABB mit den Liganden UDP-Gal und 3DD in rot, sowie Mn^{2+} in gelb (PDB ID: 2RJ7) (Alfaro, Zheng et al. 2008).

Sowohl von GTA und GTB als auch von Mutanten dieser beiden Enzyme ist bereits eine große Anzahl an Kristallstrukturen ohne und mit gebundenen Substraten bekannt (Patenaude, Seto et al. 2002; Letts, Rose et al. 2006; Alfaro, Zheng et al. 2008). Es handelt sich um Metallionen-abhängige Glycosyltransferasen, die einen GT-A Faltungstyp mit zwei Domänen aufweisen. Dabei ist die N-terminale Domäne eher unstrukturiert. Die C-terminale Domäne enthält ein Rossmann-ähnliches Faltungsmotiv über dem das Donor- und Akzeptorsubstrat bindet. Das gut konservierte DXD-Motiv (hier: Asp 211, Val 212 und Asp 213) im aktiven Zentrum koordiniert ein bivalentes Kation, Mn^{2+} oder Mg^{2+} , welches für die Bindung von UDP-GalNAc bzw. UDP-Gal essentiell ist.

Obwohl GTA und GTB unterschiedliche Donorsubstrate verwenden, unterscheiden sie sich lediglich in vier der 354 Aminosäurereste (Yamamoto, Clausen et al. 1990). Diese sind Arg/Gly 176, Gly/Ser 235, Leu/Met 266 und Gly/Ala 268 für GTA/GTB. Die Struktur-Funktionsbeziehung dieser vier Aminosäurereste konnte anhand zahlreicher Kristallstrukturen sowie kinetischer Studien von Chimären dieser beiden Enzyme gezeigt werden (Marcus, Polakowski et al. 2003; Nguyen, Seto et al. 2003; Lee, Barry et al. 2005; Letts, Rose et al. 2006; Alfaro, Zheng et al. 2008). Überraschenderweise sind nur zwei der vier Aminosäurereste (Leu/Met 266 und Gly/Ala 268) wichtig für die Donorbindung (Seto, Compston et al. 1999;

Patenaude, Seto et al. 2002) und obwohl beide Glycosyltransferasen das gleiche Akzeptorsubstrat verwenden, konnte gezeigt werden, dass Gly/Ser 235 und Leu/Met 266 einen Einfluss auf die Akzeptorbindung haben (Letts, Rose et al. 2006). Die chimären Enzyme werden anhand der vier kritischen Aminosäurereste benannt. So wird GTA als AAAA und GTB als BBBB bezeichnet. BBBB ist demnach eine GTB-Mutante, bei der Gly 176 gegen ein Arg ausgetauscht ist. In dieser Arbeit wird eine Mutante, AAGlyB, verwendet. Bei dieser stammen die ersten beiden kritischen Aminosäurereste aus der GTA, bei Aminosäurerest 266 handelt es sich um ein Gly und der letzte Aminosäurerest stammt aus der GTB. Diese Mutante kann sowohl UDP-Gal als auch UDP-GalNAc als Donorsubstrat umsetzen (Yamamoto, Lin et al. 2001; Pesnot, Jorgensen et al. 2010).

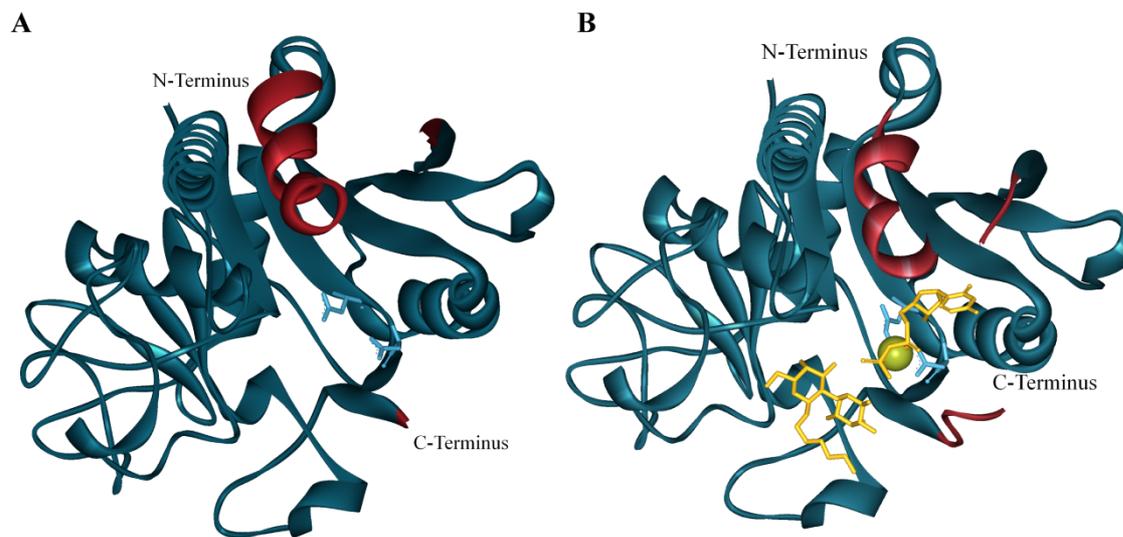


Abbildung 1.7 | Kristallstrukturen der GTB in An- und Abwesenheit von Substraten. Dargestellt sind jeweils die löslichen katalytischen Domänen. (A) GTB in Abwesenheit von Substraten (PDB ID: 2RIT) und (B) in Anwesenheit von UDP und H-Dis (PDB ID: 2RJ8). Der interne Loop und der C-Terminus sind jeweils in rot dargestellt, das DXD-Motiv in hellblau, die Substrate in gelb sowie das Mn^{2+} -Ion in grün. Aufgrund von fehlender Elektronendichte fehlen in (A) die Aminosäurereste 177-180 des internen Loops und die Aminosäurereste 346-354 des C-Terminus. In (B) werden durch Bindung der Substrate die Aminosäurereste 177-179 und 182 des internen Loops und die Aminosäurereste 346-351 sichtbar (Alfaro, Zheng et al. 2008).

Anhand der Kristallstrukturen konnten in GTA und GTB eindeutige Konformationsänderungen bei Substratbindung beobachtet werden. Ohne Substrat weisen die Enzyme zwei hoch flexible Bereiche auf. Hierbei handelt es sich um einen sogenannten internen Loop, der durch die Aminosäurereste 177 bis 195 beschrieben wird und der hinter dem kritischen Aminosäurerest Arg/Gly 176 liegt, sowie den letzten neun C-terminalen Aminosäureresten 346 bis 354 (Abbildung 1.7) (Patenaude, Seto et al. 2002). Insgesamt können drei Konformationszustände in den Enzymen beobachtet werden. Ohne Substrat befinden sich die Enzyme in einem offenen Zustand, der interne Loop besteht aus zwei kurzen α -Helices und der flexible C-Terminus ist ungeordnet. Durch Bindung des Donorsubstrats bewegt sich der interne Loop in Richtung des aktiven Zentrums und aus den zwei Helices wird eine Helix, die eine halbgeschlossene

Konformation bildet. Durch anschließendes Binden des Akzeptorsubstrats ordnet sich auch die C-terminale Schleife und legt sich über das aktive Zentrum (Abbildung 1.8). Dieser geschlossene Zustand ist nur in Anwesenheit beider Substrate zu finden und für eine effiziente Katalyse essentiell (Alfaro, Zheng et al. 2008).

Bisher ist noch nichts darüber bekannt, in welchem zeitlichen Bereich die Bewegung zwischen offenen und geschlossenen Zustand stattfindet. Mit der Mutante BAAA konnte jedoch gezeigt werden, dass der kritische Aminosäurerest Arg/Gly 176 am Rand des internen Loops einen wesentlichen Einfluss auf die Umsatzrate hat (Seto, Compston et al. 1999). Höchstwahrscheinlich ist durch den kleineren Aminosäurerest Gly 176 in BAAA im Gegensatz zum Arg 176 in GTA die Beweglichkeit des internen Loops deutlich erhöht, was zu einer schnelleren Produktfreisetzung sowie einem schnelleren Substrataustausch führt. Diese Theorie wird durch Kristallstrukturen von ABBB und AABB bestätigt, die vermutlich eine langsamere Bewegung der flexiblen Regionen als bei der GTB aufweisen (Alfaro, Zheng et al. 2008).

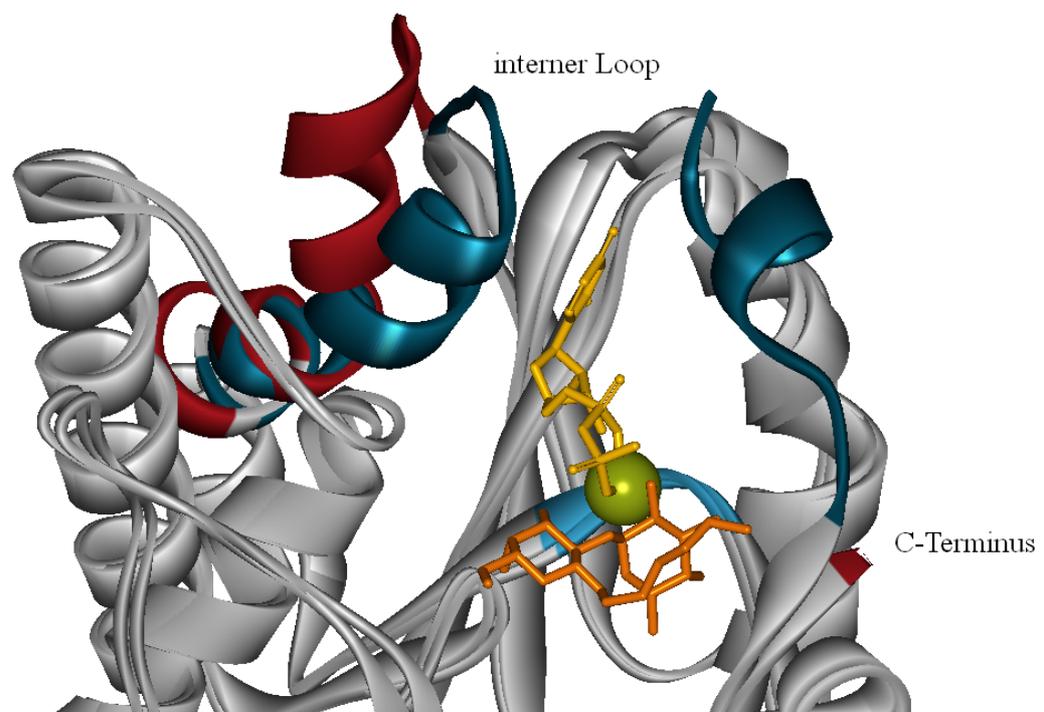


Abbildung 1.8 | Überlagerung der offenen (rot) und geschlossenen (blau) Konformation von ABBB. Gezeigt ist die Überlagerung einer offenen (rot) (PDB ID: 2RIZ) Konformation ohne Substrate und einer geschlossenen (blau) (PDB ID: 2RJ1) Konformation mit UDP (gelb), H-Dis (orange) und Mn^{2+} (grün) des chimeren Enzyms ABBB (Alfaro, Zheng et al. 2008). Die Bewegung des internen Loops so wie des C-Terminus in Richtung des aktiven Zentrums ist deutlich zu erkennen. Das DXD-Motiv ist in hellblau dargestellt.

Zusätzlich kann gesagt werden, dass grundsätzlich die Donorbindung der Akzeptorbindung vorangeht und dies für eine effiziente Katalyse essentiell ist (Kamath, Seto et al. 1999; Qasba, Ramakrishnan et al. 2005; Angulo, Langpap et al. 2006; Alfaro, Zheng et al. 2008). Bei der Bindung des Donorsubstrats UDP-Gal ist Uracil die kleinste Einheit die von GTB erkannt wird (Qasba, Ramakrishnan et al. 2005). STD-NMR-Experimente mit GTB konnten zeigen, dass Uracil, UMP und UDP mit ansteigender Affinität und gleichen Bindungsepitopen wie UDP-Gal

gebunden wird. UDP-Gal wird in einer rückgefalteten Konformation gebunden. Dabei ist die UDP-Einheit für die Affinität und die Galactose-Einheit für die Spezifität verantwortlich (Angulo, Langpap et al. 2006). Die Diskriminierung zwischen UDP-Gal und dem Donorsubstrat UDP-GalNAc der GTA findet aufgrund der kritischen Aminosäuren Leu/Met 266 statt. Da das Leu 266 in der GTA deutlich kleiner ist als das Met 266 in der GTB wird die Aufnahme des größeren GalNAc-Restes in der GTA begünstigt, während die Affinität des GalNAc-Restes bei der GTB gegenüber UDP-Gal verringert ist (Patenaude, Seto et al. 2002). Es konnten jedoch in Bezug auf das Donorsubstrat geringe Kreuzreaktivitäten zwischen beiden Enzymen festgestellt werden (Seto, Compston et al. 2000). UDP-Glc kann von GTB in gleicherweise wie UDP-Gal gebunden werden (Angulo, Langpap et al. 2006; Blume, Angulo et al. 2006), wird jedoch nur mit einer sehr geringen Übertragungsrate umgesetzt (Seto, Compston et al. 2000; Palcic, Seto et al. 2001). Neuste Kristallstrukturen weisen auf weitere Bindungskonformationen dieser Donorsubstrate für GTA und GTB hin (Gagnon, Johal et al. 2015). Das H-Antigen bildet für beide Enzyme das Akzeptorsubstrat und das H-Disaccharid stellt dabei die kleinste Akzeptoreinheit dar. Die in dieser Arbeit verwendeten H-Disaccharide besitzen am reduzierenden Ende entweder eine Methylgruppe oder einen Octylrest (Palcic, Heerze et al. 1988; Lowary and Hindsgaul 1993). Das H-Disaccharid wird in der in Lösung dominierenden Konformation gebunden und es konnte gezeigt werden, dass der Galactoserest die Bindung am stärksten beeinflusst (Angulo, Langpap et al. 2006; Letts, Rose et al. 2006). Jedoch spielt der Fucoserest für eine effiziente Reaktion eine wichtige Rolle (Letts, Rose et al. 2006). Obwohl die Thermodynamik der Ligandenbindung stark zum Verständnis der Katalysemechanismen beiträgt, sind nur wenige thermodynamische Studien von Glycosyltransferasen bekannt (Boix, Zhang et al. 2002; Sobhany and Negishi 2006; Daligault, Rahuel-Clermont et al. 2009; Sindhuwinata, Munoz et al. 2010; Xiang, Baxa et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Donorsubstrats enthalpisch begünstigt ist und dadurch die ungünstigen entropischen Beiträge kompensiert werden (Sindhuwinata, Munoz et al. 2010). Die Bindung des H-Disaccharids als Akzeptorsubstrat zeigt nur eine geringe ungünstige Änderung der entropischen Beiträge (Shoemaker, Soya et al. 2008; Soya, Shoemaker et al. 2009). Zusätzlich konnte eine positive Kooperativität der beiden Substrate beobachtet werden (Sindhuwinata, Munoz et al. 2010).

Obwohl viele Kristallstrukturen und kinetische Parameter der humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen bekannt sind, konnte der enzymatische Mechanismus immer noch nicht aufgeklärt werden. Auch die Bewegung der flexiblen Bereiche vom offenen in den geschlossenen Zustand ist vollkommen unerforscht. Weitere Erkenntnisse dieser Konformationsänderungen könnten einen wesentlichen Bestandteil zur Aufklärung der Funktionsweise dieser Enzyme liefern.

1.4 West-Nil-Virus

Das West-Nil-Virus (WNV) wurde erstmals 1937 in Uganda beschrieben und breitete sich von Israel, Ägypten, Indien, Frankreich und Südafrika bis über den Atlantik aus, als es 1999 New York erreichte. Es dauerte keine drei Jahre bis in ganz USA sowie in Kanada und Mexiko

Infektionsfälle des West-Nil-Virus gemeldet wurden (Hayes and Gubler 2006; Chancey, Grinev et al. 2015). Das Virus hat sich seit seiner Entdeckung weitgehend über die gesamte Welt ausgebreitet und wird als wichtigster Erreger der viralen Enzephalitis in Menschen und Tieren weltweit betrachtet. Das Hauptreservoir für WNV bilden Wildvögel und die Übertragung erfolgt hauptsächlich über Moskitos. Bei den Menschen ist der Krankheitsverlauf meist asymptomatisch bis hin zu leichten Fällen von Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen (Brinton 2002). Jedoch kann bei immungeschwächten Menschen eine WNV-Infektion neurologische Schäden zur Folge haben, darunter zum Beispiel Enzephalitis und Meningitis. Bisher gibt es noch keine zugelassenen Therapien oder Impfungen. Einzig Präventionen wie umfangreiche Programme zur Kontrolle von Moskitos und Maßnahmen zur Vermeidung von Stichen schützen bisher vor einer Infektion.

1.4.1 Virales Genom, Struktur und Replikation

Das WNV gehört zusammen mit anderen humanpathogenen RNA-Viren, wie Hepatitis C, Gelbfieber- oder Dengue-Viren zur Familie der *Flaviviridae* (Lim and Shi 2013). Das Genom besteht aus einer Einzelstrang-RNA positiver Polarität mit einer Größe von etwa 11 kb und enthält 10 Gene die am 5'- und 3'-Ende von nichtkodierenden Regionen (NCR, *engl.* noncoding regions) flankiert werden (Castle, Nowak et al. 1985). Diese NCRs bilden Haarnadelstrukturen (*engl.* stem-loop), die für die virale Replikation unerlässlich sind (Brinton, Fernandez et al. 1986; Wengler and Castle 1986). Das virale Genom kodiert für ein einziges Polyprotein (siehe Abbildung 1.9), welches co- und posttranslational in drei Strukturproteine (*capsid*, C; *membrane precursor*, prM; *envelope*, E) und in sieben Nicht-Strukturproteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5) gespalten wird (Speight, Coia et al. 1988; Nowak, Farber et al. 1989). Die etwa 50 nm großen ikosaedrischen Viruspartikel sind von einer Lipiddoppelschicht umgeben. Darin befindet sich das Nukleokapsid bestehend aus C-Proteinen assoziiert mit dem RNA-Genom, welche die Assemblierung des Viruspartikels einleiten (Khromykh and Westaway 1996; Markoff, Falgout et al. 1997). Während der Assemblierung werden die beiden Glycoproteine prM und E als Heterodimere in die Lipiddoppelschicht eingelagert und auf der Virionoberfläche exponiert (Zhang, Corver et al. 2003). Die sieben Nicht-Strukturproteine spielen eine wichtige Rolle bei der RNA-Synthese sowie bei der Bildung unreifer, nicht-infektöser Viruspartikel. NS1 dient der Regulation der viralen Replikation (Mackenzie, Jones et al. 1996; Lindenbach and Rice 1997). NS3 hat mehrere enzymatische Funktionen. Zusammen mit NS2B dient es als virale Serinprotease, welche andere Nicht-Strukturproteine vom viralen Polyprotein spaltet. Zusammen mit NS4A fungiert NS3 als eine RNA-Helikase und in Assoziation mit NS5 als NTPase (Gorbalenya, Koonin et al. 1989; Wengler, Czaya et al. 1991; Shiryaev, Chernov et al. 2009). Das NS5-Protein ist für die virale Replikation notwendig und besitzt eine RNA-abhängige RNA-Polymerase Aktivität im C-terminalen Bereich und eine Methyltransferase Aktivität im N-terminalen Bereich (Khromykh, Sedlak et al. 1999; Ray, Shah et al. 2006). Bei den Nicht-Strukturproteinen NS2A, NS2B, NS4A und NS4B handelt es sich um kleine, hydrophobe Proteine die keine enzymatischen

Funktionen besitzen, jedoch als Cofaktoren für viele wichtige Prozesse dienen (Brinton 2002; Leung, Pijlman et al. 2008).

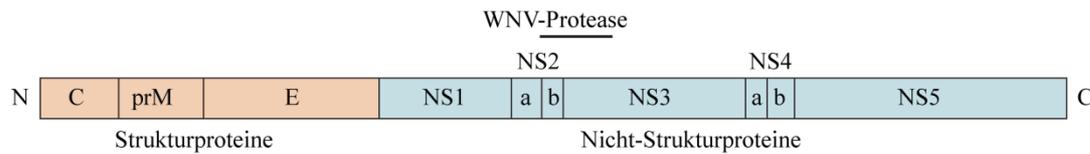


Abbildung 1.9 | West-Nil-Virus Genom. Das virale Genom besteht aus einem offenen Leseraster und codiert für drei Strukturproteine und sieben Nicht-Strukturproteine.

Die Virus Replikation beginnt mit dem Eintritt in die Wirtszelle durch Rezeptor-vermittelte Endozytose. Wie das Virus an die Zelloberfläche bindet, ist noch nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, dass ein 105 kDa großes protease-sensitives Glycoprotein mit komplexen N-glycosidisch gebundenen Zuckern als Rezeptor dienen könnte (Chu and Ng 2003). Durch pH-abhängige Fusion der viralen Membran und der Zellmembran wird die virale RNA ins Cytoplasma der Zelle für die Translation entlassen. Die virale RNA fungiert als mRNA und wird durch die zelluläre Maschinerie in ein einziges Polyprotein translatiert. Dieses Polyprotein wird durch virale und zelluläre Proteasen co- und posttranslational in seine Struktur- und Nicht-Strukturproteine gespalten. Die virale RNA-Replikation findet in intrazellulären Membraneinschlüssen an der Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Nachdem sich genug E-, prM- und C-Proteine angesammelt haben assoziieren sich diese Strukturproteine mit der ER-Membran und stülpen die neu synthetisierte virale RNA in das ER-Lumen ein und bilden somit nicht-infektiöse Viruspartikel. Die unreifen Virionen werden während der Exozytose über das trans-Golgi-Netzwerk durch zelluläre Proteasen proteolytisch prozessiert und als infektiöse Viren in den extrazellulären Raum entlassen (Chambers, Hahn et al. 1990). Die Vervielfältigung des Virus erfolgt direkt im Gewebe und Lymphknoten nahe der Eintrittsstelle. Die infektiösen Viruspartikel gelangen über die Lymphknoten ins Blut und zirkulieren anschließend durch den gesamten Körper (Diamond, Shrestha et al. 2003).

1.4.2 West-Nil-Virus Protease

Trotz der großen Ausbreitung des West-Nil-Virus gibt es bis zum heutigen Tag keine spezifische antivirale Behandlung, die eine Infektion verhindern oder heilen kann. Der virale Replikationszyklus bietet eine Vielzahl an möglichen Angriffspunkten für die Entwicklung von Inhibitoren. Hierbei stellt vor allem das Nicht-Strukturprotein 3 (NS3), welches essentiell für die virale Replikation ist, ein attraktives Ziel dar. Die N-terminale Domäne von NS3 (NS3pro) dient dabei als Serinprotease und ist verantwortlich für die Spaltung des Polyproteins. Obwohl die Aminosäuresequenz 1-160 von NS3 für eine proteolytische Aktivität ausreichend ist (Bollati, Alvarez et al. 2010), wird ein Teil von NS2B als Cofaktor für die vollständige Enzymaktivität benötigt (Nall, Chappell et al. 2004). Für *in vitro* Untersuchungen wird ein Konstrukt verwendet, welches aus ca. 44 Aminosäureresten von NS2B besteht, die mit den

ersten 184 Aminosäureresten von NS3 über einen (Gly)₄-Ser-(Gly)_{3/4}-Linker verknüpft sind (Chappell, Stoermer et al. 2007).

Es konnten Kristallstrukturen von NS2B-NS3pro (im Folgenden als WNV-Protease bezeichnet) ohne und mit peptidischen Inhibitoren sowie mit dem pankreatischen Trypsin-Inhibitor (Aprotinin) bestimmt werden (Diamond, Shrestha et al. 2003; Erbel, Schiering et al. 2006; Robin, Chappell et al. 2009). Die Faltung von NS2B ohne Inhibitor unterscheidet sich deutlich von der mit Inhibitor, wohingegen sich die Faltung von NS3 nur geringfügig ändert. Die NS3-Domäne nimmt eine Chymotrypsin-ähnliche Struktur mit zwei β -Fässern (β -barrel), die jeweils aus sechs β -Faltblättern aufgebaut sind, an (Erbel, Schiering et al. 2006). Zwischen den β -Fässern befindet sich die katalytische Triade (His 51, Asp 75, Ser 135). Die N-terminale Domäne von NS2B integriert sich in beiden Konformationen ins β -Faltblatt der NS3-Domäne. Die C-terminale Domäne von NS2B hingegen ändert ihre Position erheblich. In Anwesenheit eines Inhibitors legt diese sich um NS3 herum und bringt dadurch das C-terminale β -Faltblatt nah an das aktive Zentrum heran. Dies wird auch als geschlossener Zustand bezeichnet und bildet die aktive proteolytische Konformation der WNV-Protease (Chappell, Stoermer et al. 2008). Einen offenen Zustand bildet die WNV-Protease ohne Anwesenheit eines Inhibitors, dabei befindet sich das C-terminale β -Faltblatt weit entfernt vom aktiven Zentrum. Die Struktur der offenen sowie der geschlossenen Konformation sind in Abbildung 1.10 abgebildet. NMR-Experimente zeigten aber, dass auch ohne Inhibitor die geschlossene Konformation dominiert und diese durch Bindung von Inhibitoren im aktiven Zentrum verstärkt wird (Su, Ozawa et al. 2009).

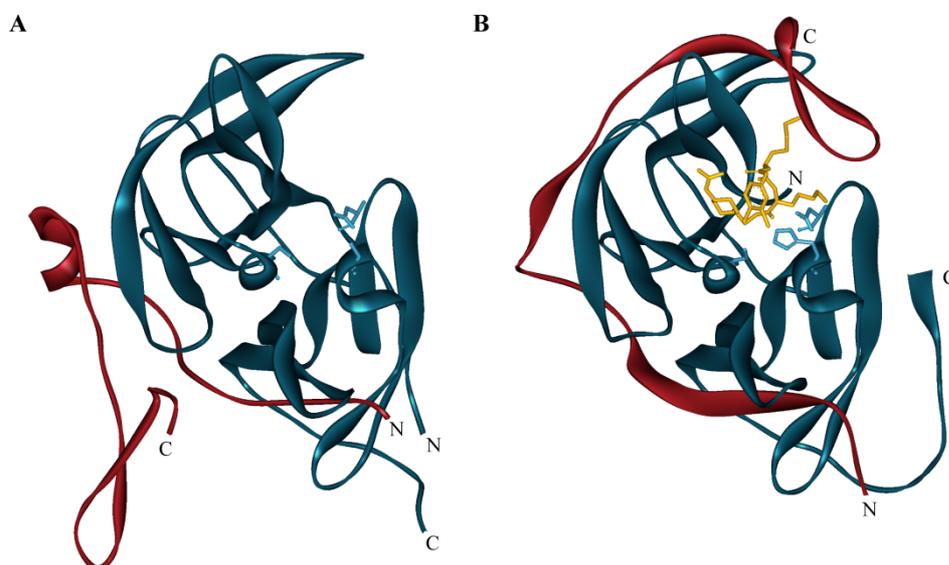


Abbildung 1.10 | Kristallstrukturen der WNV-Protease in (A) offener und (B) geschlossener Konformation. Dargestellt ist jeweils die NS2B-Domäne (rot) und die NS3-Domäne (blau). (A) WNV-Protease H51A ohne Inhibitor (PDB ID: 2GGV) (Aleshin, Shiryayev et al. 2007) und (B) in Anwesenheit eines Peptidmimetika als Inhibitor (gelb) (PDB ID: 2YOL) (Hammamy, Haase et al. 2013). Die katalytische Triade (His 51, Asp 75, Ser 135) ist in hellblau dargestellt. Der Linker zwischen NS2B und NS3 liegt zwischen dem C-Terminus von NS2B und dem N-Terminus von NS3 und konnte aufgrund fehlender Elektronendichte nicht aufgelöst werden.

1.5 Zielsetzung

Diese Arbeit soll neue Einblicke in die Funktionsweise der humanen Blutgruppe B Galactosyltransferase liefern. Zusätzlich sollen neue Wege für die Charakterisierung und Entwicklung von Inhibitoren gegen die West-Nil-Virus Protease geschaffen werden. Bei der GTB sollen unter anderem Bindungsstudien von Substraten, Substratanaloga und eines Glycosyltransferase Inhibitors durchgeführt werden. Desweiteren eignet sich die NMR-Spektroskopie hervorragend, um dynamische Prozesse in atomarer Auflösung und über eine Zeitskala von Pikosekunden bis Sekunden zu untersuchen. Daher sollen sowohl für die GTB, als auch für die WNV-Protease NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Proteindynamik durchgeführt werden.

Für die GTB soll an die Arbeiten von N. Sindhuwinata angeknüpft werden (Sindhuwinata 2012) und die Bindung von Substraten und Substratanaloga genauer untersucht werden. Mit ITC- und STD-NMR-Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Bindung des Donorsubstrats UDP-Gal sowie der Substratanaloga UDP und UDP-Glc enthalpisch getrieben ist und dadurch die ungünstige Änderung der entropischen Beiträge kompensiert. Zusätzlich wurde ein positiver kooperativer Effekt von UDP und H-Dis beobachtet. Da es auf Grund der Umsetzung nicht möglich ist, UDP-Gal und H-Dis zu messen, soll die Kooperativität von UDP-Gal und dem Akzeptoranalogen α -L-Fucp-(1,2)- β -D-(3-desoxy)-Galp-(1,O)-(CH₂)₇CH₃ (3DD) (siehe Abbildung 1.11) bestimmt werden. Dem 3DD fehlt im Gegensatz zum H-Dis die OH-Gruppe, auf die normalerweise die Galactose übertragen wird, weshalb keine Übertragung stattfinden kann. Auch soll die Bindung von UDP-Glc in Anwesenheit des Akzeptors H-Dis bzw. des Akzeptoranalogs 3DD untersucht werden. Die Bindungskonstanten des Donorsubstrats sowie von Donorsubstratanaloga wurden bisher nur mittels STD-NMR-Experimenten bestimmt. Da bei den NMR-Experimenten jedoch nur die Verwendung von Mg²⁺ möglich war, sollen diese Experimente mit SPR-Messungen vervollständigt werden. Hierbei sollen unter anderem die Bindungskonstanten in Anwesenheit von Mn²⁺ und Mg²⁺ bestimmt werden sowie zusätzlich die Messungen mit GTA und AAGlyB durchgeführt werden, um Informationen über Substratspezifitäten zu erhalten.

Neben den Untersuchungen der Substrate und Substratanaloga soll auch die Bindung eines Inhibitors genauer untersucht werden. Der Inhibitor wurde durch ein STD-NMR-Screening gegen die Akzeptorbindungsstelle der GTB einer Fragmentbibliothek identifiziert und ist in Abbildung 1.11 dargestellt (Rademacher, Landstrom et al. 2010). Kristallstrukturen von GTB und AAGlyB und Fragment 382 weisen darauf hin, dass sowohl die Akzeptorbindungsstelle als auch die Bindungsstelle des Metallions belegt wird. Auch zeigen die Kristallstrukturen unterschiedliche starke Bindung des Fragments an die GTB bzw. AAGlyB und auch erste Aktivitätstest weisen auf eine unterschiedlich starke Inhibierung der beiden Enzyme durch das Fragment hin. Daher soll mit Hilfe von SPR-Experimenten sowie Bestimmung der Bindungsepitope mit STD-NMR die Bindung dieses Fragments genauer untersucht werden und durch Vergleich der Bindung an GTA und AAGlyB Informationen über die Spezifität der Blutgruppen Glycosyltransferasen erhalten werden.

Für weitere Aufklärungen der Konformationsdynamik der GTB sollen NMR-spektroskopische Experimente durchgeführt werden. Auch hier soll auf den Arbeiten von N. Sindhuwinata aufgebaut werden. Grundlegend für die Untersuchung der Proteindynamik ist die Zuordnung der Proteinresonanzen. Hierfür wurde für spezielle Zuordnungsexperimente uniform ^2H , ^{13}C , ^{15}N -markierte GTB hergestellt und erste Spektren aufgenommen. Jedoch konnte anhand dieser Spektren von N. Sindhuwinata keine Zuordnung erfolgen. Dies könnte an der Größe der GTB liegen, die als Homodimer mit einem Molekulargewicht von 69 kDa vorliegt. Dadurch sind in den Spektren sehr viele Signale vorhanden und es kommt zu einer sehr starken Signalüberlagerung sowie Intensitätsverlust der Signale. Ein entscheidender Punkt ist der Deuterierungsgrad des markierten Proteins, daher soll in dieser Arbeit ein neues Protokoll der Proteinsynthese getestet werden, um den Deuterierungsgrad zu verbessern. Dies sowie eine höhere Proteinkonzentration in der NMR-Probe könnten die Qualität der Spektren deutlich verbessern und eine Zuordnung der Proteinresonanzen ermöglichen.

Eine weitere Methode ist die selektive ^1H , ^{13}C Markierung von Methylgruppen spezieller Aminosäurereste in einem ansonsten deuterierten Protein. Da die Anzahl gegenüber den Amidgruppen eines Proteins deutlich geringer ist, wird das Spektrum übersichtlicher und verliert an Komplexität. Auch die Sensitivität der Signale wird gesteigert, da die Methylgruppen drei, statt einem Proton wie in den Amidgruppen, aufweisen. In dieser Arbeit sollen die δ^1 -Methylgruppen der Isoleucinseitenketten selektiv markiert werden. Es sind insgesamt zehn Isoleucinreste in der GTB vorhanden, die über das gesamte Protein verteilt sind und somit eine gute Übersicht liefern (siehe Abbildung 1.12 A). Besonders interessant sind Ile 123 und Ile 192. Ile 123 befindet sich in der Donorbindungsstelle und Ile 192 am Rand des internen Loops (siehe Abbildung 1.12 B). Informationen über die Bewegung dieser beiden Methylgruppen könnten hilfreiche Informationen über den Mechanismus der GTB geben. Aufgrund von vorliegenden kinetischen Daten, kann angenommen werden, dass die Konformationsänderungen im Mikro- bis Millisekunden Bereich liegen. Mit diesen spezifisch markierten δ^1 -Methylgruppen der GTB sollen CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente, die speziell diesen Bereich von dynamischen Prozessen erfassen, für die GTB etabliert und durchgeführt werden.

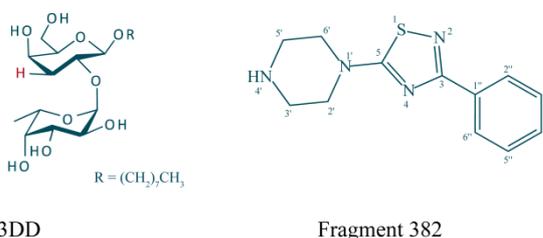


Abbildung 1.11 | α -L-Fucp-(1,2)- β -D-(3-desoxy)-Galp-(1,O)- $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ (3DD) und 3-Phenyl-5-(piperazin-1-yl)-1,2,4-thiadiazol (Fragment 382).

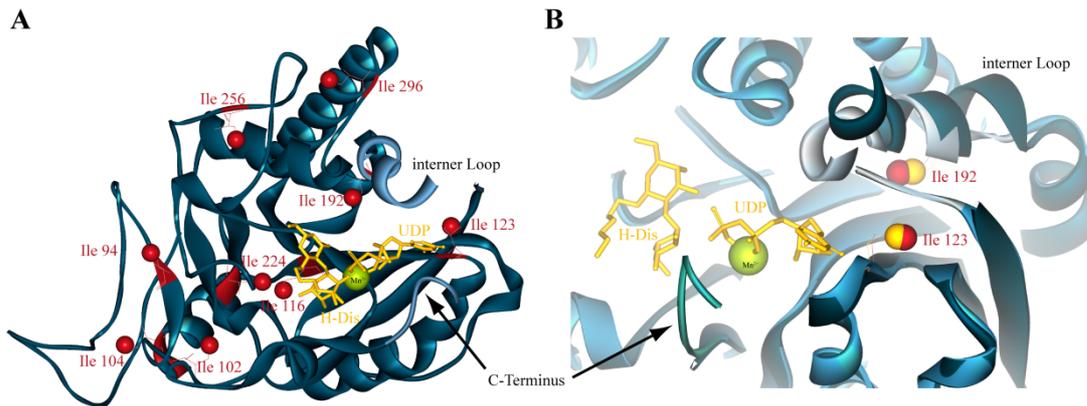


Abbildung 1.12 | Verteilung der Isoleucinreste in GTB. Dargestellt sind jeweils die löslichen katalytischen Domänen. (A) GTB in Anwesenheit von UDP und H-DiS (PDB ID: 2RJ8) (Alfaro, Zheng et al. 2008). Die Verteilung der Isoleucinreste ist in rot dargestellt und die δ 1-Methylgruppen als Kugeln hervorgehoben. Ile 59 ist in der Kristallstruktur nicht aufgelöst und daher nicht gezeigt. In (B) ist die geschlossene Konformation (PDB ID: 2RIT) mit der offenen Konformation der GTB (PDB ID: 2RJ8) überlagert. Gezeigt ist das aktive Zentrum sowie die Bewegung des internen Loops mit Ile 192 und Ile 123 (gelb: offene und rot: geschlossene Konformation). Der interne Loop, der C-Terminus sowie die Substrate sind beschriftet.

Im zweiten Teil der Arbeit, sollen die etablierten CPMG-Relaxations-Dispersionen Experimente auch für die WNV-Protease durchgeführt werden. Hierbei ist vor allem die Bewegung der C-terminalen Domäne von NS2B interessant. Aus Kristallstrukturen ist ersichtlich, dass sich diese sowohl in einem offenen als auch einem geschlossenen Zustand befinden kann (siehe Abbildung 1.10). Der geschlossenen Zustand konnte bei Bindung von Inhibitoren und der offene Zustand in der freien Form beobachtet werden. NMR-Experimente zeigten jedoch, dass die geschlossene Konformation auch ohne Anwesenheit eines Inhibitors vorliegt und die geschlossene Konformation durch Bindung eines Inhibitors lediglich verstärkt wird (Su, Ozawa et al. 2009). Für eine mögliche Inhibition der WNV-Protease, ist es auch möglich, die offene Form durch einen Inhibitor zu stabilisieren und dadurch die Bewegung in die geschlossene, aktive Form zu unterbinden. Für die Entwicklung solcher Inhibitoren, soll in dieser Arbeit eine Grundlage geschaffen werden und die Bewegungen der WNV-Protease im freien sowie im geschlossenen Zustand untersucht werden. Es sollen zwei bekannte Inhibitoren verwendet werden. Zum einem [4-(carbamimidoylsulfanylmethyl)-2,5-dimethylphenyl]-methylsulfanylmethanimidamid (im Folgenden als WNV-Inhibitor bezeichnet, siehe auch Abbildung 1.13), welcher durch ein High-Throughput Docking identifiziert worden war (Ekonomiuk, Su et al. 2009) und bereits genauer mittels NMR-Spektroskopie untersucht wurde (Su, Ozawa et al. 2009; Su, Ozawa et al. 2009).

Eine Kristallstruktur der WNV-Protease in Anwesenheit des WNV-Inhibitors ist bisher noch nicht bekannt. Zum anderen soll Aprotinin verwendet werden. Aprotinin ist ein bekannter pankreatischer Trypsin-Inhibitor (BPTI, *engl.* bovine pancreatic trypsin inhibitor) der bekanntlich flavivirale Proteasen inhibiert. Es handelt es sich hierbei um ein 6,5 kDa großes Polypeptid. In Abbildung 1.14 A ist die Kristallstruktur der WNV-Protease in Anwesenheit von Aprotinin gezeigt. Zusätzlich sind die Isoleucinreste der WNV-Protease hervorgehoben. Wie bei der GTB sind diese auch hier über das gesamte Protein verteilt und eignen sich daher sehr

gut für Dynamikuntersuchungen der WNV-Protease. Von besonders großem Interesse ist das Isoleucin der NS2B-Domäne an Position 68, da dieses sich genau im Scharnier zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Domäne von NS2B befindet (Abbildung 1.14).

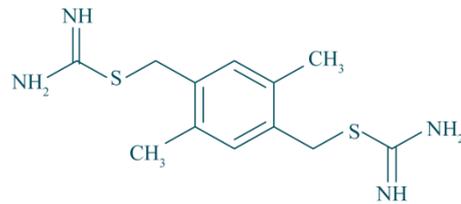


Abbildung 1.13 | [4-(carbamimidoylsulfanylmethyl)-2,5-dimethylphenyl]-methylsulfanylmethanimidamid. Wird im Folgenden als WNV-Inhibitor bezeichnet.

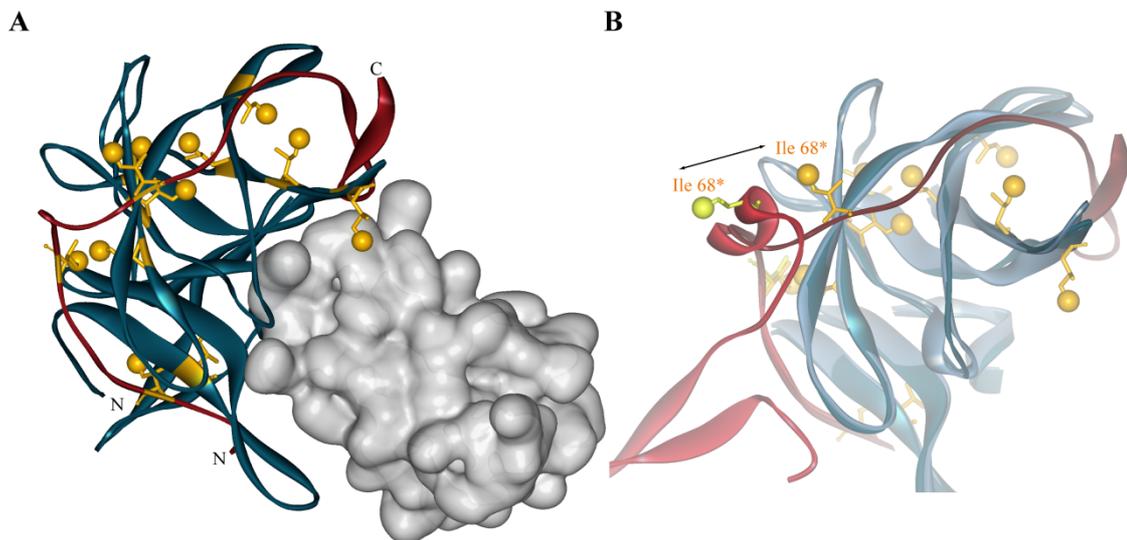


Abbildung 1.14 | Verteilung der Isoleucinreste in der WNV-Protease. (A) Dargestellt ist die WNV-Protease in Anwesenheit von Aprotinin (grau) (PDB ID: 2IJO) (Aleshin, Shiryayev et al. 2007). Die NS2B-Domäne ist in rot und die NS3-Domäne in blau dargestellt. Die Isoleucinreste sind gelb markiert und die δ 1-Methylgruppen als Kugeln hervorgehoben. In (B) ist die WNV-Protease in der offenen Konformation (PDB ID: 2GGV) (Aleshin, Shiryayev et al. 2007) überlagert und zeigt die Positionsveränderung des Isoleucinrestes der NS2B-Domäne an Position 68 vom offenen in den geschlossenen Zustand.

2 Methoden

Für alle Arbeiten wurde, wenn nicht anders angegeben, Reinstwasser verwendet und wird im Folgenden als H₂O bezeichnet. Die für die Arbeiten mit Bakterienkulturen benötigten Nährmedien und Lösungen wurden bei 121 °C für 20 min, Glasgeräte bei 134 °C für 15 min und Kunststoffmaterialien bei 134 °C für 15 min oder bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen wurden durch 0,22 µm Filter steril filtriert. Alle Arbeiten mit Bakterienkulturen wurden steril an einer Bunsenbrennerflamme durchgeführt. Abfälle der Sicherheitsstufe 1 wurden durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C oder für 15 min bei 134 °C inaktiviert. Eine genaue Aufstellung der in der Arbeit verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte ist im Anhang (6.1) zu finden.

2.1 Präparation rekombinanter humaner Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die humane Blutgruppe B Galactosyltransferase untersucht. Zum Vergleich wurden jedoch auch die humane Blutgruppe A N-Acetylgalactosaminyltransferase sowie die Chimäre AAGlyB dieser beiden Enzyme herangezogen. Zusätzlich wurden die beiden Mutanten Ile123Val und Ile192Val der GTA und GTB hergestellt.

2.1.1 Plasmide und Bakterienstamm

Für die Synthese der katalytischen Domäne der Glycosyltransferasen wurde das Plasmid pCWΔlac verwendet. Dieses trägt unter anderem ein Gen mit Ampicillinresistenz und einen lac-Promotor für die Induktion mit IPTG. In dieses Plasmid wurde das entsprechende Gen für die -10GTA bzw. -10GTB von Marcus et al. kloniert (Marcus, Polakowski et al. 2003). Dieses wird von den Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* und *HindIII* flankiert und besteht aus von *E. coli* bevorzugten Codons (Seto, Palcic et al. 1995). Das Insert codiert für die Aminosäuren 64-354 der natürlich vorkommenden GTA bzw. GTB. Das Produkt ist um die cytosolische Domäne, die Transmembranregion sowie 10 weitere Aminosäuren der Stammregion verkürzt. Durch die Klonierung besitzt die sogenannte -10GTA/-10GTB am N-Terminus zusätzlich die Aminosäuren M-A-I-G-E-F-M. Die Mutante -10AAGlyB wurde von der Gruppe von Monica Palcic in Kopenhagen durch Mutation von Gly176Arg, Ser235Gly und Met266Gly im Gen der -10GTB hergestellt (Yamamoto, Lin et al. 2001; Pesnot, Jorgensen et al. 2010). Als Expressionsstamm wurde der *E. coli* Stamm BL21 von Novagen verwendet (Phillips, VanBogelen et al. 1984). Glycerinkulturen von diesen drei Stämmen waren bereits vorhanden und wurden bei -80 °C gelagert. Die beiden Mutanten Ile123Val und Ile192Val der -10GTA/-10GTB wurden durch jeweilige Mutation im Gen der -10GTA/-10GTB hergestellt. Da in dieser Arbeit ausschließlich mit den -10 Varianten gearbeitet wurde, werden diese nachfolgend als „GTA“, „GTB“ und „AAGlyB“ bezeichnet.

2.1.2 Gerichtete Mutagenese

Für die Zuordnung der δ 1-Methylgruppen von Isoleucinseitenketten wurden die beiden Mutanten I123V und I192V der GTB hergestellt. Zusätzlich wurden die Mutanten I123V und I192V der GTA analog zu den GTB Mutanten hergestellt, jedoch in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Plasmidpräparation

Für die gerichtete Mutagenese wird das Plasmid pCW Δ lac-10GTB benötigt. Hierfür wurden 20 ml LB-Medium (siehe Tabelle 2.1) mit 100 μ g/ml Ampicillin mit der entsprechenden Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 230 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 ml der Zellsuspension durch mehrmaliges zentrifugieren bei 16.000 x g und 4 °C geerntet. Die Plasmidpräparation wurde nach dem Protokoll des QIAprep Spin Miniprep Kits von Qiagen durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 30 μ l autoklaviertem H₂O. Die Konzentration der Plasmide wurde spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Wobei eine optische Dichte bei 260 nm von 1 einer Konzentration von 50 μ g/ml einer doppelsträngigen DNA entspricht.

Mutagene PCR

Die Mutagenese wurde nach dem Protokoll des QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kits von Agilent Technologies durchgeführt. Die für die Mutagenese verwendeten Primer wurden bei Eurofins MWG Operon bestellt und sind im Anhang (siehe 6.2.1) dargestellt. Die Verwendung der Primer führt bei der mutagenen PCR auf dem codierenden Strang des Plasmids pCW Δ lac-10GTB die Substitution 187A>G, auf Proteinebene die Mutation I123V, bzw. die Substitution 394A>G, auf Proteinebene die Mutation I192V, ein. Die verwendeten Primer waren I123V_{for} und I123V_{rev} bzw. I192V_{for} und I192V_{rev}. Für die Einführung der Mutationen wurden jeweils zwei Reaktionsansätze mit je 50 ng des Plasmids pCW Δ lac-10GTB angesetzt.

Folgende Bedingungen wurden für die PCR verwendet:

- 30 Sek bei 95 °C
 - 30 Sek bei 95 °C
 - 60 Sek bei 55 °C
 - 360 Sek bei 68 °C
- } 19 Zyklen
- bis zur Entnahme bei 4 °C

Die Ansätze wurden anschließend mit dem Restriktionsenzym *Dpn* I behandelt und bis zum folgenden Arbeitsabschnitt bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.1 | Verwendete Vollmedien.

Medium	Zusammensetzung	
Super Optimal Broth (SOB)-Medium (pH 7)	20 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	0,5 g/l	NaCl
	2,5 mM	KCl
		Steriler Zusatz direkt vor Verwendung:
	10 mM	MgCl ₂
SOB with Catabolite repression (SOC)-Medium	100 %	SOB-Medium
	20 mM	Glucose
Lysogeny Broth (LB)-Medium	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
Terrific Broth (TB)-Medium	12 g/l	Trypton
	24 g/l	Hefeextrakt
	0,4%	Glycerin
	6 g/l	Na ₂ HPO ₄
	3 g/l	KH ₂ PO ₄
	1 g/l	NH ₄ Cl
	0,5 g/l	NaCl
		Steriler Zusatz direkt vor Verwendung:
	1m M	MgCl ₂
	0,1 mM	CaCl ₂
	5 mg/l	Thiamin
	0,2 %	Glucose
0,4 %	Casaminosäuren	
100 µg/ml	Ampicillin	

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die Transformation des mutierten Plasmids in *E. coli* Zellen soll mittels Elektroporation stattfinden. Hierfür werden elektrokompetente *E. coli* DH5 α und BL21 (Novagen) Zellen benötigt. Diese wurden nach dem Protokoll von Sambrook et. al (Sambrook, Fritsch et al. 1989) hergestellt. Eine 10 ml Vorkultur aus SOB-Medium (Tabelle 2.1) ohne Mg²⁺ wurde mit der entsprechenden Glycerinkultur angeimpft und über Nacht in einem Inkubator bei 37 °C und 230 rpm wachsen gelassen. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml SOB-Medium angeimpft und bis zur log-Phase mit einer OD₆₀₀ von etwa 0,6-0,8 bei 37 °C und 230 rpm wachsen gelassen. Die Zellsuspension wurde sofort auf Eis gekühlt, um die Stoffwechselaktivität herabzusetzen und anschließend für 10 min bei 2.600 x g und 4 °C zentrifugiert. Folgende Schritte werden alle bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Um die Ionenstärke zu reduzieren wurde das Pellet in 500 ml 10 % Glycerin aufgenommen und erneut Zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit 200 ml 10 % Glycerin wiederholt. Das Pellet wurde in einem Endvolumen von 3 ml 10 % Glycerin aufgenommen, in je 100 µl aliquotiert und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren und für maximal einen Monat bei -80 °C gelagert.

Transformation

Elektrokompetente *E. coli* DH5a Zellen wurden mit der Plasmid-DNA aus der mutagenen PCR transformiert. Hierfür wurden je 100 µl frisch aufgetaute elektrokompetente Zellen mit 1 µl und 3 µl des vorgekühlten Plasmids pCWΔlac-10GTB_I123V bzw. pCWΔlac-10GTB_I192V versetzt. In einer vorgekühlten 1 mm Elektroporationsküvette wurden die Zellen im Elektroporator bei 400 Ω, 25 µF und 1,75 kV poriert und sofort in 1 ml SOC-Medium (siehe Tabelle 2.1) aufgenommen. Die Zellen wurden 1 Stunde bei 37 °C und 500 rpm inkubiert und anschließend bei 12.000 rpm geerntet. Die Pellets wurden in 200 µl LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin resuspendiert und je 50 µl und 100 µl auf eine LB-Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Es wurden je drei Kolonien pro Klon gepickt und eine 20 ml Kultur in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C und 230 rpm inkubiert. Anschließend wurde erneut eine Plasmidpräparation durchgeführt. Zur Verifizierung der gerichteten Mutagenese wurden die Plasmidsequenzen in den entsprechenden Abschnitten kontrolliert. Dies erfolgte durch Sequenzierung der Plasmide durch die Firma Eurofins, Ebersberg mit dem GTB_{for} Primer (siehe 6.2.2). Die Plasmide mit korrekter Mutagenese wurden anschließend in elektrokompetente *E. coli* BL21 Zellen transformiert und Glycerinkulturen angelegt, welche bei -80 °C gelagert wurden. Die Klone erhielten für institutsinterne Dokumentation folgende Nummerierung: 108: -10GTA_I123V, 109: -10GTA_I192V, 110: -10GTB_I123V und 111: -10GTB_I192V.

2.1.3 Proteinbiosynthese

Für Isotherme Titrationskalorimetrie, Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie sowie Sättigungs-Transfer-Differenz-NMR Experimente wurden nicht markierte Proteinproben von GTA, GTB und AAGlyB hergestellt. Für Struktur- sowie Dynamikuntersuchungen der GTB wurden unterschiedliche Isotopenmarkierungen in das Protein eingefügt: u-²H, ¹⁵N, u-²H, ¹³C, ¹⁵N, u-²H, ¹⁵N; Ileδ1-{¹³CH₃}. Für die Synthese isotopenmarkierter GTB wurde die Methode von Tugarinov et al. (Tugarinov, Kanelis et al. 2006) getestet und mit der bisher verwendeten Methode von Marley et al. (Marley, Lu et al. 2001) verglichen. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Sophie Weißbach (Institut für Chemie).

Kulturmedien

Die Kulturmedien wurden wie in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 beschrieben angesetzt. Das TB-Medium wurde von Dr. H. Peters (Institut für Chemie) speziell für die Synthese von GTB und GTA optimiert. Die Herstellung D₂O-haltiger Lösungen erfolgte durch Lösung der Substanz in D₂O (99,85 % oder 99,9 % D), lyophilisieren und erneuter Aufnahme in D₂O. Die 100fache Vitaminlösung in D₂O wurde selber angesetzt und enthielt je 0,1 mg/ml D-Biotin, Cholinchlorid, Folsäure, Nicotinamid, D-Pantothensäure, Pyridoxalhydrochlorid, Thiaminhydrochlorid, Vitamin B₁₂, 0,01 mg/ml Riboflavin sowie 0,2 mg/ml myo-Inositol und 8,5 mg/ml NaCl. Für die selektive Markierung der δ1-Methylgruppe von Isoleucin wurde der Vorläufer 2-Keto-3-d₂-4-¹³C-butyrat verwendet. Für die ersten Versuche wurde dieser von

Remco Sprangers (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) zur Verfügung gestellt. Dieser sowie alle weiteren wurden aus 2-Keto-4-¹³C-butyrat hergestellt indem die ¹H an Position 3 quantitativ in ²H ausgetauscht wurden. Hierfür wurden 60 mg 2-Keto-4-¹³C-butyrat in 200 ml D₂O mit 0,57 g KH₂PO₄ gelöst und der pH Wert von etwa 4,9 mit NaOD auf 10,5 eingestellt. Die Lösung wurde über Nacht bei 45 °C inkubiert und am nächsten Tag wurden 1,2 g Na₂HPO₄ x 2H₂O hinzugegeben und der pH auf 7,4 eingestellt. Alle Substanzen und Lösungen in D₂O die hitzeempfindlich sind, wurden mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert. Alle weiteren Lösungen wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Tabelle 2.2 | Verwendete Minimalmedien in D₂O. Angegeben ist jeweils die finale Zusammensetzung der verwendeten Minimalmedien für die unterschiedlichen Markierungsmuster.

Zusammensetzung	u- ² H, ¹⁵ N	u- ² H, ¹³ C, ¹⁵ N	u- ² H, ¹⁵ N,{Ileδ1- ¹³ CH ₃ }
Eco <i>E. coli</i> OD 2 DN	20 %		20 %
Eco <i>E. coli</i> OD 2 CDN		20 %	
Na ₂ HPO ₄	6 g/l	6 g/l	6 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l	3 g/l	3 g/l
NaCl	0,5 g/l	0,5 g/l	0,5 g/l
¹⁵ NH ₄ Cl	0,1 %	0,1 %	0,1 %
MgCl ₂	1 mM	1 mM	1 mM
CaCl ₂	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM
MgSO ₄	4 mM	4 mM	4 mM
FeCl ₃ /CoCl ₂	1 µM	1 µM	1 µM
u- ² H-Glucose	2 g/l		2 g/l
u- ² H, ¹³ C-Glucose		2 g/l	
Thiamin	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml
Vitaminlösung	1x	1x	1x
Ampicillin	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
2-Keto-3-d ₂ -4- ¹³ C-butyrat			60 mg/l

Synthese von unmarkierter GTA, GTB und AAGlyB

Die Synthese der drei Proteine GTA, GTB sowie AAGlyB wurde identisch durchgeführt. Die Herstellung erfolgte in Schüttelkolben mit Schikanen, die zu maximal einem viertel gefüllt waren. Der Verlauf des Bakterienwachstums wurde durch Messung der OD bei 600 nm verfolgt.

Für die Vorkultur wurden 40 ml TB-Medium (siehe Tabelle 2.1) mit der entsprechenden *E. coli* Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 230 rpm inkubiert. Mit dieser Kultur wurde anschließend eine Hauptkultur von 1l TB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Während der Inkubation bei 30 °C und 230 rpm wurde der pH-Wert mit pH-Papier überprüft und gegebenenfalls mit 8 M Natronlauge auf einen pH von 7 eingestellt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 wurde die Expression des Gens mit 1 mM IPTG induziert. Nach etwa 24 h wurden die Zellen durch 20-minütige Zentrifugation bei 4225 x g und 4 °C geerntet und das Pellet bei -20 °C eingefroren.

Synthese von isotopenmarkierter GTB

Die Synthese von isotopenmarkierter GTB wurde mit zwei unterschiedlichen Protokollen durchgeführt. Zuerst beschrieben und für $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N markierte GTB verwendet wurde das Protokoll nach Marley et al. (Marley, Lu et al. 2001).

Hierbei wurden die Zellen erst in Vollmedium wachsen gelassen um eine gewisse Zellmasse zu erhalten. Anschließend wurden diese in Minimalmedium umgesetzt und die Synthese des Proteins induziert. Zunächst wurde eine 50 ml Vorkultur in TB-Medium mit der entsprechenden Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 230 rpm inkubiert. Mit dieser Kultur wurde anschließend eine Hauptkultur von 1 l TB-Medium auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und bei 30 °C und 230 rpm bis zu einer OD_{600} von 1 wachsen gelassen. Anschließend fand die Umsetzung auf Minimalmedium statt. Hierfür wurden die Zellen in sterilen Zentrifugenbechern bei 4500 x g und 8 °C für 15 min abgetrennt, in einer Lösung aus 6 g/l Na_2HPO_4 , 3 g/l KH_2PO_4 und 0,5 g/l NaCl in H_2O aufgenommen und erneut abgetrennt. Dieser Waschvorgang wurde zweimal mit D_2O -haltiger Lösung wiederholt. Das Bakterienpellet wurde in 250 ml des jeweiligen Minimalmediums (siehe Tabelle 2.2) gelöst. Dieser Schritt enthielt jedoch anstelle von d_7 -Glucose nicht markierte Glucose für beide Ansätze. Die Zellen wurden erneut bei 37 °C und 230 rpm inkubiert. Bei einer OD_{600} von etwa 6 wurden diese bei 4500 x g und 8 °C für 15 min abgetrennt. Das Pellet wurde in 500 ml des jeweiligen finalen Minimalmediums gelöst und bei 37 °C und 230 rpm für 1-2 h wachsen gelassen bevor mit 1 mM IPTG induziert wurde. Die Zellen wurden nach maximal 20 h durch 20-minütige Zentrifugation bei 5225 x g und 4 °C geerntet und das Pellet bei -20 °C eingefroren.

Mit einer weiteren etwas abgewandelten Methode von Tugarinov et al. (Tugarinov, Kanelis et al. 2006) wurde $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -, $u\text{-}^2\text{H}$ -, ^{13}C , ^{15}N - sowie $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , {Ile δ 1- $^{13}\text{CH}_3$ }-markierte GTB hergestellt. Hier unterschieden sich die Volumina der unterschiedlichen Ansätze: $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N 500 ml, $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N 1 l und $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , {Ile δ 1- $^{13}\text{CH}_3$ } 100 ml sowie 200 ml. Im Folgenden ist ein Ansatz für 100 ml beschrieben und wurde mit den entsprechenden Mengen analog für die weiteren Volumina durchgeführt.

Hierbei wurden die Zellen direkt in Minimalmedium wachsen gelassen und mit der Zeit jeweils frisches Minimalmedium zugesetzt. Alle Inkubationsschritte fanden bei 37 °C und 230 rpm statt. Zunächst wurde eine 40 ml Vorkultur in TB-Medium mit der entsprechenden Glycerinkultur angeimpft und über Nacht inkubiert. Ein bestimmtes Zellvolumen wurde für 10 min bei 1200 x g und Raumtemperatur herunter zentrifugiert um nach dem Lösen des Pellets in 20 ml Minimalmedium eine OD_{600} von 0,1 zu erhalten. Das Pellet wurde in 20 ml Minimalmedium gelöst und bis zu einer OD_{600} von 0,6 inkubiert. Anschließend wurde ein Zellvolumen für 15 min bei 1200 x g und Raumtemperatur herunter zentrifugiert und in 10 ml mit einer OD_{600} von 0,1 gelöst und bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,5 inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit Minimalmedium auf ein Volumen von 20 ml verdünnt und erneut bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,5 inkubiert. Die Kulturen ohne Seitenkettenmarkierung wurden anschließend mit Minimalmedium auf 100 ml verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,3-0,4 inkubiert. Bei der Markierung der Seitenketten wurde zunächst mit Minimalmedium auf ein Volumen von 80 ml verdünnt, bis zu einer OD_{600} von 0,25-0,3 inkubiert, und anschließend mit 20 ml der 2-Keto-3-

d_2 -4- ^{13}C -butyrat-Lösung mit einer finalen Konzentration von 60 mg/l versetzt. Bei einer OD_{600} von 0,3-0,4 wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Zellen nach maximal 20 h durch 20-minütige Zentrifugation bei 5225 x g und 4 °C geerntet und das Pellet bei -20 °C eingefroren.

2.1.4 Proteinreinigung

Aus den eingefrorenen Pellets konnte anschließend das Protein extrahiert werden. Hierfür wurde die Methode verwendet, die Seto et al. (Seto, Compston et al. 2000) speziell für die GTB-Reinigung entwickelt haben. Diese ist im Folgenden Abschnitt dargestellt. Es beruht auf der Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Affinitätschromatographie. Für die Säulenchromatographien wurden entweder mit einer einfachen Peristaltikpumpe mit angeschlossenen UV-Detektor, Schreiber und Fraktionssammler oder mit einem ÄKTA-System durchgeführt. Alle Reinigungsschritte wurden mit gekühlten Puffern und bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt.

Reinigungspuffer

Die verwendeten Puffer für die Reinigung wurden mit H₂O angesetzt und sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. DTT und der Proteaseinhibitor wurden erst kurz vor Gebrauch hinzugegeben. Für die Proteinreinigung mit dem ÄKTA-System wurden alle Puffer vor Gebrauch mit einem 0,45 µm Filter filtriert und entgast.

Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und in ca. 50 ml pro 10 g Zellpellet Resuspensionspuffer (siehe Tabelle 2.3) resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer French Press bei einem Druck von 19.200 psi aufgeschlossen. Das Lysat wurde bei 110.000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert um die Zellfragmente abzutrennen. Der Überstand wurde für den Gebrauch im ÄKTA-System mit einem 0,8 µm Filter filtriert und anschließend mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Ionenaustauschchromatographie

Als erster Schritt der Protein-Reinigung wurde eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt. Hierbei diente die SP-Sepharose Fast Flow (FF), mit ihren negativ geladenen Sulfopropylgruppen der Sepharosematrix, als starker Kationenaustauscher. Da die GTA und GTB einen theoretischen pI von 8,27 und die AAGlyB einen theoretischen pI von 8,58 besitzen, lagen diese bei einem pH-Wert der Puffer von 6,9 positiv geladen vor. So konnten sie an die negativ geladenen Sulfopropylgruppen der Sepharosematrix binden. Die Elution erfolgte durch eine Erhöhung der Salzkonzentration.

Für diesen Reinigungsschritt wurde etwa 150 ml SP-Sepharose FF eingesetzt und in eine Säule für das entsprechende System gepackt. Bei der Reinigung mit dem ÄKTA-System betrug die Flussrate durchgehen 1 ml/min. Die folgenden Reinigungsschritte sind bei beiden Systemen

vergleichbar. Sonstige angegebene Flussraten beziehen sich auf die Verwendung der Peristaltikpumpe. Die Säule mit dem Kationenaustauscher wurde mit 2-3 Säulenvolumina mit einer Flussrate von 5 ml/min mit SP-Sepharose-Waschpuffer äquilibriert. Anschließend wurde das Zelllysate mit ebenfalls 5 ml/min auf die Säule geladen, der Durchfluss aufgefangen und erneut drei- bis viermal mit 0,5 ml/min in einem Kreislauf auf die Säule geladen. Nach dem Auftragen des Lysats wurde die Säule bei 3-5 ml/min solange mit SP-Sepharose-Waschpuffer gewaschen bis die Extinktion des Durchflusses bei 280 nm eine konstante Basislinie zeigte. Die Elution erfolgte mit dem SP-Sepharose-Elutionspuffer bei einer Flussrate von 5 ml/min in Fraktionen von 7-9 ml ebenfalls bis zu einer konstanten Basislinie. Die Fraktionen, die Protein enthielten wurden anhand eines qualitativen Bradford-Test (siehe 2.3.2) ermittelt, vereinigt und anschließend durch Affinitätschromatographie weiter gereinigt.

Die Regeneration der SP-Sepharose FF erfolgte nach institutsinterner SOP (*engl.* Standard Operating Procedure). Dabei wurde das Säulenmaterial nacheinander mit je drei Säulenvolumina in folgender Reihenfolge gewaschen: H₂O, 8 M Harnstoff, H₂O, 2 M NaCl, H₂O, 1 M NaOH, H₂O (bis zu einem neutralen pH-Wert), 30 % 2-propanol, H₂O und 30 % Ethanol. Die Lagerung des Säulenmaterials erfolgte bei 4 °C in entweder 30 % Ethanol oder 50 mM MOPS, pH 6,9 bei 4 °C und 0,05 % Natriumazid.

Tabelle 2.3 | Verwendete Puffer für die Proteinreinigung von GTA, GTB und AAGlyB. Die Puffer wurden bei 25 °C auf einen pH-Wert von 6,7 eingestellt, dies entspricht einem pH-Wert von 6,9 bei 4 °C. DTT und der Proteaseinhibitor wurden erst kurz vor Gebrauch frisch hinzu gegeben.

Puffer	Zusammensetzung	
Resuspensionspuffer	50 mM	MOPS
	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	1 Tablette Proteaseinhibitor pro 50 ml Puffer	
SP-Sepharose-Waschpuffer	50 mM	MOPS
	1 mM	DTT
SP-Sepharose-Elutionspuffer	50 mM	MOPS
	500 mM	NaCl
	1 mM	DTT
UDP-Hexanolamin-Sepharose-Waschpuffer	50 mM	MOPS
	500 mM	NaCl
	5 mM	MnCl ₂
	1 mM	DTT
UDP-Hexanolamin-Sepharose-Elutionspuffer	50 mM	MOPS
	500 mM	NaCl
	8 mM	UDP
	5 mM	MnCl ₂
	1 mM	DTT

Affinitätschromatographie

Im zweiten Schritt der GTB-Reinigung wurden die restlichen im SP-Sepharose-Eluat vorhandenen Biomoleküle von der GTB getrennt. Hierfür wurde eine UDP-Hexanolamin-Sepharose-Säule verwendet. Die GTB bindet in Anwesenheit von zweiwertigem Mn^{2+} an ihren natürlichen Liganden UDP und alle weiteren unerwünschten Biomoleküle werden heruntergewaschen. Die Elution erfolgt durch Zugabe von UDP in den Laufpuffer.

Für diesen Reinigungsschritt wurde etwa 15-20 ml UDP-Hexanolamin-Sepharose eingesetzt und in eine Säule für das entsprechende System gepackt. Bei der Reinigung mit dem ÄKTA-System betrug die Flussrate durchgehen 0,4 ml/min. Die folgenden Reinigungsschritte sind ebenfalls bei beiden Systemen vergleichbar. Die angegebenen Flussraten beziehen sich auf die Verwendung der Peristaltikpumpe. Das Säulenmaterial wurde mit 2-3 Säulenvolumina mit einer Flussrate von 1 ml/min mit UDP-Hexanolamin-Sepharose-Waschpuffer äquilibriert. Anschließend wurden die vereinigten Fraktionen des SP-Sepharose-Eluats mit 5 mM $MnCl_2$ versetzt und mit einer Flussrate von 0,4 ml/min auf die Säule geladen. Nach dem Waschen mit UDP-Hexanolamin-Sepharose-Waschpuffer bei 0,4 ml/min bis zu einer konstanten Extinktion des Durchflusses bei 280 nm wurde die GTB mit UDP-Hexanolamin-Sepharose-Elutionspuffer bei 1 ml/min in 3-5 ml großen Fraktionen eluiert. Die Fraktionen, die Protein enthielten, wurden anhand eines qualitativen Bradford-Test (siehe 2.3.2) ermittelt und vereinigt.

Die Regeneration der UDP-Hexanolamin-Sepharose erfolgte nach institutsinterner SOP. Dabei wurde das Säulenmaterial nacheinander mit je 10-20 Säulenvolumina in folgender Reihenfolge gewaschen: H_2O , 8 M Harnstoff, H_2O und 30 % Ethanol. Die Lagerung des Säulenmaterials erfolgte bei 4 °C in entweder 30 % Ethanol oder 50 mM MOPS, pH 6,9 bei 4 °C und 0,05 % Natriumazid.

Dialyse

Durch Dialyse wurde das UDP, das durch die Elution in der Affinitätschromatographie in die GTB-Lösung gelangte, wieder entfernt. Hierfür wurde die Proteinelösung in einen Dialyseschlauch oder Slide-A-Lyzer mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa gefüllt und zweimal für 24 h gegen 4 l des entsprechenden GTB-Dialysepuffer (siehe Tabelle 2.4) dialysiert. Den isotopenmarkierten GTB-Proben wurde vor Dialyse 8 mM EDTA zur Komplexierung des Mn^{2+} hinzugegeben und anschließend anstelle von GTB-Dialysepuffer direkt gegen GTB-Phosphatpuffer dialysiert (siehe Tabelle 2.4). Die GTB-Lösungen wurden in den jeweiligen Puffern bei 4-8 °C gelagert.

Tabelle 2.4 | Verwendete Dialysepuffer in H₂O. Der Puffer wurde bei 25 °C auf einen pH-Wert von 6,7 eingestellt, dies entspricht einem pH-Wert von 6,9 bei 4 °C. DTT wurde erst kurz vor Gebrauch frisch hinzu gegeben.

Puffer	Zusammensetzung	
GTB-Dialysepuffer	50 mM	MOPS
	100 mM	NaCl
	5 mM	MnCl ₂
	1 mM	DTT
GTB-Phosphatpuffer	25 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	2-Mercaptoethanol

2.2 Präparation rekombinanter West-Nil-Virus Protease

In dieser Arbeit wurde neben den Glycosyltransferasen zusätzlich die Protease des West-Nil-Virus untersucht. An diesem System konnten die Relaxations-Dispersions Messungen getestet werden. Diese wurden mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt und dienten zusätzlich als gute Vergleichsmöglichkeit der Messungen an der GTB.

2.2.1 Plasmide und Bakterienstämme

Für die Synthese der WNV-Protease wurden zwei unterschiedliche Vektoren verwendet, die beide für das gleiche Gen der rekombinanten WNV-Protease codieren und unter anderem ein Gen für Ampicillinresistenz und einen lac-Promotor für die Induktion mit IPTG tragen. Bei dem ersten Vektor handelt es sich um den Vektor pQE60. Er codiert für die 45 Aminosäuren (52-96) von NS2B, die über einen flexiblen Linker (Gly)₄-Ser-(Gly)₄ mit 184 Aminosäuren des N-terminalen Teils von NS3 verbunden sind. Zudem enthält das Gen eine Punktmutation vom C-terminalen Lysin von NS2B (K45A), dies verhindert die autoproteolytische Spaltung (Shiryayev, Aleshin et al. 2007). Aus Reinigungszwecken befindet sich am C-terminalen Ende eine 6-fache Histidinsequenz (His-Tag). Als Expressionsstamm wurde hier der *E. coli* BL21 gold (DE3) verwendet und vom Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck, zur Verfügung gestellt (Hammamy, Haase et al. 2013). Bei dem zweiten Vektor handelt es sich um einen pET22b-Vektor. Er codiert für dieselbe Sequenz wie der erste Vektor jedoch mit der Ausnahme, dass zwei Aminosäuren zwischen C-Terminus von NS3 und dem His-Tag fehlen. Als Expressionsstamm wurde hier der *E. coli* BL21 (DE3) verwendet und von T. Schöne im Rahmen seiner Masterarbeit hergestellt und für diese Arbeiten zu Verfügung gestellt (Schöne 2014).

2.2.2 Proteinbiosynthese

Für die Relaxations-Dispersions Messungen der δ 1-Methylgruppen der Isoleucin Seitenketten wurde das Protein uniform ²H, ¹⁵N und zusätzlich selektiv die δ 1-Methylgruppender Isoleucine ¹³CH₃ markiert.

Kulturmedien

Die Kulturmedien für die Proteinbiosynthese der WNV-Protease waren identisch mit denen für die Biosynthese der Glycosyltransferasen und sind im Abschnitt 2.1.3 sowie in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 zu finden.

Synthese isotopenmarkierter WNV-Protease

Es wurden drei Ansätze der $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Protease nach dem Protokoll von Tugarinov et al. (Tugarinov, Kanelis et al. 2006) wie im Abschnitt 2.1.3 bereits für GTB beschrieben hergestellt. Die drei Ansätze unterschieden sich im Volumen, den verwendeten Vektoren sowie der Inkubationstemperatur nach der Induktion. Für das Konstrukt im pQE60 Vektor wurde eine 100 ml und für das Konstrukt im pET22b Vektor eine 300 ml und 500 ml Kultur hergestellt. Bei der letztgenannten Kultur wurde zusätzlich bei der Inkubationsphase nach der Induktion mit IPTG die Temperatur auf 17 °C reduziert und die Zellen, bis sie die stationäre Phase erreicht hatten, wachsen gelassen. Dies sollte zu einer größeren Ausbeute an Protein führen und war nach etwa 45 h der Fall. Die nach der Zellernte erhaltenen Pellets wurden bei -20 °C eingefroren.

2.2.3 Proteinreinigung

Aus den eingefrorenen Pellets konnte anschließend das Protein extrahiert werden. Hierfür wurde das Protokoll, wie in Hammamy et al. (Hammamy, Haase et al. 2013) beschrieben, durchgeführt. Die Reinigung beruht auf einer Kationen-Affinitätschromatographie an die eine Größenausschlusschromatographie angeschlossen wird. Die Reinigung der WNV-Protease des Pellets der 100 ml Kultur, hergestellt mit dem Vektor pQE60, wurde von Caroline Haase (Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck) durchgeführt. Alle weiteren Pellets wurden mit einem ÄKTA-System mit gekühlten Puffern und bei 4 °C oder auf Eis gereinigt.

Reinigungspuffer

Die verwendeten Puffer für die Reinigung wurden mit H₂O angesetzt und sind in Tabelle 2.5 aufgeführt. Die Proteinreinigung fand mit dem ÄKTA-System statt und alle Puffer wurden vor dem Gebrauch mit einem 0,45 µm Filter filtriert und entgast.

Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und in ca. 35 ml Lysepuffer (siehe Tabelle 2.5) resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer French Press bei einem Druck von 20.000 psi aufgeschlossen. Das Lysat wurde bei 110.000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert um die Zellfragmente abzutrennen. Der Überstand wird für den Gebrauch im ÄKTA-System mit einem 0,8 µm Filter filtriert und anschließend mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Tabelle 2.5 | Verwendete Puffer für die Proteinreinigung von WNV-Protease. Die Puffer wurden auf einen pH-Wert von 8,5 bei 4 °C eingestellt.

Puffer		Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM	TRIS / HCl pH 8,5
	5 %	Glycerol
Elutionspuffer	50 mM	TRIS / HCl pH 8,5
	5 %	Glycerol
	250 mM	Imidazol
Größenausschlusschromatographiepuffer (SEC-Puffer)	25 mM	TRIS / HCl pH 8,5
	5 %	Glycerol

Kationen-Affinitätschromatographie

Die Kationen-Affinitätschromatographie war der erste Schritt in der WNV-Protease Reinigung und wurde mit einer Ni²⁺-chelatierenden Nitrilotriessigsäure-Sepharose-Säule (Ni-NTA-Säule) durchgeführt. Hierbei bindet der His-Tag der WNV-Protease an die zweiwertigen Nickelionen in der Säule und ungebundene Proteine werden herunter gewaschen. Die Elution erfolgt anschließend mit Imidazol.

Für diesen Reinigungsschritt wurden 5 ml Ni-NTA eingesetzt. Die Säule wurde zunächst bei einer Flussrate von 1 oder 1,5 ml/min mit drei Säulenvolumina H₂O gewaschen und anschließend mit zehn Säulenvolumina Lysepuffer (Tabelle 2.5) äquilibriert. Anschließend wurde das Zellysate mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule geladen und mit zehn Säulenvolumina alle ungebundenen Proteine mit Lysepuffer von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 1 ml/min in 3 ml Fraktionen mit einem Gradienten von 0 mM bis 250 mM Imidazol (Lysepuffer/Elutionspuffer). Die Fraktionen die Protein enthielten wurden anhand einer SDS-Page (siehe 2.3.1) ermittelt und vereinigt. Diese wurden anschließend durch Zentrifugation mit einer Filtereinheit mit einem Ausschlussgewicht von 10 kDa auf ein Volumen von 2 ml eingeengt.

Die Säule wurde anschließend erst mit drei Säulenvolumina H₂O dann mit drei Säulenvolumina 20 % Ethanol gewaschen und bei 4 °C gelagert.

Größenausschlusschromatographie

Im zweiten Schritt der WNV-Protease Reinigung wurden die restlichen im Ni-NTA-Eluat vorhandenen Biomoleküle mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie getrennt. Hierfür wurde eine vorgepackte Chromatographiesäule (HiLoad 26/600 SuperdexTM 75 pepgrade von GE Healthcare Life Science) bestehend aus einer Matrix aus Dextran und hoch vernetzter Agarose verwendet.

Die Säule wurde zuerst bei einer Flussrate von 2 ml/min mit einem Säulenvolumen H₂O gewaschen und bis zu einer stabilen Basislinie bei 280 nm mit SEC-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die 2 ml Proteinlösung aus dem Eluat der Ni-NTA mit 0,5 ml/min auf die

Säule aufgetragen und mit insgesamt 300 ml SEC-Puffer eluiert. Die Fraktionen, die Protein enthielten wurden anhand einer SDS-Page (siehe 2.3.1) ermittelt und vereinigt.

Die Säule wurde anschließend erst mit einem Säulenvolumen H₂O und dann mit 20 % Ethanol gewaschen und darin bei 4 °C gelagert.

2.3 Proteinanalytik

Die erfolgreiche Reinigung und die Qualität der Proteinproben wurden durch Bestimmung der Reinheit, Konzentration und Aktivität überprüft. Die Reinheit konnte grob mit einer SDS-PAGE (siehe 2.3.1), die Konzentration mit einem NanoDrop Spektralphotometer (siehe 2.3.2) und dem Bradford-Test (siehe 2.3.3) und die Enzymaktivität mit einem radiochemischen Assay (siehe 2.3.4) ermittelt werden.

2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE trennt Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf. Mit Hilfe der SDS-PAGE konnten so grobe Verunreinigungen der Proteinproben mit anderen Proteinen ausgeschlossen werden. Hierfür wurde ein 12 %iges Polyacrylamid-Trenngel für GTB-Proben und ein 15 %iges für die WNV-Protease-Proben mit einem 6 %igen Polyacrylamidgel-Sammelgel nach dem Lämmli-System verwendet (Tabelle 2.6) (Laemmli 1970). Die Proben wurden jeweils mit reduzierendem bzw. nicht-reduzierendem Probenpuffer (siehe Tabelle 2.7) versetzt und für 15 min bei 85 °C denaturiert.

Tabelle 2.6 | SDS-Polyacrylamid-Gele. Die Mengen beziehen sich auf die Herstellung für 2 Gele. Die Zugabe von TEMED startet die Polymerisation und erfolgt zuletzt.

	Trenngel (12 %)	Trenngel (15 %)	Sammelgel (6 %)
Rotiphorese [®] Gel 30	4 ml	5 ml	1 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	
1,5 M Tris, pH 6,8			1,25 ml
H ₂ O	3,2 ml	2,2 ml	2,58 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	50 µl
87 % Glycerin	200 µl	200 µl	100 µl
20 % Ammoniumpersulfat	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Abhängig vom Proteingehalt in den verschiedenen Proben wurden 3-30 µl der Proben zusammen mit 7 µl eines Proteinstandards (6,5 kDa-200 kDa von Bio-Rad) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der mit Elektrodenpuffer gefüllten Kammer bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel und einer Spannung von 120-180 V im Trenngel. Als Elektrodenpuffer diente eine Lösung aus 6 g/l Tris, 28,8 g/l Glycin und 1 g/l SDS. Anschließend wurde das Gel dreimal für etwa 15 min mit H₂O gewaschen, mit GelCode[®] Blue Stain Reagent (Coomassie-Farbstoff) gefärbt und mit H₂O entfärbt. Das Gel wurde anschließend für ein bis zwei Stunden bei 80 °C unter Vakuum auf Whatman-Papier getrocknet und eingescannt.

Tabelle 2.7 | 2-fach Probenpuffer für SDS-PAGE.

	reduzierend	nicht-reduzierend
Glycerin	1,2 ml	1,2 ml
1,5 M Tris, pH 6,8	1,2 ml	1,2 ml
10 % SDS	3 ml	3 ml
2-Mercaptoethanol	0,5 ml	
Bromphenolblau	10 mg	10 ml
Harnstoff	3 g	3 g
H ₂ O	ad 10 ml	ad 10 ml

2.3.2 Spektroskopische Proteinbestimmung

Um den Proteingehalt in der Probe zu bestimmen wurde die UV-Vis-Spektroskopie verwendet. Die Methode beruht darauf, dass die Aminosäureseitenketten von Tryptophan, Tyrosin und in geringem Maße Cystin Licht einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren. Für die Berechnung des Proteingehaltes nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($A = \varepsilon \cdot c \cdot d$ mit A = Absorption, ε = Molare Absorption in $l/(M \cdot cm)$, c = Konzentration in mol/l und d = Schichtdicke in cm) wird die molare Absorption des Proteins bei 280 nm benötigt. Die molare Absorption ε von WNV-Protease beträgt $55920 M^{-1} cm^{-1}$ und das Molekulargewicht 26543,6 Da. Bei der GTA, GTB und AAGlyB wird der Massenabsorptionskoeffizient ε^* in $l/(g \cdot cm)$ eingesetzt (Pace, Vajdos et al. 1995) und kann hier mit $\varepsilon^* = 10 l/(g \cdot cm)$ abgeschätzt werden (Sindhuwinata 2007). Das Molekulargewicht der monomeren Glycosyltransferasen liegt bei 34,6 kDa.

Die Extinktion der Proben wurde mindestens in Dreifachbestimmung mit einem NanoDrop Spektralphotometer gemessen. Neben dem Proteingehalt konnte die Probe auch noch auf Verunreinigungen mit Nukleinsäuren bzw. Nukleotiden, hier UDP aus der Reinigung bei der GTB, geprüft werden. Diese absorbieren bei einer charakteristischen Wellenlänge von 260 nm. Somit deutet ein Verhältnis A_{260}/A_{280} kleiner als 0,6 auf eine ausreichend reine Proteinprobe hin.

2.3.3 Kolorimetrische Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht darauf, dass durch Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau G-250 mit Proteinen das Absorptionsmaximums, des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm verschoben wird (Bradford 1976). Es wurde die Absorption bei 630 nm gemessen. Die Bindung des Farbstoffes war bereits mit bloßem mit bloßen Auge durch einen Farbumschlag von rotbraun nach blau erkennbar. Dies wurde für einen qualitativen Bradford-Test genutzt. Hierfür wurden 20 μ l der Probe mit 200 μ l Bradford-Reagenz gemischt und durch die Färbung der Lösung bestimmt ob Protein in der Probe vorhanden war.

Bei dem quantitativen Bradford-Test für die Bestimmung des Proteingehaltes von GTB in den Proben wurde Bovines Gammaglobulin (BGG) als Proteinstandard eingesetzt. Die Standardreihe bestand aus folgenden Konzentrationen 100, 200, 300, 400 und 500 μ g/ml. Die Proteinprobe wurde so verdünnt, dass die Konzentration im Bereich des Standards lag. Es wurden je 10 μ l Puffer als Leerwert, Standard und Probe in einer Mikrottestplatte vorgelegt und mit 200 μ l Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden die

Extinktionen bei 630 nm gegen den Leerwert gemessen und anhand einer Kalibriergeraden der Proteingehalt bestimmt.

2.3.4 Aktivitätstest

Die Aktivität der Glycosyltransferasen wurde mit einem von Palcic et al. (Palcic, Heerze et al. 1988) entwickelten radiochemischen Assay bestimmt. Hierbei wird die durch die GTA bzw. GTB katalysierte Synthese des A- bzw. B-Trisaccharids beobachtet. Die uniform ^{14}C -markierte Galactose bzw. das uniform ^{14}C -markierte N-Acetyl-Galactosamin des UDP-Gal bzw. UDP-GalNAc Donors wird auf den Akzeptor H-Disaccharid mit einem Octylspacer übertragen. Das entstandene Produkt, A- bzw. B-Trisaccharid kann über seinen hydrophoben Octylspacer in wässriger Umgebung an eine C18-Reversed-Phasen-Säule binden und somit von dem noch nicht umgesetzten Donor getrennt werden. Die Menge an umgesetzten Donor kann anschließend mittels Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen werden.

Die Proben wurden mit 1 x A/B-Puffer (siehe Tabelle 2.8) soweit verdünnt, dass die am Ende gemessene Zerfallsrate unter 10 % der maximalen Aktivität, die etwa 50.000 dpm entsprach, liegt. Anschließend wurden 4 μl der verdünnten Probe mit 1 μl 10 x A/B-Puffer und 5 μl des jeweiligen Stockmix versetzt, gemischt und für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach einer Inkubation der Probe für 10 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 170 μl eiskalten H_2O gestoppt. Während der Inkubationszeit wurden die C18-Reversed-Phase-Säulen, die an eine Vakuumapparatur angeschlossen waren, mit dreimal 2 ml Methanol und zweimal 2 ml H_2O equilibriert. Die Probe wurde anschließend auf die noch etwa 100 μl H_2O enthaltene Säule gegeben und trockengesaugt und noch zweimal mit 2 ml H_2O gewaschen. Das gebundene Produkt wurde mit dreimal 2 ml Methanol in Szintillationsröhrchen eluiert, mit 6 ml Szintillationsflüssigkeit (Aquasafe 800) gut gemischt und mit einem Flüssigszintillationszähler die Aktivität der Probe gemessen. Aus der gemessenen Aktivität der Probe (A_{Probe} in dpm) konnte unter Berücksichtigung der maximalen Aktivität der Donor/Akzeptor-Lösung (A_{max} in dpm), dem Leerwert (A_{Leerwert} in dpm), der Stoffmenge an kaltem Donor (n_{Donor} in μmol), des eingesetzten Volumens der Proteinlösung (V_{Probe} in ml) und der Inkubationszeit (t in min) die Volumenaktivität (VA in U/ml) nach Gl. 2.1 berechnet werden.

$$VA = \frac{(A_{\text{Probe}} - A_{\text{Leerwert}}) \cdot n_{\text{Donor}}}{(A_{\text{max}} - A_{\text{Leerwert}}) \cdot V_{\text{Probe}} \cdot t} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Dabei ist eine Unit (U) definiert als der Umsatz von 1 μmol Substrat pro min. Aus der Volumenaktivität konnte unter Einbeziehung der Proteinkonzentration die spezifische Enzymaktivität in U/mg bestimmt werden.

Diese Methode der Aktivitätsbestimmung wurde auch verwendet, um die Aktivität der GTB in Anwesenheit verschiedener Lanthanoide zu messen. Hierfür wurde dem 10 x A/B-Puffer statt 200 mM MnCl_2 die gleiche Menge an LaCl_3 , DyCl_3 , GdCl_3 bzw. YbCl_3 versetzt. Zusätzlich wurde die Aktivität ohne Metallion und mit MgCl_2 gemessen.

Tabelle 2.8 | Puffer und Stammlösungen für den Aktivitätsassay der Glycosyltransferasen. Angegeben ist die Zusammensetzung der Puffer und Stammlösungen, dabei bezieht sich die molare Angabe auf ein Volumen von 5 μ l.

	Zusammensetzung		
10 x A/B-Puffer	500 mM		MOPS (pH 7)
	200 mM		MnCl ₂
	10 mg/ml		BSA
GTA-Stockmix	992 μ M	4,96 nmol	H-Disaccharid-octyl
	454 μ M	2,27 nmol	UDP-GalNAc
	77 μ M	0,386 nmol	UDP-u- ¹⁴ C-GalNAc
GTB-Stockmix	992 μ M	4,96 nmol	H-Disaccharid-octyl
	532 μ M	2,66 nmol	UDP-Gal
	7 μ M	0,067 nmol	UDP-u- ¹⁴ C-Gal

2.4 Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie

In dieser Arbeit sollten die Glycosyltransferasen GTA, GTB sowie AAGlyB auf Interaktion mit verschiedenen Molekülen mit Hilfe von Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie untersucht werden. Zum einem wurden die Wechselwirkungen verschiedener Donorsubstrate mit den Glycosyltransferasen untersucht. Die Ergebnisse mit der GTB wurden bereits zusammen mit den Ergebnissen aus den ITC-Experimenten in Sindhuwinata et al. (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) veröffentlicht. Desweiteren sollte Fragment **382**, das bei einem Screening inhibitorische Wirkung gegenüber der GTB zeigte (Rademacher, Landstrom et al. 2010), genauer untersucht werden. Hierfür wurden mit GTA, GTB und AAGlyB Bindungsstudien mit SPR- sowie STD-NMR-Experimenten durchgeführt. Zusätzlich wurde die Verdrängung von UDP durch dieses Fragment untersucht. Diese Daten wurden bereits in Jørgensen et al. (Jørgensen, Grimm et al. 2012) veröffentlicht. SPR Experimente wurden zusätzlich verwendet um die Bindung von UDP in Anwesenheit verschiedener Lanthanoide an GTB zu untersuchen.

2.4.1 Grundlagen

Bei der Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie (SPR, *engl.* surface plasmon resonance) handelt es sich um eine weit verbreitete biophysikalische Methode zur Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen. Die Wechselwirkungen können dabei in Echtzeit verfolgt werden und es wird nur eine sehr geringe Menge an Probe benötigt. Die Methode beruht darauf, dass ein Bindungspartner, der sogenannte Ligand, auf einem Sensorchip immobilisiert wird. Dieser Sensorchip besteht aus einer dünnen Goldschicht, die auf einem Glasprisma angebracht ist. Durch dieses Glasprisma wird die Goldoberfläche mit polarisiertem Licht bestrahlt, es findet eine Totalreflexion statt. Wird nun ein Bindungspartner, hier Analyt, durch eine Flusszelle (Fc) über den Sensorchip mit dem immobilisierten Liganden gegeben kann in einem sogenannten Sensorgramm die Assoziation und Dissoziation dieses Analyten gemessen werden. Durch Bindung des Analyten ändert sich der Brechungsindex im evaneszenten Feld der

Sensoroberfläche und somit der Resonanzwinkel des polarisierten Lichtes. Diese Veränderung wird zeitabhängig in Resonanzeinheiten (RU, *engl.* resonance units) aufgezeichnet wobei eine Änderung um 1 RU ungefähr einer Massenänderung auf der Sensoroberfläche von 1 pg/mm² entspricht (Schuck 1997).

2.4.2 Experimente

In dieser Arbeit wurde ein Biacore[®] 3000 Gerät mit CM5-Sensorchips, auf denen jeweils die Glycosyltransferasen als Ligand immobilisiert wurden, verwendet. Die Messungen wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt und die Flussrate betrug immer 10 µl/min.

Bei allen Proteinproben, GTA, GTB und AAGlyB, wurden vor Verwendung der Dialysepuffer gegen SPR-Puffer (Tabelle 2.9) ausgetauscht. Hierfür wurden zuerst 10 mM EDTA (f.c.) hinzugegeben um das in Dialysepuffer vorhandene Mn²⁺ zu komplexieren. Anschließend wurde mit Zentrifugen-Filtereinheiten mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa der Puffer bei 4 °C und 3200 x g gegen MOPS/Mg²⁺-Puffer ausgetauscht.

Tabelle 2.9 | Puffer für SPR-Messungen. Die Puffer hatten einen pH-Wert von 6,7 bei 25 °C und wurden vor Gebrauch mit einem 0,22 µm Filter filtriert und in einem Ultraschallbad entgast.

Puffer		Zusammensetzung
MOPS/-	50 mM	MOPS
	100 mM	NaCl
MOPS/M ²⁺	50 mM	MOPS
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂ oder MnCl ₂
MOPS/M ²⁺ /UDP	50 mM	MOPS
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂ oder MnCl ₂
	1 mM	UDP
MOPS/Ln ³⁺	50 mM	MOPS
	100 mM	NaCl
	5 mM	LaCl ₃ , DyCl ₃ , GdCl ₃ oder YbCl ₃

Die Proteine wurden auf verschiedenen Flusszellen eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Bei diesem Chip befindet sich eine Matrix aus carboxymethylierten Dextran auf der Goldoberfläche. Die Immobilisierung fand durch direkte Kopplung über N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) statt (Johnsson, Lofas et al. 1991). Hierfür wurde das System nach Einsetzen des Sensorchips dreimal für 6 min mit Puffer gespült und anschließend mit zweimal 20 µl Glycin in NaOH, 0,3 % Triton-X-100 gespült. Die Aktivierung erfolgte mit einer 1:1 Mischung aus EDC und NHS. Hierbei reagieren die Carboxylgruppen zu reaktivem N-Hydroxysuccinimidester. Diese Ester können nun mit primären Aminogruppen der Proteine eine kovalente Bindung eingehen. Nach einer Belegung

mit einer Dichte von etwa 4000 RU (Tabelle 2.10) wurden die noch vorhandenen aktiven Ester für 15 min mit 1 M Ethanolaminhydrochlorid deaktiviert. Als Referenz diente eine leere Flusszelle die direkt nach dem Aktivieren wieder deaktiviert wurde bzw. eine Flusszelle auf der NeutrAvidin® (NA) immobilisiert wurde.

Tabelle 2.10 | Verwendete CM5-Sensorchips für SPR-Experimente. Angegeben sind die Belegungen und die Belegungsdichten der jeweiligen Flusszellen (Fc) der verwendeten CM5-Sensorchips, sowie die getesteten Analyten und der jeweilige verwendete Puffer. Die eingesetzten Konzentrationen der Analyten sind in den Ergebnissen der Experimente zu finden. Chip 5 wurde von F. Flügge (Institut für Chemie) zur Verfügung gestellt.

Chip	1	2	3	4	5
Fc 1	Leer	Leer	Leer	Leer	Leer
Fc 2	3810 RU GTB	3980 RU GTB	3859 RU GTB	3823 RU GTB	4190 RU GTB
Fc 3	4000 RU AAGlyB	4230 RU NA	4131 RU AAGlyB	3653 RU AAGlyB	-
Fc 4	3463 RU GTA	4100 RU GTB	3861 RU GTA	3852 RU GTA	-
Analyten	UDP-Galactose		Fragment 382		UDP
	UDP				
	UMP				
	Uridin				
	UDP-Glucose				
	3DD				
Puffer	MOPS/Mg ²⁺		MOPS/-		MOPS/La ³⁺
	MOPS/Mn ²⁺		MOPS/Mg ²⁺		MOPS/Dy ³⁺
			MOPS/Mg ²⁺ /UDP		MOPS/Gd ³⁺
			MOPS/Mn ²⁺		MOPS/Yb ³⁺
			MOPS/Mn ²⁺ /UDP		

Für die Messungen wurden die Analyten im jeweiligen SPR-Puffer gelöst und je 30 µl in verschiedenen Konzentrationen injiziert. Die genauen Angaben der Pufferbedingungen sowie Konzentrationen sind in Tabelle 2.10 sowie im Ergebnissteil und im Anhang (siehe Abschnitt 6) zu finden. Zwischen den Injektionen wurde für 2-10 min mit dem jeweiligen Laufpuffer gewaschen. Um sicher zu gehen, dass beim Austausch des Laufpuffers die Metallionen entfernt wurden, wurde zwischen den Läufen das System jeweils dreimal mit 10 mM EDTA in MOPS/-, mit MOPS/- und anschließend mit dem gewünschten Laufpuffer gespült. Die Experimente wurden in dreifacher Bestimmung durchgeführt sowie für einige Experimente wiederholt.

Werden die im Gleichgewicht gemessenen RU-Werte gegen die jeweiligen Konzentrationen des Analyten aufgetragen, erhält man eine Bindungsisotherme, aus der die Dissoziationskonstante (K_D-Wert) ermittelt werden kann. Die Auswertung der experimentellen Daten erfolgte mit BIAevaluation 3.2 und Origin 7. Die Puffereffekte wurden hierbei von den SPR-Effekten des Analyten subtrahiert und der K_D-Wert durch Anpassung der Daten an die Langmuir-Gleichung für eine Bindungsstelle (Gl. 2.2) und für zwei Bindungsstellen (Gl. 2.3) ermittelt.

$$RU = \frac{RU_{max} \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

$$RU = \frac{RU_{\max,1} \cdot [L]}{K_{D,1} + [L]} + \frac{RU_{\max,2} \cdot [L]}{K_{D,2} + [L]} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Die maximal mögliche Belegung des Liganden mit Analyten spiegelt sich in den Werten von RU_{\max} wieder und die theoretischen Werte können aus den Molekulargewichten der beiden Bindungspartner (M in g/mol), der Anzahl der Bindungsstellen und der Belegungsdichte in RU_{imm} berechnet werden.

$$RU_{\max, \text{theor}} = \frac{M(\text{Analyt})}{M(\text{Ligand})} \cdot n \cdot RU_{\text{imm}} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

2.5 Isotherme Titrationskalorimetrie

In dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit Sophie Weißbach (Institut für Chemie) thermodynamische Daten der GTB mit verschiedenen Substraten und Substratanaloga erhoben. Diese Daten komplettieren bereits vorangegangene Arbeiten (Sindhuwinata 2007; Polk 2010; Sindhuwinata, Munoz et al. 2010) und sind zusammen mit den Ergebnissen aus den SPR-Experimenten (siehe 3.1.1) in Sindhuwinata et al. veröffentlicht (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013).

2.5.1 Grundlagen

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) bietet die Möglichkeit neben Bindungsaffinitäten auch Enthalpie (ΔH) und Entropie (ΔS) zu bestimmen. Diese Werte geben Information über die treibenden Kräfte einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung. Für die Messungen werden zwei identische Zellen benötigt, die sich in einer adiabatischen Hülle befinden. Dadurch wird eine konstante Umgebungstemperatur gewährleistet. In der Referenzzelle befindet sich Puffer oder H_2O , in der Probenzelle die Messlösung mit Rezeptor. Die Referenzzelle wird kontinuierlich erwärmt, das Kalorimeter misst den Temperaturunterschied (ΔT) der beiden Zellen und hält diesen konstant. Bei Zugabe des Liganden verändert sich nun die Temperatur in der Messzelle. Eine endotherme Reaktion führt zu einer Wärmeaufnahme, eine exotherme Reaktion zu einer Wärmeabgabe. Diese Differenz der Heizleistung (ΔP) wird über die Zeit aufgezeichnet und ihr Integral stellt die entsprechend aufgenommene oder abgegebene Wärmemenge dar (Wiseman, Williston et al. 1989; Indyk and Fisher 1998; Bjelic and Jelesarov 2008).

2.5.2 Experimente

Die kalorimetrischen Experimente wurden mit einem iTC_{200} (MicroCal, Standort: Forschungszentrum Borstel) durchgeführt. Die Messungen wurden alle im gleichen Puffer (siehe Tabelle 2.11) und bei 298 K durchgeführt.

Die verwendete GTB-Probe wurden von Thies Köhli (Institut für Chemie) hergestellt und für die ITC Experimente mit Zentrifugen-Filtereinheiten mit einem Größenausschlussvolumen von

10 kD bei 4 °C und 3200 x g konzentriert. Nach einer Dialyse in ITC-Puffer wurde erneut die Konzentration sowie die Aktivität der Probe bestimmt. Für die Messungen ist es wichtig, dass alle Lösungen für die Experimente in Puffer einer Charge vorliegen, da andernfalls durch Mischung der Puffer unerwünschte Wärmeeffekte entstehen können.

Tabelle 2.11 | Puffer für ITC-Messungen. Der Puffer hatten einen pH-Wert von 6,7 bei 25 °C und wurde vor Gebrauch mit einem 0,22 µm Filter filtriert und in einem Ultraschallbad entgast.

Puffer	Zusammensetzung
MOPS/Mn ²⁺	50 mM MOPS
	100 mM NaCl
	5 mM MnCl ₂
	1 mM 2-Mercaptoethanol

Um eine Orientierung für die einzusetzende Proteinkonzentrationen zu bekommen, wurde der sogenannte C-Faktor (Wiseman, Williston et al. 1989) verwendet. Dieser ist in Gl. 2.5 mit [R] als Konzentration des Rezeptors aufgeführt und sollte Werte zwischen 1 und 1000, idealerweise zwischen 10 und 50 annehmen. Zusätzlich wurden zu Beginn verschiedene Proteinkonzentrationen sowie Injektionsvolumen ausgetestet.

$$C = \frac{[R]}{K_D} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Zum Füllen der 200 µl großen Zelle waren etwa 300 - 400 µl Proteinlösung nötig. Abhängig vom K_D-Wert wurden 230 - 400 µM GTB eingesetzt und der Ligand wurde in 16 - 26 Injektionen mit einem Volumen von 1,5 - 2,5 µl zugesetzt. Bei den Messungen mit zwei Liganden wurde einer mit einem 10-fachen Überschuss zur Proteinlösung in die Messzelle gegeben. In der Referenzzelle befand sich H₂O. Die genauen Messparameter sind in Tabelle 2.12 dargestellt. Die Konzentrationen sowie die Injektionen und Injektionsvolumina sind in den Ergebnissen (siehe 3.1.2) sowie im Anhang (siehe 6.4.2) dargestellt.

Die gemessenen Daten wurden mit der ITC-Routine für das Programm Origin 7 ausgewertet. Für die Bestimmung des Leerwerts wurden die letzten Datenpunkte des Thermogramms verwendet bei dem das Protein bereits mit Ligand gesättigt war. Die entstandene Basislinie wurde anschließend von allen Datenpunkten subtrahiert. Wurde die gemessene Wärmemenge (Q) durch die injizierte Stoffmenge des Liganden dividiert und gegen das molare Ligand:Rezeptor-Verhältnis aufgetragen, erhielt man eine differenzielle Bindungsisotherme aus der durch Anpassung der Wiseman-Gleichung (Wiseman, Williston et al. 1989) die Assoziationskonstante (K_A) und daraus K_D, sowie die Enthalpie (ΔH in J/mol) ermittelt werden konnte. Durch den Zusammenhang (Gl. 2.6) der Dissoziationskonstante mit der Temperatur (T in K), der allgemeinen Gaskonstante (R in J/mol·K) und freien Bindungsenergie (ΔG in J/mol), sowie den Zusammenhang (Gl. 2.7) von ΔG mit der Enthalpie, der Temperatur und der Entropie (ΔS in J/mol·K) konnten alle Parameter bestimmt werden.

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln K_D \quad (\text{Gl. 2.6})$$

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (\text{Gl. 2.7})$$

Tabelle 2.12 | Parameter für die ITC-Messungen. Gemessen wurde an einem iTC₂₀₀ Gerät mit einer Zellengröße von 200 µl. Die genauen Injektionsvolumina sowie Anzahl der Injektionen sind bei den Ergebnissen der jeweiligen Experimente zu finden.

Parameter	Einstellung
Temperatur	25 °C
Rührgeschwindigkeit	500 Rpm
Referenzleistung	11 µcal/s
Wartezeit vor der Messung	360 s
Anzahl Injektionen	16-26
Injektionsvolumina	0,5 µl (erste Injektion) 1,5-2,5 µl (alle weiteren Injektionen)
Wartezeit zwischen den Messungen	180 s
Filterperiode pro Datenpunkt	5 s

2.6 NMR-Spektroskopie

Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (*engl.* nuclear magnetic resonance, NMR) ist eine weit verbreitete biophysikalische Methode. Sie wird vor allem für Untersuchungen von Struktur und Wechselwirkungen von Molekülen verwendet. Zusätzlich findet sie auch Anwendung bei der Untersuchung von Moleküldynamik sowie bei Metabolismusstudien. Die Methode basiert auf den magnetischen Eigenschaften NMR-aktiver Kerne, wie zum Beispiel ¹H, ¹³C und ¹⁵N (Claridge 2000; Berger and Braun 2004; Keeler 2010).

In dieser Arbeit wurde die NMR-Spektroskopie für strukturelle und dynamische Untersuchungen an der GTB sowie an der WNV-Protease eingesetzt. Es wurde die Wechselwirkung von Fragment **382** in An- und Abwesenheit von UDP mit Hilfe von STD-NMR-Experimenten an die GTB untersucht. Alle weiteren Untersuchungen fanden auf Proteinebene statt. Dafür ist eine Zuordnung der Proteinsignale von Vorteil. Anschließend an die Arbeiten von N. Sindhuwinata (Sindhuwinata 2012) wurden Proteinspektren von isotope markierter GTB für eine Zuordnung der Proteinresonanzen aufgenommen. Um Informationen über das Rückgrat der GTB zu erhalten, wurden Experimente zum Austausch der Amidprotonen durchgeführt sowie die Veränderung der chemischen Verschiebung dieser Signale bei Zugabe von UDP untersucht. Eine weitere Methode zur Untersuchung großer Proteine sind NMR-spektroskopische Messungen an isotope markierter Methylgruppen. Die Markierung solcher Methylgruppen in der GTB sowie in der WNV-Protease wurde in dieser Arbeit erstmals durchgeführt. Mit diesen selektiv markierten Proteinen wurden anschließend erste NMR-Spektren aufgenommen sowie die Bindung von Substraten bei der GTB, bzw. Inhibitoren bei der WNV-Protease untersucht. Dynamikuntersuchungen mit Relaxations-Dispersions-Experimenten wurden für beide Systeme etabliert und durchgeführt.

2.6.1 NMR-Spektroskopie mit Makromolekülen

Ab einer Molekülgröße von etwa 30-40 kDa ist es kaum noch möglich konventionelle NMR-spektroskopische Methoden einzusetzen (Riek, Pervushin et al. 2000). Dies liegt zum einem an der steigenden Anzahl der Resonanzen und der damit einhergehenden Überlagerung von Signalen. Zum anderen steigt die transversale Relaxation mit steigender Proteingröße an, wodurch es zu Linienverbreiterung bis hin zum Verschwinden von Signalen kommt (Abragam 1961). Um diese Probleme zu umgehen, wurden viele Techniken der Isotopenmarkierung sowie weitere NMR-Methoden entwickelt. Die Relaxationsraten von Amid- und Methylsignalen können zum Beispiel durch Ersetzen der benachbarten kohlenstoffgebundenen Protonen mit Deuteronen verringert werden (Gardner and Kay 1998). Zusätzlich wurde die *engl.* transverse relaxation-optimized spectroscopy (TROSY) Methode entwickelt, die eine zusätzliche Verbesserung der Spektren zu Folge hat, da bestimmte Relaxationsterme umgangen werden können (Pervushin, Riek et al. 1997; Fernandez and Wider 2003).

Transverse relaxation-optimized spectroscopy (TROSY)

Bei einem zweidimensionalen $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC (*engl.* heteronuclear single quantum correlation) werden Protonen, die durch Bindung mit einem Heteroatom koppeln, hier Stickstoff, mit diesem korreliert. Durch die große ^1J -Kopplungskonstante von etwa 92 Hz für Amide spaltet sich das Signal in beiden Dimensionen auf und es werden vier Signale, die in einem Quadrat angeordnet sind, erzeugt. Normalerweise findet bei der Aufnahme dieser Spektren in beiden Zeitperioden eine Entkopplung statt, die dazu führt, dass nur ein Durchschnittssignal in der Mitte der vier ursprünglichen Signale auftaucht. In großen Molekülen unterscheiden sich die Relaxationsprozesse der vier Signale bzw. Übergänge jedoch, wodurch unterschiedliche Linienbreiten entstehen. Bei der TROSY-Technik wird nun ein $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment ohne Entkopplung gemessen wobei das schärfste Signal durch bestimmte Phasenzyklen (Pervushin, Riek et al. 1997) oder die Abfolge spezieller Gradienten (Pervushin, Wider et al. 1998) selektiert wird. Der TROSY-Effekt wird verstärkt durch größere Proteine, durch Messungen bei höheren Feldstärken und durch Deuterierung der Proteine (Pervushin 2000). Die TROSY-Sequenz kann in viele weitere NMR-Experimente integriert werden, so findet sie zum Beispiel Anwendung bei Trippelresonanzexperimenten (Salzmann, Pervushin et al. 1998). Zusätzlich kann durch BEST-Sequenzen die Sensitivität weiter verbessert werden (Lescop, Schanda et al. 2007; Farjon, Boisbouvier et al. 2009; Lescop, Kern et al. 2010).

Methyl-TROSY Spektroskopie

Obwohl der TROSY-Effekt die spektrale Sensitivität und Auflösung für große Proteine deutlich verbessert, reicht dies oftmals nicht aus (Tugarinov and Kay 2003; Korzhnev, Kloiber et al. 2004; Sprangers and Kay 2007). Die Überlagerung der Signale sowie die Deuterierung und anschließende Reprotonierung der Amide stellt in manchen Systemen weiterhin ein Problem dar (Tugarinov and Kay 2003).

Um trotzdem Strukturen und Bewegungen großer Proteine untersuchen zu können, wurde das Methyl-TROSY Experiment entwickelt (Ollerenshaw, Tugarinov et al. 2003). Hierbei werden nur die Methylgruppen der Proteine untersucht. Die Anzahl dieser ist deutlich geringer als die der Amide in einem Protein. Dadurch wird das Spektrum deutlich übersichtlicher und verliert an Komplexität. Zusätzlich steigt die Sensitivität der Signale, da in einer Methylgruppe, im Gegensatz zu Amiden, drei Protonen statt einem Proton vorhanden sind. Die Messungen können komplett in D_2O -Puffer durchgeführt werden, dadurch ist keine komplizierte Lösungsmittelunterdrückung und Reprotonierung der Amide nötig.

Der Ausgangspunkt, um den Methyl-TROSY-Effekt erklären zu können, ist, dass die dreizählige Methylgruppen sehr schnell um ihre Achse rotieren und an ein Makromolekül mit hoher Korrelationszeit gebunden sind. Dabei kann gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Übergänge entweder sehr langsam oder sehr schnell relaxieren. Methyl-TROSY-Experimente machen sich dies zu Nutze und transferieren die Magnetisierung nur zwischen den langsam relaxierenden Übergängen. Dies ist möglich, da diese unabhängig von den schnell relaxierenden sind (Kay 2011). Das einfachste Methyl-TROSY-Experiment ist ein Standard $^1H, ^{13}C$ -HMQC (eng. heteronuclear multiple quantum coherence) Experiment. In dem hier verwendeten Methyl-TROSY-Experiment wurde zusätzlich ein *purge*-Puls sowie Gradienten verwendet (Tugarinov, Hwang et al. 2003). Dies reduziert die Entstehung von Artefakten.

Für die Methyl-TROSY-Experimente ist es wichtig, dass alle benachbarten Protonen der Methylgruppen deuteriert sind, da ansonsten unerwünschte Relaxationseffekte auftreten können. Daher sind uniform-deuterierte Proteine notwendig, die spezifisch markierte Methylgruppen ($^{13}C^1H_3$) in den Seitenketten besitzen. Diese können u.a. durch Zugabe von speziell markierten Vorläufern einiger Aminosäuren während der Proteinbiosynthese in das Protein eingebaut werden. Folgende selektive Markierungen sind derzeit möglich: Alanin (β 1-Methylgruppe) (Ayala, Sounier et al. 2009), Isoleucin (δ 1- oder γ 2-Methylgruppe) (Tugarinov and Kay 2004; Ayala, Hamelin et al. 2012), Leucin (eine der δ -Methylgruppen) (Tugarinov and Kay 2004), Methionin (ϵ 1-Methylgruppe) (Gelis, Bonvin et al. 2007) und Valin (eine der γ -Methylgruppen) (Tugarinov and Kay 2004). Die Zuordnung der Methylsignale kann durch Mutagenese oder, falls eine Zuordnung der Amide bekannt ist, durch Korrelationsexperimente dieser mit den Methylgruppen erfolgen (Tugarinov and Kay 2003).

CPMG-Relaxation-Dispersion

Die Funktion vieler Proteine kann bereits aus Strukturen, zum Beispiel durch Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie, abgeleitet werden. In diesen Strukturen ist meistens nur ein Zustand der sehr flexiblen Proteine sichtbar. Gerade diese Flexibilität ist aber wichtig für deren Funktionen. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie ist es möglich diese Bewegungen zu untersuchen. Zur Vereinfachung wird meistens von zwei Zuständen (A und B) ausgegangen, die in der NMR mit Resonanzfrequenzen (ω_A und ω_B in Hz) beschrieben sind. Unterschieden wird zwischen langsamen, mittleren und schnellen Austausch (Mittermaier and Kay 2009; Kleckner and Foster 2011; Torchia 2011). Beim langsamen Austausch ($k_{ex} \ll |\Delta\omega|$, mit der Austauschrate k_{ex} in Hz) können zwei distinkte Signale für jeden der beiden Zustände

bei unterschiedlichen chemischen Verschiebungen detektiert werden und mit EXSY-Techniken (*engl.* exchange spectroscopy) die Austauschraten gemessen werden (Farrow, Zhang et al. 1994; Sahu, Clore et al. 2007). Mittlerer bis schneller Austausch ($k_{ex} \approx |\Delta\omega|$) kann mit Hilfe von CPMG (Carr-Purcell Meiboom-Gill)-Relaxations-Dispersions Experimenten gemessen werden und wird im Folgenden noch genauer beschrieben. Ist der Austausch sehr schnell ($k_{ex} \gg |\Delta\omega|$) wird nur ein sehr scharfes Signal bei der nach Population gewichteten chemischen Verschiebung detektiert. Informationen zum schnellen Austausch können aus Messungen der Relaxationsraten erhalten werden (Jarymowycz and Stone 2006). Zusätzlich geben Daten aus strukturbasierten Messungen, wie zum Beispiel *engl.* residual dipolar couplings (RDCs) (Tolman and Ruan 2006), *engl.* paramagnetic relaxation enhancements (PREs) (Clore, Tang et al. 2007), skalare Kopplungen (Lindorff-Larsen, Best et al. 2005) und *engl.* nuclear Overhauser enhancements (NOEs) (Lindorff-Larsen, Best et al. 2005) Informationen über die Dynamik der Systeme.

Bei mittleren Austauschraten, also dynamischen Prozessen im Bereich von μs - ms, kommt es zu charakteristischen Linienverbreiterungen der Signale beider Zustände. Das Signal des angeregten Zustandes, also des geringer bevölkerten Zustandes, ist meist sehr klein und kann durch die Linienverbreiterung nicht mehr detektiert werden. Die Linienverbreiterung des Grundzustandes kann jedoch mit Hilfe von CPMG-Relaxations-Dispersions Experimenten quantifiziert werden, um kinetische und thermodynamische Daten des Austausches zwischen diesen beiden Zuständen zu extrahieren (Kempff and Loria 2003; Palmer, Grey et al. 2005; Loria, Berlow et al. 2008; Kleckner and Foster 2011). Zusätzlich können Strukturinformationen über die chemischen Verschiebungen des angeregten "unsichtbaren" Zustands erhalten werden. Bei dieser Methode wird der Anteil der Relaxation durch chemischen Austausch während einer konstanten Spin-Echo Mischzeit (T) mit einer variierenden Anzahl an CPMG Pulsen (ν_{CPMG}) gemessen. Da sich die beiden Zustände im Austausch befinden, kann die Magnetisierung durch einen 180° CPMG Puls während der Wartezeit T nicht refokussiert werden wodurch ein breites Signal entsteht. Wird die Anzahl der Pulse erhöht, können die beiden Magnetisierungen nicht so stark divergieren und es entsteht ein schärferes Signal. Befinden sich die beiden Zustände nicht im Austausch, ist keine Veränderung der Signale zu beobachten. Die Idee dahinter ist nun, sich die Signalintensität I bei unterschiedlichen Wiederholungsraten der CPMG-Pulse ($\nu_{CPMG} = 1/(2\tau)$, mit τ als Abstand zwischen den Pulsen) anzuschauen. $I(\nu_{CPMG})$ kann durch (Gl. 2.8) in eine effektive Transversale Relaxationsrate ($R_2^{eff}(\nu_{CPMG})$ in s^{-1}) umgerechnet werden, die den Verlust der Signalintensität gegenüber der Referenzsignalintensität I_0 mit einer konstanten Spin-Echo Mischzeit (T) quantifiziert (Korzhnev, Kloiber et al. 2004).

$$R_2^{eff}(\nu_{CPMG}) = -\frac{1}{T} \ln \left\{ \frac{I(\nu_{CPMG})}{I_0} \right\} \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Der dynamische Prozess wird meist durch ein Zweizustandsmodell interpretiert und das daraus resultierende Relaxations-Dispersions-Profil wird durch vier bis fünf Parameter beschrieben werden (siehe Abbildung 2.1). Für die Anpassung der Daten werden meist die Carver-Richards Gleichungen verwendet, die einen Austauschprozess für alle Zeitbereiche beschreiben können

(Carver and Richards 1972; Kleckner and Foster 2011). Durch das Anpassen dieser Relaxations-Dispersions Profile (R_2^{eff} (v_{CPMG}) gegen v_{CPMG}) erhält man die Austauschraten (k_{ex} in s^{-1}), die Populationen (P_A in %), die chemische Verschiebungsdifferenz ($|\Delta\omega_{\text{H bzw. X}}|$) der beiden Zustände sowie die Relaxationsrate des höher populierte Zustands in Abwesenheit von chemischen Austausch (R_2^0 in s^{-1}). Durch Messen bei verschiedenen Feldstärken und Temperaturen kann die Anpassung der Daten deutlich verbessert werden. Wenn Daten von verschiedener Temperaturen vorhanden sind, kann zusätzlich eine Arrhenius sowie van't Hoff Analyse (Winzor and Jackson 2006) durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde das Softwarepaket GUARD (Kleckner and Foster 2011), welches in Matlab implementiert ist, verwendet. Diese Methode kann sowohl für ^{15}N (Loria, Rance et al. 1999) als auch für ^{13}C Relaxations-Dispersions Experimente verwendet werden (Korzhnev, Kloiber et al. 2004).

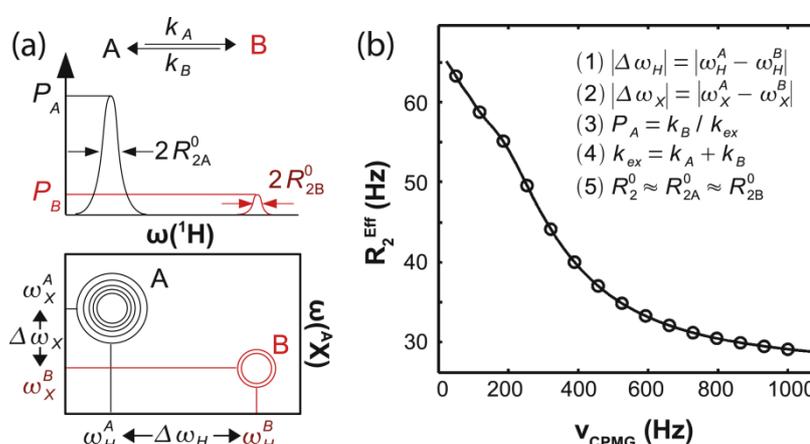


Abbildung 2.1 | Beispiel eines Relaxations-Dispersions-Profil. Die Abbildung ist übernommen aus (Kleckner and Foster 2011) und zeigt den Austausch zwischen zwei Zuständen. (a) Die Signale beider Zustände (A und B) besitzen eine definierte chemische Verschiebung in die ^1H (ω_{H}) und/oder $^{\text{A}}\text{X}$ (ω_{X}) Dimension. Das Signal des geringer populierte Zustandes (hier B) ist zu gering bzw. zu breit und daher in den Spektren nicht zu sehen. Jedoch beeinflusst der Austausch zwischen A und B quantitativ die gemessene Relaxations-Dispersions-Kurve von Signal A. (b) Ein multiquanten Relaxations-Dispersions-Profil wird durch fünf Parameter in einem Zweizustandsmodell beschrieben und enthält Informationen über strukturelle, thermodynamische und kinetische Eigenschaften sowie Informationen über die Relaxation. Mit (1), (2) $|\Delta\omega_{\text{H/X}}|$ als Unterschied der chemischen Verschiebungen der Signale zwischen Zustand A und B, (3) $P_{\text{A}} = k_{\text{B}}/k_{\text{ex}}$ der Gleichgewichtspopulation A mit $P_{\text{A}} + P_{\text{B}} = 1$, (4) der Austauschrate $k_{\text{ex}} = k_{\text{A}} + k_{\text{B}}$ zwischen den beiden Zuständen A und B und (5) der transversalen Relaxationsrate R_2^0 in Abwesenheit von chemischen Austausch zwischen den beiden Zuständen. Es wird angenommen, dass $R_2^0 \approx R_{2\text{A}}^0 \approx R_{2\text{B}}^0$ ist (Ishima and Torchia 2006).

Tripelresonanzexperimente

Für Untersuchungen von Proteinen mittels NMR-Spektroskopie ist es meist unerlässlich die Zuordnung der Signale in dem zugehörigen HSQC-Spektrum zu kennen. Hierfür werden bei größeren Proteinen Tripelresonanzexperimente durchgeführt (Ikura, Kay et al. 1990). Dabei werden die drei NMR-aktiven Kerne ^1H , ^{13}C und ^{15}N miteinander korreliert. Die Proteine müssen dafür mit diesen aktiven Kernen markiert werden. Zusätzlich ist bei großen Proteinen, wie auch der GTB, eine Deuterierung von Vorteil um die bereits erwähnten $^1\text{H-C}_\alpha$ -Relaxationen

zu verhindern und eine höhere Sensitivität und Auflösung der Spektren zu erhalten (Gardner and Kay 1998). Mit speziellen Pulssequenzen können unterschiedliche Korrelationen in verschiedenen Spektren dargestellt werden. Hierbei werden die unterschiedlichen Kopplungskonstanten zwischen den Kernen in einem Protein zu Nutze gemacht. Es gibt verschiedene Möglichkeiten an Kombinationen von Spektren für die Zuordnung von Proteinsignalen. In dieser Arbeit wird eine Kombination gewählt die für die Größe der GTB am besten geeignet ist. Dabei handelt es sich um das sogenannte HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO und HNCACB. Die Benennung der Experimente erfolgt nach dem Transfer der Magnetisierung, wobei nicht detektierte Kerne in Klammern stehen (mit CA-C_α, CB-C_β und CO-C'). Im HNCA Experiment wird das Amidproton und der Stickstoffkern der i-ten Aminosäure mit den C_α-Kernen der i-ten und (i-1)-ten Aminosäure korreliert. Im HN(CO)CA hingegen das Amidproton und der Stickstoffkern nur mit dem C_α-Kern der (i-1)-ten Aminosäure korreliert. Durch Kombination dieser beiden Spektren, sowie dem HNCO mit dem HN(CA)CO kann das Proteinrückgrat sequenziell zugeordnet werden. Zusätzliche Informationen erhält man aus dem HNCACB, das zu den Informationen aus dem HNCA noch die Korrelation mit dem C_β-Kern der i-ten und (i-1)-ten Aminosäure aufweist. Zusätzlich können spezifische Verschiebungsmuster auf spezielle Aminosäurereste hinweisen (Sattler, Schleucher et al. 1999).

Paramagnetische NMR-Spektroskopie

Eine weitere Methode Struktur und Dynamik von Biomolekülen zu untersuchen ist die Anwendung von paramagnetischer NMR-Spektroskopie (Pintacuda, Keniry et al. 2004; Otting 2010). Paramagneten verändern die Relaxationseigenschaften umliegender Kerne. Diese Effekt kann auch noch weit entfernt vom paramagnetischen Zentrum beobachtet werden und kann daher gut für strukturelle Untersuchungen genutzt werden. Viele Metallionen weisen paramagnetische Eigenschaften auf, wie zum Beispiel Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ und die meisten Metallionen in der Gruppe der Lanthanoide (Pintacuda, John et al. 2007). Durch Bindung von Paramagneten an ein Biomolekül verändern sich die Signale im NMR-Spektrum in Abhängigkeit von Abstand und Orientierung zum Paramagneten. Hierbei kommt es zu Veränderungen der chemischen Verschiebungen, Linienbreiten und Kopplungskonstanten. Für Struktur- und Dynamikuntersuchungen werden vor allem *engl.* pseudocontact shifts (PCS) (Bertini, Janik et al. 2002), *engl.* paramagnetic relaxation enhancements (PRE) (Guéron 1975; Vega and Fiat 1976; Clore, Tang et al. 2007), *engl.* cross-correlated relaxation (CCR) (Ghose and Prestegard 1997; Boisbouvier, Gans et al. 1999; Madhu, Grandori et al. 2001; Pintacuda, Hohenthanner et al. 2003) und *engl.* residual dipolar couplings (RDC) (Tolman, Flanagan et al. 1995; Barbieri, Bertini et al. 2002; Bertini, Janik et al. 2002; Tolman and Ruan 2006) verwendet. Für die Zuordnung der Signale ist eine dreidimensionale Struktur, zum Beispiel aus der Kristallographie und eine Bindungsstelle für ein paramagnetisches Metallion nötig. Ist beides vorhanden, kann durch theoretische Berechnungen und praktische Bestimmungen der vier paramagnetischen Effekte die Zuordnung berechnet werden (Pintacuda, Keniry et al. 2004).

STD-NMR-Spektroskopie

Die Sättigungs-Transfer-Differenz (STD)-NMR-Spektroskopie dient zur Charakterisierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Das Anwendungsspektrum ist breit und geht von der Bestimmung von Bindungsisotopen (Mayer and Meyer 2001), über die Bestimmung von K_D -Werten (Fielding 2007) bis hin zur Identifikation von Bindungspartnern aus Substanzbibliotheken (Mayer and Meyer 1999). In dieser Arbeit soll die Wechselwirkung von Fragment **382** in An- und Abwesenheit von UDP an GTB untersucht werden.

Bei der STD-NMR-Spektroskopie wird das Protein selektiv durch bestimmte Pulssequenzen gesättigt. Diese Sättigungsfrequenz (On-Resonanz-Frequenz) darf nicht in der Nähe der Resonanzfrequenzen des Liganden liegen. Die Sättigung breitet sich aufgrund kurzer T_2 -Relaxation durch Spindiffusion schnell im gesamten Protein aus. Bindet nun ein Ligand an das Protein, wird die Sättigung auf die Protonen des Liganden übertragen. Die Effizienz des Transfers hängt sowohl vom Abstand der Ligandenprotonen zur Proteinoberfläche als auch von der Dauer der Bindung des Liganden in der Bindungstasche ab. Die Liganden befinden sich im ständigen Austausch zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand, dadurch häufen sich die gesättigten Liganden in der Lösung an und können so detektiert werden. Durch einen großen Überschuss an Ligand wird sichergestellt, dass das wiederholte Binden eines Liganden so gering wie möglich bleibt. Durch die Sättigung der Protonen zeigen diese in einem 1D-Protonenspektrum eine verminderte Signalintensität. Dieses Spektrum ist das so genannte On-Resonanz-Spektrum. Als Referenz wird ein Off-Resonanz-Spektrum aufgenommen. Hier liegt die Sättigungsfrequenz außerhalb aller Resonanzen von Protein und Ligand. Durch Subtraktion des On-Resonanz- vom Off-Resonanz-Spektrum erhält man das STD-Spektrum, in diesen sind nur die Signale von bindenden Molekülen zu sehen (Mayer and Meyer 1999; Meyer and Peters 2003).

2.6.2 Bestimmung von Bindungsepitopen mittels STD-NMR-Spektroskopie

Mit Hilfe von Bindungsepitopen von Fragment **382** sollte die Bindung an GTB, sowie die Verdrängung von UDP aus der Bindungstasche untersucht werden. Diese sowie die bereits unter 2.4.2 beschriebenen SPR-Experimente wurden bereits in Jørgensen et al. (Jørgensen, Grimm et al. 2012) veröffentlicht.

Die unmarkierte GTB-Probe wurde konzentriert und der Dialysepuffer gegen STD-NMR-Puffer (siehe Tabelle 2.13) ausgetauscht. Hierfür wurden zuerst 10 mM EDTA hinzugegeben um das in Dialysepuffer vorhandene Mn^{2+} zu komplexieren. Anschließend wurde mit Zentrifugen-Filtereinheiten mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa der Dialysepuffer bei 4 °C und 3200 x g gegen Austausch-Puffer (A), (B), (C) und zuletzt gegen den gewünschten STD-NMR-Puffer in D_2O ausgetauscht. Der Proteingehalt sowie die Aktivität wurden im Anschluss bestimmt.

Die NMR-Proben mit einem Volumen von 180 μ l enthielten 20 μ M GTB in STD-NMR-Probenpuffer und 300 μ M TSP- d_4 als internen Standard. Das zu untersuchende Fragment **382**, sowie UDP wurden in einem Protein:Ligand Verhältnis von 1:50, also 1 mM, verwendet. Die Spektren wurden in 3 mm NMR-Röhrchen bei 298 K mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer

aufgenommen. Es wurde das Bruker Pulsprogramm stddif.3 mit einem 10 ms 7 kHz spin-lock Filter (Mayer and Meyer 1999) zum Reduzieren der Proteinresonanzen verwendet. Die Sättigung der Proteinsignale fand mit einer Kaskade von 70 Hz Gauß-Pulsen mit einer Länge von 50 ms statt. Es wurden Spektren mit Sättigungszeiten von 0,25 bis 2 s aufgenommen. Die Off-Resonanz betrug 80 ppm und die On-Resonanz -1 ppm. Die Spektren wurden mit einer spektralen Breite von 7 kHz und 24 k Datenpunkten und einer zusätzlichen Wartezeit von 4 s aufgenommen. Die Spektren mit einer Sättigungszeit zwischen 0,25 und 0,6 wurden mit 1 k Scans, die mit 0,65 und 0,8 s mit 512 Scans und die zwischen 1,0 und 2,0 s mit 256 Scans aufgenommen.

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit Topspin 2.1 und Origin 7. Die relativen STD-Effekte wurden durch Skalierung des Off-Resonanz-Spektrums auf das STD-NMR-Spektrum bestimmt. Diese Werte wurden gegen die entsprechenden Sättigungszeiten geplottet und an Gl. 2.9 gefittet. Hierbei entspricht STD den STD-Effekt eines Protons bei einer Sättigungszeit t , STD_{max} der maximale STD-Effekt, k_{sat} der Sättigungsrate und b der Verzögerungszeit.

$$STD = STD_{max}(1 - e^{-k_{sat} \cdot t}) - b \quad (Gl. 2.9)$$

Durch Bestimmung der Steigung der STD-Aufbaukurven der einzelnen Protonen bei einer Sättigungszeit von 0 konnten die Bindungsepitope bestimmt werden. Hierfür wurde dem Proton mit dem größten Anteil an Sättigung 100 % zugeordnet und alle weiteren Protonen relativ dazu bestimmt (Mayer and James 2004; Angulo, Enriquez-Navas et al. 2010).

Tabelle 2.13 | Puffer für STD-NMR-Experimente. Die Puffer hatten einen pH-Wert von 6,7 bei 25 °C und wurden in D₂O angesetzt. Die Stammlösungen wurden in D₂O angesetzt und durch wiederholtes Gefriertrocknen und Lösen in D₂O Restwasser entfernt.

Puffer	Zusammensetzung	
STD-NMR-Puffer (D ₂ O)	50 mM	Bis-Tris-d ₁₉
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	2-Mercaptoethanol-d ₆
Austausch-Puffer (A)	25 mM	Bis-Tris
	50 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	2-Mercaptoethanol
Austausch-Puffer (B)	25 mM	Bis-Tris-d ₁₉
	50 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	2-Mercaptoethanol-d ₆
Austausch-Puffer (C)	50 mM	Bis-Tris-d ₁₉
	50 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	2-Mercaptoethanol-d ₆

2.6.3 Tripelresonanzexperimente

Für die GTB sollten die Arbeiten von N. Sindhuwinata (Sindhuwinata 2012) fortgesetzt werden und eine Zuordnung der NMR-Signale erfolgen. Hierfür wurde eine u-²H,¹³C,¹⁵N-markierte GTB-Probe verwendet. Da diese sich bereits in GTB-Phosphatpuffer (siehe Tabelle 2.4) befand musste die Probe nur noch mit Zentrifugen-Filtereinheiten mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa bei 4 °C und 3200 x g konzentriert werden, dabei wurde das 2-Mercaptoethanol gegen 2-Mercaptoethanol-d₆ ausgetauscht. Der Proteingehalt wurde mit dem NanoDrop Spektralphotometer bestimmt. Die NMR-Probe mit einem Volumen von etwa 350 µl wurde in einem 5 mm Shigemi-Röhrchen angesetzt und enthielt 1 mM u-²H,¹³C,¹⁵N-markierte GTB in 25 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 6,7 bei 25 °C), 5 mM MgCl₂, 1 mM 2-Mercaptoethanol-d₆, 300 µM TSP-d₄ als internen Standard und 10 % D₂O. Die Tripelresonanzexperimente wurden von Dr. F. Löhr an der Goethe Universität Frankfurt (Institut für Biophysikalische Chemie, Prof. Dr. V. Dötsch) bei 298 K und 600 MHz bzw. 950 MHz aufgenommen. Alle Parameter sind in Tabelle 2.14 angegeben. Zusätzlich wurden für beide Feldstärken ¹H,¹⁵N-BEST-TROSY-HSQC-Experimente aufgenommen: bei 950 MHz mit 8 Scans, 1886 x 640 Datenpunkten, einer spektralen Breite von 14 ppm in der ¹H-Dimension, bzw. 50 ppm in der ¹³C-Dimension, die Mitte der Spektren lag bei 4,7 ppm und 119 ppm und bei 600 MHz mit 8 Scans, 1024 x 512 Datenpunkten, einer spektralen Breite von 14 ppm in der ¹H-Dimension, bzw. 50 ppm in der ¹³C-Dimension, die Mitte der Spektren lag bei 4,7 ppm und 120 ppm. Die Prozessierung erfolgte sowohl bei den 2D-Spektren als auch bei den Tripelresonanzexperimenten mit einer quadratischen Cosinus-Funktion (QSINE2) in jeder Dimension mit anschließender Fouriertransformation. Das TSP-Signal wurde in den 1D-¹H-NMR-Spektren auf 0 ppm referenziert, die Referenzierung der ¹⁵N-Verschiebung wurde über das Frequenzverhältnis ¹⁵N/¹H=0,101329118 und die der ¹³C-Verschiebung über das Frequenzverhältnis ¹³C/¹H=0,25144953 berechnet (Markley, Bax et al. 1998). Ausgewertet wurden die Spektren mit Topspin 3.1 und CCPNmr Analysis 2.3.1 (Vranken, Boucher et al. 2005).

Tabelle 2.14 | Tripelresonanzexperimente. Die Probe enthielt 1 mM u-²H,¹³C,¹⁵N-markierte GTB in 25 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 6,7 bei 25 °C), 5 mM MgCl₂, 1 mM 2-Mercaptoethanol-d₆, 300 µM TSP-d₄ in 10 % D₂O. Spektren wurden bei 298 K in 5 mm Shigemi-Röhrchen und bei den angegebenen Feldstärken aufgenommen. Die Pulsprogramme wurden von Dr. F. Löhr modifiziert und enthielten eine TROSY-, eine BEST-Sequenz und wenn nötig mit Deuteriumentkopplung (gekennzeichnet mit tr, b und 2H). Einige Spektren wurden mit non-uniform sampling (NUS) durchgeführt (Mobli and Hoch 2014).

Experiment (Pulsprogramm)	$\nu(^1\text{H})$ [MHz]	Scans	Datenpunkte (¹ H x ¹³ C x ¹⁵ N)	Spektrale Breite (¹ H / ¹³ C / ¹⁵ N) [ppm]	Mitte des Spektrums (¹ H / ¹³ C / ¹⁵ N) [ppm]	NUS [%]
HNCA (b_hncatr2H.fl)	950	32	1024 x 112 x 168	12,4 / 27,9 / 25	4,7 / 53 / 120	30
HN(CO)CA (b_hncocacrtr2H.fl)	600	6	768 x 64 x 128	12,5 / 26 / 25	4,7 / 53 / 120	35
HNCO (b_hncotr.fl)	600	16	768 x 64 x 104	12,5 / 13,8 / 25	4,7 / 174 / 120	-

HN(CA)CO (b_hncacotr2H.fl)	950	96	1024 x 116 x 168	12,5 / 14 / 25	4,7 / 174 / 120	30
HNCACB (b_hncacbtr2H.fl)	950	48	1024 x 216 x 168	12,4 / 61,6 / 25	4,7 / 40 / 120	25

2.6.4 Protonen-Deuterium Austausch bei GTB

In dieser Arbeit sollte der Austausch der Amidprotonen bei der GTB untersucht werden. Dies kann Aufschluss über die strukturelle Stabilität und Informationen über Zugänglichkeiten von Lösungsmittel und damit Proteinfaltung geben (Bieri, Kwan et al. 2011). Hierfür wurde die GTB-Probe zuerst in D₂O-haltigen Puffer ausgetauscht und NMR-Spektren über einen bestimmten Zeitraum aufgenommen, anschließend wurde H₂O-haltiger Puffer schrittweise hinzugegeben.

Verwendet wurde hierfür eine u-²H,¹⁵N-markierte GTB die sich in GTB-Phosphatpuffer (siehe Tabelle 2.4) befand. Die Probe wurde mit Zentrifugen-Filtereinheiten mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa bei 4 °C und 3200 x g konzentriert und in NMR-Phosphatpuffer (D₂O) (Tabelle 2.15) ausgetauscht. Der Proteingehalt wurde anschließend mit dem NanoDrop Spektralphotometer bestimmt. Die NMR-Probe mit einem Volumen von 180 µl enthielt 520 µM u-²H,¹⁵N-markierte GTB in NMR-Phosphatpuffer (D₂O) und 100 µM TSP-d₄ als internen Standard. Gemessen wurde direkt nach Pufferaustausch und 6 h, 1 Tag, 2 Tage sowie 5 Tage danach. Aufgenommen wurden jeweils ¹H,¹⁵N-TROSY-HSQC-Spektren (trosetf3gps) mit 48 Scans für die ersten beiden Zeitpunkte und 52 Scans für alle weiteren. Die Spektren wurden bei 298 K mit 2048 x 256 Datenpunkten, einer spektralen Breite von 18 ppm in der ¹H-Dimension, bzw. 45 ppm in der ¹⁵N-Dimension, die Mitte der Spektren bei 4,7 ppm und 122 ppm in einem 3 mm NMR-Röhrchen aufgenommen.

Anschließend wurde die NMR-Probe schrittweise mit H₂O-haltigen Puffer (Tabelle 2.15) versetzt und jeweils direkt nach Zugabe des Puffers und 8 Stunden später ein Spektrum aufgenommen. Die Parameter waren identisch zu denen davor und es wurden jeweils 52 Scans gemessen. Durch Zugabe hat sich die Proteinkonzentration von 520 µM auf 307 µM verringert. Folgende Titrationsschritte wurden durchgeführt: 10 %, 20 %, 30 % und 40 % Wasseranteil. Die Auswertung fand durch Vergleich der Spektren mit Topspin 3.1 statt.

Tabelle 2.15 | NMR-Phosphatpuffer. Der pH-Wert betrug 6,7 bei 25 °C. Für den NMR-Phosphatpuffer (D₂O) wurden alle Lösungen in D₂O angesetzt, lyophilisiert und erneut in D₂O aufgenommen.

Puffer	Zusammensetzung	
NMR-Phosphatpuffer (D ₂ O)	25 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	2-Mercaptoethanol-d ₆
NMR-Phosphatpuffer (H ₂ O)	25 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	2-Mercaptoethanol-d ₆

2.6.5 $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experimente zur Untersuchung der Bindung von UDP an GTB

Um weitere strukturelle Informationen über die Substratbindung an GTB zu erhalten, sollten Titrationsexperimente mit UDP durchgeführt werden. Hierbei sollte die Veränderung der chemischen Verschiebungen der Rückgratsignale in einem $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC bei Zugabe von UDP beobachtet werden.

Verwendet wurde hierfür eine $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -markierte GTB die sich bereits in GTB-Phosphatpuffer (siehe Tabelle 2.4) befand. Die Probe wurde mit Zentrifugen-Filtereinheiten mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa bei 4 °C und 3200 x g konzentriert, dabei wurde das 2-Mercaptoethanol gegen 2-Mercaptoethanol- d_6 ausgetauscht. Der Proteingehalt wurde anschließend mit dem NanoDrop Spektralphotometer bestimmt. Die NMR-Probe enthielt zu Beginn ein Volumen von 180 μl mit 500 μM $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -markierte GTB, 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6,7 bei 25 °C), 5 mM MgCl_2 , 1 mM 2-Mercaptoethanol- d_6 , 100 μM TSP- d_4 als internen Standard und ca. 10 % D_2O . Die Probe wurde in einem 3 mm NMR-Röhrchen bei 298 K gemessen. Im Laufe des Versuches wurden unterschiedliche Mengen einer Stammlösung, mit derselben Zusammensetzung wie die NMR-Probe mit zusätzlich 20 mM UDP, dazu titriert. Zwischen jedem Titrationsschritt wurde sowohl ein 1D-NMR-Spektrum als auch ein 2D-HSQC-Spektrum aufgenommen. Es wurden UDP-Konzentrationen von 0 μM (0 %), 110 μM (10 %), 250 μM (20 %), 600 μM (40 %), 1,2 mM (60 %), 2,6 mM (80 %) und 4,3 mM (87 %) eingesetzt. Die Prozentangaben in den Klammern beziehen sich auf die Belegung der GTB-Bindungsstelle mit UDP, hierfür wurde ein gemittelter K_D -Wert von 575 μM aus SPR- und STD-Messungen angenommen (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013). Das 1D-Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm zgesgp und 32 Scans, sowie einer spektralen Breite von 16 ppm, der Spektrenmitte bei 4,7 ppm und 32 k Datenpunkten aufgenommen. Bei den 2D-HSQC-Experimenten wurde eine BEST-TROSY-Sequenz (b_trosytf3gpsib.tb) verwendet. Für das erste Spektrum wurden 96 Scans, für alle weiteren 250 Scans mit einer spektralen Breite von 18 ppm x 45 ppm, die Mitte des Spektrums bei 4,7 ppm und 117 ppm, mit 2048 x 256 Datenpunkten und folgenden Pulsen: 90 ° (PC9_4_90.100 von 2,2 ms und 0,9 kHz), 180 ° (Reburp.1000 von 1,5 ms und 4,2 kHz) und 90 ° (Eburp2.100 bzw. Eburp2tr.1000 von 1,4 ms und 2,9 kHz) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Topspin 3.1 und CCPNmr Analysis 2.3.1 (Vranken, Boucher et al. 2005). Hierfür wurden die chemischen Verschiebungen und Intensitäten aus den Spektren extrahiert und aus dem ersten und letzten Spektrum mit (Gl. 2.10) die durchschnittliche euklidische Verschiebung (d in ppm) berechnet (Williamson 2013).

$$d = \sqrt{\frac{1}{2}[\delta_H^2 + (\alpha \cdot \delta_N^2)]} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

δ_H und δ_N stehen hierbei für die Differenz der chemischen Verschiebung der jeweiligen Kerne und α ist ein Skalierungsfaktor der hier 0,14 betrug (Williamson 2013). Anschließend wurde die Standardabweichung (σ) aller Werte berechnet und die Signale, die über einem Wert von $1 \cdot \sigma$ lagen, weiter untersucht.

2.6.6 Methyl-TROSY-Experimente mit GTB

In dieser Arbeit sollten erstmals Methyl-TROSY-Experimente mit der GTB durchgeführt werden. Hierfür wurden die δ 1-Methylgruppen der Isoleucinseitenketten selektiv mit $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ in einem ansonsten deuterierten Protein markiert. Zusammen mit Dr. T. Biet (Institut für Chemie) wurden verschiedene Pulssequenzen getestet und evaluiert.

Verwendet wurde hierfür eine $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierte GTB die sich bereits in GTB-Phosphatpuffer (siehe Tabelle 2.4) befand. Die Probe wurde mit Zentrifugen-Filtereinheiten mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa bei 4 °C und 3200 x g konzentriert und gegen NMR-Phosphatpuffer (D_2O) (siehe Tabelle 2.15) ausgetauscht. Der Proteingehalt wurde anschließend mit dem NanoDrop Spektralphotometer bestimmt. Die NMR-Probe enthielt ein Volumen von 180 μl mit 190 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB, 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6,7 bei 25 °C), 5 mM MgCl_2 , 1 mM 2-Mercaptoethanol- d_6 und 100 μM TSP- d_4 als internen Standard. Die Probe wurde in einem 3 mm NMR-Röhrchen gemessen.

Zuerst wurde ein Standard 1D-NMR-Spektrum (zgesgp) mit 32 Scans, 32 k Datenpunkten und einer spektralen Breite von 16 ppm aufgenommen um die Qualität der Ile δ 1-Markierung sowie Deuterierung beurteilen zu können. Anschließend wurde ein Standard HMQC-NMR-Spektrum (hmqcph) mit 4 Scans, 512 x 120 Datenpunkten, einer spektralen Breite von 8 x 20 ppm und der Mitte des Spektrums bei 1 ppm in der ^1H -Dimension, bzw. 12 ppm in der ^{13}C -Dimension aufgenommen. Im Folgenden wurden weitere Varianten dieser Pulssequenz mit Gradienten und einem 90 ° Puls am Anfang (metr_hmqcph.tb bzw. metr_hmqcph-II.tb) und mit zusätzlicher Wasserunterdrückung durch Sättigung (metr_hmqcphpr-III.tb) aufbauend aus den Arbeiten von Tugarinov et al. (Tugarinov, Hwang et al. 2003) getestet. Die Gradienten befanden sich im ersten Spektrum (metr_hmqcph.tb) nicht symmetrisch und im zweiten Spektrum (metr_hmqcph-II.tb) symmetrisch um den Refokussierungspuls. Alle Spektren wurden bei 298 K sowie bei 283 K mit denselben Parametern wie oben aufgenommen. Zusätzlich wurden die Datenpunkte auf 768 x 120 erhöht, sowie eine spektrale Breite von 8 x 30 ppm getestet. Alle Pulsprogramme sind im Anhang unter 6.3 aufgeführt. In allen weiteren Messungen von Methyl-TROSY-Spektren wurde das Pulsprogramm metr_hmqcph.tb verwendet. Dieses beinhaltet die Gradienten, die symmetrisch um den Refokussierungspuls angeordnet sind und eine optionale Wasserunterdrückung.

2.6.7 Methyl-TROSY-Experimente zur Untersuchung der Bindung von UDP und H-Disaccharid an GTB

Da die selektiv markierten δ 1-Methylgruppen der Isoleucine über die gesamte GTB verteilt sind, sollte untersucht werden, ob die Bindung von UDP und H-Disaccharid einen Einfluss auf die Signale haben. Aus der Veränderung der chemischen Verschiebung der Signale bei Zugabe der Substrate konnten die K_D -Werte von UDP und H-Dis ermittelt und mit bereits bekannten Daten verglichen werden.

Verwendet wurde hierfür eine $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierte GTB die sich bereits in GTB-Phosphatpuffer (siehe Tabelle 2.4) befand. Die Probe wurde nun noch mit Zentrifugen-Filtereinheiten mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa bei 4 °C und 3200 x g

konzentriert und gegen NMR-Phosphatpuffer (D₂O) (siehe Tabelle 2.15) ausgetauscht. Der Proteingehalt wurde anschließend mit dem NanoDrop Spektralphotometer bestimmt. Die NMR-Probe enthielt zu Beginn ein Volumen von 180 µl mit 100 µM u-²H,¹⁵N,{Ileδ1-¹³CH₃}-markierter GTB, 25 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 6,7 bei 25 °C), 5 mM MgCl₂, 1 mM 2-Mercaptoethanol-d₆ und 100 µM TSP-d₄ als internen Standard. Die Probe wurde in einem 3 mm NMR-Röhrchen bei 298 K gemessen. Im Laufe des Versuches wurden unterschiedliche Mengen einer Stammlösung mit derselben Zusammensetzung wie die NMR-Probe mit zusätzlich 50 mM UDP, bzw. 50 mM UDP und 5 mM H-Disaccharid-O-¹³CH₃, dazu titriert. Es wurde nicht das H-Disaccharid mit dem Octylspacer verwendet, da bei diesem Signale im Bereich der Methylgruppen zu erwarten sind. Das ¹³C-markierte Methyl hat keinen Einfluss auf die Titration und wurde verwendet, da ansonsten kein weiteres H-Dis vorhanden war. Zwischen jedem Titrationsschritt wurde sowohl ein 1D-NMR-Spektrum als auch ein 2D-Methyl-TROSY-Spektrum aufgenommen. Es wurden UDP-Konzentrationen von 0 µM (0 %), 280 µM (30 %), 930 µM (60 %) und 6,8 mM (92 %) eingesetzt. Anschließend wurde die GTB-Probe mit 50 mM UDP und 5 mM H-Disaccharid-O-¹³CH₃ schrittweise versetzt. Hierbei wurden H-Disaccharid-O-¹³CH₃ Konzentrationen von 30 µM (26 %), 57 µM (50 %), 96 µM (75 %), 170 µM (92 %) und 380 µM (98 %) verwendet. Die UDP-Konzentration stieg bei dieser Titration auf 10 mM. Die Prozentangaben in den Klammern beziehen sich auf die Belegung der GTB-Bindungsstelle mit UDP und H-Disaccharid in Anwesenheit von UDP, hierfür wurde ein gemittelter K_D-Wert für UDP von 575 µM aus SPR- und STD-Messungen und ein Wert von 7 µM H-Dis in Anwesenheit von UDP aus ITC-Messungen angenommen (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013). Das 1D-Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm zgesgp und 32 Scans, sowie einer spektralen Breite von 16 ppm, der Spektrenmitte bei 4,7 ppm und 32 k Datenpunkten aufgenommen. Die Methyl-TROSY-Spektren wurden mit 8 Scans einer spektralen Breite von 8 ppm x 20 ppm, der Mitte des Spektrums bei 0,5 ppm in der ¹H-Dimension, bzw. 12 ppm in der ¹³C-Dimension, 768 x 120 Datenpunkten sowie einer Wasserunterdrückung aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Topspin 3.1. Hierfür wurden die chemischen Verschiebungen und Intensitäten der Peaks, die eine Verschiebung zeigen, aus den Spektren extrahiert. Für jede Konzentration wurde mit (Gl. 2.10) die durchschnittliche euklidische Verschiebung (d in ppm) im Vergleich zum Referenzspektrum berechnet (Williamson 2013). Als Skalierungsfaktor wurde hier der Quotient aus der chemischen Verschiebungsdifferenz der ¹H-Signale (1,26 ppm - (-0,3 ppm) = 1,56 ppm) und ¹³C-Signale (14,7 ppm - 7,6 ppm = 7,1 ppm) verwendet und betrug 0,22. Die berechneten Werte wurden nun gegen die jeweiligen Konzentrationen der Substrate aufgetragen. Aus dieser Bindungsisotherme konnte durch Anpassung der Daten an Gl. 2.11 die Dissoziationskonstante (K_D-Wert) ermittelt werden.

$$\Delta d = \frac{\Delta d_{max} \left((n \cdot c[P] + c[L] + K_D) - \sqrt{(n \cdot c[P] + c[L] + K_D)^2 - 4 \cdot n \cdot c[P]c[L]} \right)}{2 \cdot n \cdot c[P]} \quad \text{Gl. 2.11}$$

Hierbei war n die Anzahl der Bindungsstellen und wurde auf eins gesetzt, c[P] die Proteinkonzentration, hier 0,1 mM und c[L] die jeweilige Ligandenkonzentration. Die Auswertung erfolgte mit Origin 7.

2.6.8 CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit GTB

Die Dynamik der GTB sollte in dieser Arbeit mit CPMG-Relaxations-Dispersions Experimenten untersucht werden. Hierfür wurden die $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucine verwendet. Es wurden unterschiedliche Bedingungen getestet und anschließend Dispersionsprofile mit Donor- und Akzeptorsubstrat gemessen.

Verwendet wurden hierfür unterschiedliche Präparationen von $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB, die wie zuvor beschrieben gegen NMR-Phosphatpuffer (D_2O) (siehe Tabelle 2.15) ausgetauscht wurden. Der Proteingehalt wurde anschließend mit dem NanoDrop Spektralphotometer bestimmt. Die NMR-Proben enthielten ein Volumen von 180 μl mit 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6,7 bei 25 °C), 5 mM MgCl_2 , 1 mM 2-Mercaptoethanol- d_6 und 100 μM TSP- d_4 als internen Standard. Es wurden zwei verschiedene Proteinkonzentrationen eingesetzt. Für Messungen ohne Substrate wurde 190 μM der selektiv markierten GTB eingesetzt, für Messungen mit UDP 170 μM GTB und 9,45 mM UDP und für Messungen mit H-Disaccharid zusätzlich 380 μM H-Disaccharid-O- $^{13}\text{CH}_3$. Die Proben wurden in einem 3 mm NMR-Röhrchen gemessen. Die Pulssequenz für die Methyl-TROSY-Relaxations-Dispersions-Spektren wurde zusammen mit Dr. T. Biet (Institut für Chemie) aus der zuvor verwendeten Methyl-TROSY-Sequenz erstellt. Es wurde die CPMG-Sequenz sowie ein purge-Element in die Sequenz integriert (Korzhev, Kloiber et al. 2004). Das purge-Element verhindert die Bildung von Artefakten. Dies ist jedoch bei großen Proteinen aufgrund schneller Relaxation nicht nötig (Ollerenshaw, Tugarinov et al. 2003; Tugarinov, Hwang et al. 2003). Hier sollten beide Pulssequenzen, mit purge-Element (hmqcrexgpphpr-purge.tb) und ohne purge-Element (hmqcrexgpphpr.tb) getestet werden. Die Methyl-TROSY-Relaxations-Dispersions Spektren (hmqcrexgpphpr.tb) wurden mit 16, 24 oder 48 Scans, einer spektralen Breite von 8 ppm x 20 ppm, der Mitte des Spektrums bei 0,5 ppm in der ^1H -Dimension bzw. 12 ppm in der ^{13}C -Dimension, 768 x 120 Datenpunkten sowie einer Wasserunterdrückung aufgenommen.

Es wurden Mischzeiten (T) von 20 ms, 40 ms und 60 ms mit v_{CPMG} Werten von 50 Hz bis 500 Hz bei einer Feldstärke von 500 MHz getestet. Die Dispersionsprofile wurden bei 275 K, 283 K und 298 K in Doppelbestimmung aufgenommen, die Mittelwerte sowie Fehler von $R_2^{\text{eff}}(v_{\text{CPMG}})$ (Gl. 2.8) berechnet und mit GUARDDD (Kleckner and Foster 2011) ausgewertet.

2.6.9 Methyl-TROSY-Experimente mit Lanthanoiden

Da eine Zuordnung der Methylgruppensignale der Isoleucinseitenketten noch nicht vorhanden war und die GTB eine natürliche Bindungsstelle für Metallionen besitzt, sollte getestet werden, ob eine Zuordnung mit Hilfe von paramagnetischer-NMR-Spektroskopie möglich ist. Hierfür wurden die Lanthanoide Lanthan, Dysprosium, Gadolinium und Ytterbium getestet.

Verwendet wurde eine $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierte GTB, die sich in GTB-Dialysepuffer ohne MnCl_2 (siehe Tabelle 2.4) befand. Die Probe wurde nun noch mit Zentrifugen-Filtereinheiten mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa bei 4 °C und 3200 x g konzentriert und erst gegen Austausch-Puffer (D) und anschließend gegen Bis-Tris-Puffer (D_2O) ausgetauscht (siehe Tabelle 2.16). Der Proteingehalt wurde anschließend mit dem NanoDrop Spektralphotometer bestimmt. Die NMR-Proben enthielten zu Beginn ein Volumen

von 180 μl mit 100 μM $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{C}\text{H}_3\}$ -markierter GTB, 40 mM Bis-Tris- d_{19} (pH 6,7 bei 25 $^{\circ}\text{C}$), 40 mM NaCl, 0,8 mM 2-Mercaptoethanol- d_6 und 100 μM TSP- d_4 als internen Standard. Zusätzlich enthielten die Proben 6,5 mM UDP um sicherzustellen, dass die Metalle in die Bindungsstelle binden. Hierfür wurde der größte K_D -Wert von 710 μM aus SPR-Messungen mit Mg^{2+} angenommen (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013). Die Proben wurden in einem 3 mm NMR-Röhrchen bei 298 K gemessen. Im Laufe des Versuches wurden unterschiedliche Mengen einer Stammlösung mit derselben Zusammensetzung wie die jeweilige NMR-Probe mit zusätzlich 5 mM LaCl_3 , 2 mM DyCl_3 , 5 mM GdCl_3 oder 2,5 mM YbCl_3 dazu titriert. Zwischen jedem Titrationsschritt wurden sowohl ein 1D-NMR-Spektrum, ein 2D-Methyl-TROSY-Spektrum sowie ein Antiphasen-2D-Methyl-TROSY-Spektrum (metr-hmqcphnd.2.tb; Methyl-TROSY-Spektrum ohne Entkopplung) aufgenommen. Zusätzlich wurden von einer NMR-Probe mit DyCl_3 jedoch ohne GTB 1D-Spektren als Referenz aufgenommen. Es wurden Metallkonzentrationen von 0 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM , 150 μM , 200 μM und 300 μM bei LaCl_3 , GdCl_3 und YbCl_3 eingesetzt. Bei DyCl_3 wurden Konzentrationen von 0 μM , 20 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM , 178 μM sowie zusätzlich 266 μM bei der Referenzprobe eingesetzt. Die 1D-Spektren wurden mit dem Pulsprogramm zgesgp und 32 Scans sowie einer spektralen Breite von 16 ppm, einem O1 bei 4,7 ppm und 32k Datenpunkten aufgenommen. Die Methyl-TROSY-Spektren wurden mit 4, 8, 12, 32, 64 oder 72 Scans, einer spektralen Breite von 8 ppm x 20 ppm, der Mitte des Spektrums bei 0,5 ppm in der ^1H -Dimension, bzw. 12 ppm in der ^{13}C -Dimension, 768 x 120 Datenpunkten sowie einer Wasserunterdrückung aufgenommen. Die Antiphasen-Methyl-TROSY-Spektren wurden mit 4, 8, 12, 48 oder 52 Scans, einer spektralen Breite von 8 ppm x 20 ppm, der Mitte des Spektrums bei 0,5 ppm in der ^1H -Dimension, bzw. 12 ppm in der ^{13}C -Dimension, 768 x 120 Datenpunkten sowie einer Wasserunterdrückung aufgenommen.

Tabelle 2.16 | Puffer für NMR-Experimente mit Lanthanoiden. Die Puffer hatten einen pH-Wert von 6,7 bei 25 $^{\circ}\text{C}$ und wurden in D_2O angesetzt. Die Stammlösungen wurden in D_2O angesetzt und durch wiederholtes Gefriertrocknen und Lösen in D_2O Restwasser entfernt.

Puffer		Zusammensetzung
Bis-Tris-Puffer (D_2O)	50 mM	Bis-Tris- d_{19}
	100 mM	NaCl
	1 mM	2-Mercaptoethanol- d_6
Austausch-Puffer (D)	50 mM	Bis-Tris
	50 mM	NaCl
	1 mM	2-Mercaptoethanol

2.6.10 NMR-Untersuchungen an der West-Nil-Virus Protease

Neben NMR-spektroskopischen Untersuchungen der GTB sollte in dieser Arbeit auch die Protease NS2B-NS3 des West-Nil-Virus NMR-spektroskopisch untersucht werden. Hierfür wurden die $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucinseitenketten selektiv mit $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ in einem ansonsten deuterierten Protein markiert. Es wurden wie auch schon bei der GTB CPMG-Relaxations-

Dispersions Experimente durchgeführt. Zusätzlich sollte untersucht werden, inwieweit sich die Dynamik bei Bindung von bekannten Inhibitoren verändert. Hierfür wurde zum einem der WNV-Inhibitor (Ekonomiuk, Su et al. 2009) sowie Aprotinin (Shiryaev, Ratnikov et al. 2006; Mueller, Yon et al. 2007) verwendet. Von Aprotinin wurde zusätzlich die Dissoziationskonstante an die WNV-Protease durch Titration bestimmt.

Bestimmung des K_D -Wertes von Aprotinin an die West-Nil-Virus Protease

Für die Bestimmung des K_D -Wertes von Aprotinin an die WNV-Protease wurde $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markiertes Protein verwendet. Dieses befand sich in SEC-Puffer (siehe Tabelle 2.5) und wurde mit Zentrifugen-Filtereinheiten mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa bei 4 °C und 3200 x g konzentriert und gegen 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25 °C) ausgetauscht. Der Proteingehalt wurde anschließend mit dem NanoDrop Spektralphotometer bestimmt. Die NMR-Probe enthielt zu Beginn der Titration ein Volumen von 160 μl mit 100 μM $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease in 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer und 100 μM TSP- d_4 als internen Standard. Die Probe wurde in einem 3 mm NMR-Röhrchen bei 298 K gemessen. Im Laufe des Versuches wurde eine Stammlösung, mit derselben Zusammensetzung wie die NMR-Probe mit zusätzlich 5 mM Aprotinin dazu titriert. Zwischen jedem Titrationsschritt wurde sowohl ein 1D-NMR-Spektrum als auch ein 2D-Methyl-TROSY-Spektrum aufgenommen. Es wurden Aprotinin-Konzentrationen von 0 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM , 1 mM und 1,5 mM eingesetzt. Die 1D-Spektren wurde mit dem Pulsprogramm zgesgp und 16 Scans, einer spektralen Breite von 16 ppm, die Mitte des Spektrums bei 4,7 ppm und 32 k Datenpunkten aufgenommen. Die Methyl-TROSY-Spektren wurden mit 16 Scans, einer spektralen Breite von 8 ppm x 20 ppm, der Mitte des Spektrums bei 0,5 ppm in der ^1H -Dimension, bzw. 12 ppm in der ^{13}C -Dimension, 768 x 120 Datenpunkten sowie einer Wasserunterdrückung aufgenommen. Da nicht markiertes Aprotinin eingesetzt wurde und ^{13}C eine natürliche Häufigkeit von 1,1 % besitzt, sind alle Methyl- sowie Methylengruppen im Spektrum sichtbar. Um diese von den Signalen der Protease unterscheiden zu können, wurde ein Referenzspektrum mit 2,5 mM Aprotinin in 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25 °C) und 100 μM TSP- d_4 bei 298 K aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Topspin 3.1 und Origin 7. Hierfür wurden die chemischen Verschiebungen und Intensitäten der Peaks aus den Spektren extrahiert. Für jede Konzentration wurde mit (Gl. 2.10) die durchschnittliche euklidische Verschiebung (d in ppm) im Vergleich zum Referenzspektrum berechnet (Williamson 2013). Für Signale mit langsamem Austausch wurde jeweils die Signalintensität (I) des gebundenen Zustandes verwendet. Als Skalierungsfaktor wurde hier ebenfalls der Quotient aus der chemischen Verschiebungsdifferenz der ^1H -Signale und ^{13}C -Signale verwendet und betrug 0,48.

Die berechneten Werte wurden nun gegen die jeweiligen Konzentrationen der Substrate aufgetragen. Aus dieser Bindungsisotherme konnte durch Anpassung der Daten an Gl. 2.11 die Dissoziationskonstante (K_D -Wert) ermittelt werden. N war die Anzahl der Bindungsstellen und wurde auf eins gesetzt, $c[\text{P}]$ die Proteinkonzentration mit 0,1 mM und $c[\text{L}]$ die jeweilige Ligandenkonzentration. Die Auswertung erfolgte mit Origin 7.

CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit der West-Nil-Virus Protease

Für Relaxations-Dispersions Experimente mit der WNV-Protease mussten zuerst die experimentellen Bedingungen getestet werden. Hierfür wurden 300 μM der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Protease (1) in 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25 $^\circ\text{C}$), 100 μM TSP- d_4 als internen Standard sowie 1 mM WNV-Inhibitor verwendet. Dies entsprach einer Sättigung der Protease mit dem WNV-Inhibitor von 95 % mit einem K_D -Wert von 40 μM (Ekonomiuk, Su et al. 2009). Es wurden Mischzeiten (T) von 20 ms und 40 ms bei 283 K sowie 298 K getestet. Die Messbedingungen waren identisch zu denen der GTB (siehe Abschnitt 2.6.8). Anschließend wurden Dispersionsprofile bei unterschiedlichen Temperaturen, zwei verschiedenen Feldstärken sowie in Anwesenheit zweier Inhibitoren angefertigt. Probenzusammensetzung sowie Messparameter sind in Tabelle 2.17 aufgeführt. Die Messungen bei 500 MHz wurden jeweils in Doppelbestimmung und die bei 700 MHz in Einfachbestimmung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Topspin 3.1 und GUARDD (Kleckner and Foster 2011). Hierfür wurden, wenn möglich die Mittelwerte sowie Fehler von $R_2^{\text{eff}}(\nu_{\text{CPMG}})$ berechnet (siehe Abschnitt 2.6.1) und die Daten gefittet.

Tabelle 2.17 | Parameter für CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit der WNV-Protease. Die Proben befanden sich in 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ in D_2O (pH 7 bei 25 $^\circ\text{C}$) sowie 100 μM TSP- d_4 . Die Spektren wurden mit dem Pulsprogramm hmqcrexgpphpr.tb für 500 MHz und hmqcrexgpphpr_HH.2.tb für 700 MHz in 3 mm NMR-Röhrchen aufgenommen. Die Mischzeit (T) betrug 20 ms und es wurden ν_{CPMG} Werte von 50 Hz bis 500 Hz gemessen. Die Messparameter wurden jeweils der verfügbaren Messzeit angepasst.

WNV-Protease [μM]	Ligand	$\nu(^1\text{H})$ [MHz]	Temperatur [K]	Scans Datenpunkte ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) Spektrale Breite ($^1\text{H} / ^{13}\text{C}$) [ppm] Mitte des Spektrums ($^1\text{H} / ^{13}\text{C}$) [ppm]
92	-	500	283	24; 56; 64
			288	768 x 120; 768 x 38
			298	8 / 20; 8 / 6
			310	0,5 / 12; 0,5 / 11
	1 mM WNV-Inhibitor	500	283	56 / 64 / 72
			298	768 x 38
			310	8 / 6
				0,5 / 11
	0,5 mM Aprotinin	500	283	24
			298	768 x 120
			310	8 / 20
				0,5 / 12
300	-	700	288	48
			298	1068 x 38
			310	8 / 6
				0,5 / 11
	2 mM WNV-Inhibitor	700	288	48
			298	1068 x 38
			310	8 / 6
				0,5 / 11

NMR-Spektroskopie

1,5 mM Aprotinin	700	288	40
		298	1068 x 140
		310	8 / 20
			0,5 / 12

3 Ergebnisse

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen der humanen Blutgruppen Glycosyltransferasen sowie der West-Nil-Virus Protease. Der Fokus ist jedoch auf die Glycosyltransferasen, hauptsächlich auf die Blutgruppe B Galactosyltransferase, gelegt. Zunächst werden die Bindungskonstanten und thermodynamische Parameter von Substraten und Substratanaloga, die mit SPR- und ITC-Spektroskopie erhoben wurden, dargestellt. Anschließend wird auf die nähere Charakterisierung der Inhibierung der Glycosyltransferasen durch einen Inhibitor aus einem Fragment-basierten Screening mittels SPR- und STD-NMR-Spektroskopie genauer eingegangen. Ein Großteil der Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen der strukturellen Dynamik der GTB mittels NMR-Spektroskopie. Im letzten Abschnitt werden die Ergebnisse, die mit der WNV-Protease erhoben wurden, dargestellt.

3.1 Charakterisierung der Bindung von Substraten und Substratanaloga an die humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen

Die Charakterisierung der Ligandenbindung trägt stark zum Verständnis des Katalysemechanismus eines Enzyms bei. Hierbei sind vor allem die Bindungskonstanten und thermodynamische Parameter von großer Bedeutung. In diesem Abschnitt der Arbeit wurden sowohl Dissoziationskonstanten mit SPR-Spektroskopie und thermodynamische Daten mittels ITC erhoben. Es wurden Substrate sowie Substratanaloga untersucht, diese sind im Folgenden genauer beschrieben. Die thermodynamischen Daten wurden zusammen mit S. Weißbach (Institut für Chemie) erhoben, ausgewertet und zusammen mit den Daten von N. Sindhuwinata (Sindhuwinata 2012) veröffentlicht (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013). Zusätzlich wurden die Dissoziationskonstanten der Substrate sowie Substratanaloga für die GTA und AAGlyB bestimmt.

3.1.1 Bestimmung der Bindungskonstanten mit Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie

Mit der SPR-Spektroskopie sollten die Bindungskonstanten verschiedener Substrate sowie Substratanaloga an GTA, GTB und AAGlyB bestimmt werden. Verwendet wurden hierfür UDP-Gal, UDP-Glc, UDP, UMP, Uridin sowie das Akzeptorsubstratanalogon 3DD. Die Bindungskonstanten der Donorsubstrate wurden bereits mittels STD-NMR-Spektroskopie (Blume, Angulo et al. 2006) ermittelt. Hierbei wurde kompetitiv gegen UDP-Gal mit Mg^{2+} als bivalentes Kation titriert. Für den Referenzwert wurde jedoch ein K_i von $17 \mu M$ für UDP-Gal verwendet, welcher aus Messungen in Anwesenheit von Mn^{2+} stammt (Seto, Compston et al. 1999), was zwar zu einer korrekten Reihenfolge der Bindungsstärken führt, jedoch zu falschen absoluten Werten. Durch direkte STD-NMR-Titrations wurden die Bindungskonstanten von N. Sindhuwinata (Sindhuwinata 2012) erneut gemessen. Aber auch diese Experimente geben

nur einen Näherungswert der Bindungsaffinitäten, da die Auswertung anhand unterschiedlicher Protonen gemacht werden kann und dies zu unterschiedlichen K_D -Werten führt. Aus diesem Grund sollten die Bindungskonstanten zum Vergleich in Anwesenheit von Mg^{2+} und Mn^{2+} bestimmt werden. Zusätzlich wurde untersucht, ob es einen Unterschied macht, ob auf der Referenzzelle NA immobilisiert ist oder ob diese leer bleibt.

Präparation der Blutgruppenglycosyltransferasen

Die verwendeten Glycosyltransferasen GTA, GTB und AAGlyB, wurden wie unter 2.1 angegeben jeweils in 1 l TB-Medium in *E. coli* synthetisiert und mittels Säulenchromatographie gereinigt. Für die GTA und GTB (1) wurde das ÄKTA-System verwendet. Die AAGlyB wurde mit einer einfachen Peristaltikpumpe gereinigt und aus einer vorangegangenen Masterarbeit (Grimm 2010) weiterverwendet. Die Qualität der Präparationen wurde mit SDS-PAGE (siehe 2.3.1) und Aktivitätstests (siehe 2.3.4) überprüft. Der Proteingehalt wurde sowohl mit dem NanoDrop Spektralphotometer (siehe 2.3.2) als auch mit dem Bradford-Test mit BGG als Standard (siehe 2.3.3) bestimmt. Verunreinigungen mit Nukleinsäuren bzw. Nukleotiden, hier vorwiegend UDP aus dem letzten Reinigungsschritt, konnten ebenfalls mit dem NanoDrop Spektralphotometer detektiert werden. Für die Experimente wurde der Puffer der Proteinproben mit MOPS/ Mg^{2+} Puffer ausgetauscht und erneut die Proteinmenge sowie Verunreinigungen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 und Abbildung 3.1 dargestellt.

Die Ausbeuten der Proteinpräparationen von GTA und GTB lagen bei etwa 70 mg pro Liter Kultur. Die Ausbeute von AAGlyB lag bei etwa 40 mg pro Liter Kultur und war damit nur etwas geringer als die der beiden anderen. Alle Proteinproben zeigen Aktivität, wobei die der GTB mit 13 U/mg gegenüber UDP-u-¹⁴C-Gal deutlich größer war als die der GTA mit 3,3 U/mg gegenüber UDP-u-¹⁴C-GalNAc. AAGlyB kann sowohl UDP-u-¹⁴C-Gal als auch UDP-u-¹⁴C-GalNAc umsetzen. Hierbei war die spezifische Aktivität gegenüber UDP-u-¹⁴C-Gal mit 1,9 U/mg größer als die gegenüber UDP-u-¹⁴C-GalNAc mit 0,7 U/mg. Alle bestimmten A_{260}/A_{280} Quotienten lagen unter 0,6 und weisen auf nukleinsäurefreie Proteinproben hin. Dies und die SDS-PAGE, die jeweils nur die Bande der Proteine zeigen, lassen auf eine erfolgreiche Herstellung von aktiven Proteinproben schließen.

Tabelle 3.1 | Qualitätskontrolle von GTA, GTB (1) und AAGlyB für SPR-Experimente. Verwendete Proteinpräparationen für SPR-Messung mit Substraten sowie Substratanaloga der Blutgruppen Glycosyltransferasen. Angegeben sind die Ausbeuten pro Liter Kultur, die spezifischen Aktivitäten und die Quotienten A_{260}/A_{280} nach Austausch des Puffers. Präparation GTB (1) wurde zusammen mit N. Sindhuwinata (Institut für Chemie) hergestellt.

		GTA	GTB (1)	AAGlyB
Ausbeute		72 mg/l	68 mg/l	41 mg/l
Spezifische Aktivität	UDP-u- ¹⁴ C-GalNAc	3,3 U/mg	-	0,7 U/mg
	UDP-u- ¹⁴ C-Gal	-	13 U/mg	1,9 U/mg
A_{260}/A_{280}		0,55	0,55	0,53

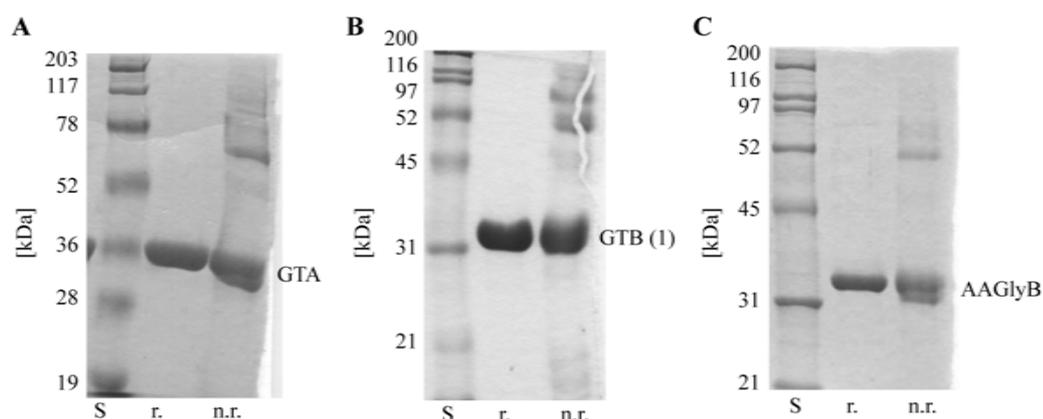


Abbildung 3.1 | SDS-PAGE von GTA, GTB (1) und AAGlyB. Aufgetragen sind jeweils ein Protein-Standard (S) sowie je eine denaturierte Proteinprobe in reduzierendem (r.) und nicht reduzierendem (n. r.) Probenpuffer von (A) GTA, (B) GTB (1) und (C) AAGlyB auf einem 12 %igen SDS-Gel. Die Proteinbande der monomeren GTA, GTB bzw. AAGlyB mit einem Molekulargewicht von 34,6 kDa liegt etwas unterhalb der 36 kDa, bzw. etwas oberhalb der 31 kDa Bande. Unter nicht reduzierenden Bedingungen sind weitere Banden bei vielfachen des monomeren Molekulargewichts zu erkennen, hierbei handelt es sich um Oligomerisierung der Proteine über intermolekulare Disulfidbrücken. Die Bezeichnung der Proteinproben bezieht sich auf Tabelle 3.1.

Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie

Mit Hilfe der SPR-Spektroskopie wurden die Bindungskonstanten von UDP-Gal, UDP-Glc, UDP, UMP, Uridin sowie das Akzeptorsubstratanalogon 3DD an GTA, GTB und AAGlyB in Anwesenheit von Mg^{2+} oder Mn^{2+} bestimmt.

Für die Immobilisierung wurden die Glycosyltransferasen GTA, GTB (1) und AAGlyB (siehe Tabelle 3.1) auf einem CM5-Sensorchip (Chip 1, siehe Tabelle 2.10) immobilisiert. Vorangegangene SPR-Experimente mit GTB zeigten, dass Belegungsdichten im Bereich von 2000-4000 RU optimal waren. Deshalb wurden hier für alle Glycosyltransferasen die größtmögliche Belegungsdichte um die 4000 RU (siehe Tabelle 2.10) gewählt. Da die zu untersuchenden Substrate relativ klein waren, sollten dadurch die größtmöglichen Antwortraten erzielt werden. Für die hier verwendeten Substrate mit einem Molekulargewicht von etwa 370 mg/mol bis 610 mg/mol sollen die Antworten bei einer Belegungsdichte von 4000 RU theoretisch Werte zwischen 42 RU und 70 RU annehmen. Zusätzlich ist es wichtig eine geeignete Referenzzelle zu verwenden, da die Messwerte dadurch um den Anteil unspezifischer Effekte korrigiert werden können. Dafür wurde ein CM5-Sensorchip (Chip 2, siehe Tabelle 2.10) mit GTB (1) (siehe Tabelle 3.1) belegt. Die Referenzzellen waren zum einen leer und zum anderen mit NA belegt. In Abbildung 3.2 sind exemplarisch die Sensorgramme der Messungen mit den beiden unterschiedlichen Referenzen von UDP-Gal an GTB dargestellt. Alle weiteren sind im Anhang (siehe 6.4.1) zu finden. Alle Messungen haben die Form von Rechteckkurven, dies deutet auf schnelle Assoziations- und Dissoziationsraten hin. Eine Auswertung der Gleichgewichtsantworten war daher möglich. Die SPR-Effekte wurden gegen die jeweilige Substratkonzentration in einer Bindungsisotherme aufgetragen und mit der Langmuir-Gleichung angepasst. Exemplarisch dargestellt sind in Abbildung 3.3 die Bindungsisothermen für die Bindung von UDP-Gal an GTB. Alle weiteren Bindungsisothermen sind im Anhang (siehe

6.4.1) zu finden. Die Bindungskonstanten aller Messungen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die ermittelten maximalen Antworten liegen alle unter den theoretischen maximalen Antworten wodurch unspezifische Bindung bzw. eine weitere Bindungsstelle ausgeschlossen werden kann. Jedoch waren die Antworten der Donorsubstrate in den Messungen gegen NA (Fc 4-3) als Referenz höher als die gegen eine leere Referenzzelle gemessenen (Fc 2-1). Dies kam dadurch zustande, dass die Antworten der leeren Referenzzelle (Fc 1) größer waren als die der mit NA belegten (Fc 3). Die unspezifische Bindung der Donorsubstrate ist somit bei der leeren Referenzzelle größer als bei der mit NA belegten Referenzzelle. Zusätzlich wurden bei den Messungen mit UDP-Gal, UDP-Glc, UDP und UMP mit Mn^{2+} als bivalentes Kation und NA als Referenz die Sättigungen in den Bindungsisothermen nicht erreicht. Dies war bei den Messungen mit der leeren Zelle als Referenz der Fall. Auf die Unterschiede zwischen den Messungen mit Mn^{2+} und Mg^{2+} als bivalentes Kation wird weiter unten eingegangen. Bei dem Akzeptorsubstratanalogen 3DD ist kein Unterschied bei den Antworten zu erkennen. Auch die Bindungskonstanten (siehe Tabelle 3.2) der beiden Messungen sind vergleichbar. Die Bindungskonstanten der Donorsubstrate sind bei den Messungen mit NA als Referenz deutlich höher. Bei den Messungen mit einer leeren Zelle als Referenz kann die Reihenfolge der Bindungskonstanten wie sie bereits zuvor publiziert wurde (Blume, Angulo et al. 2006) bestätigt werden. Bei den Messungen mit NA als Referenz hingegen nicht. Aus diesem Grund und da die leere Zelle als Referenz besser die unspezifischen Bindungen an die mit proteinbelegte Zelle widerspiegelt, wird im Folgenden eine leere Zelle als Referenz verwendet.

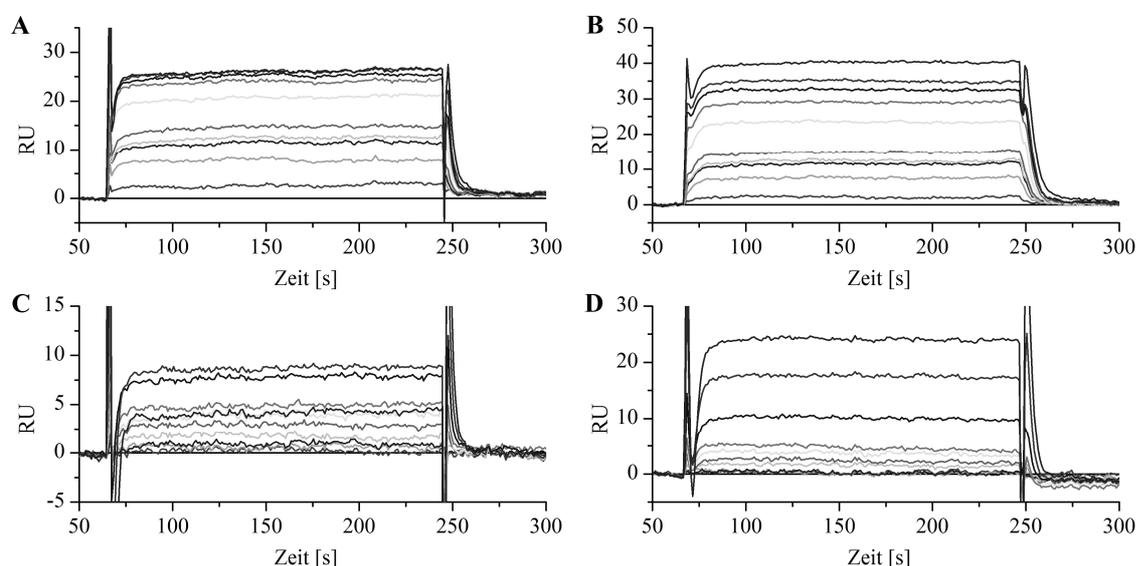


Abbildung 3.2 | Sensorgramme der Bindung von UDP-Gal an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und (A, B) 5 mM $MnCl_2$ bzw. (C, D) 5 mM $MgCl_2$ mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A, C) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B, D) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP-Gal Konzentrationen von 5 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und mit UDP-Gal Konzentrationen von 50 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung. Teile der Ergebnisse wurden bereits in (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) veröffentlicht.

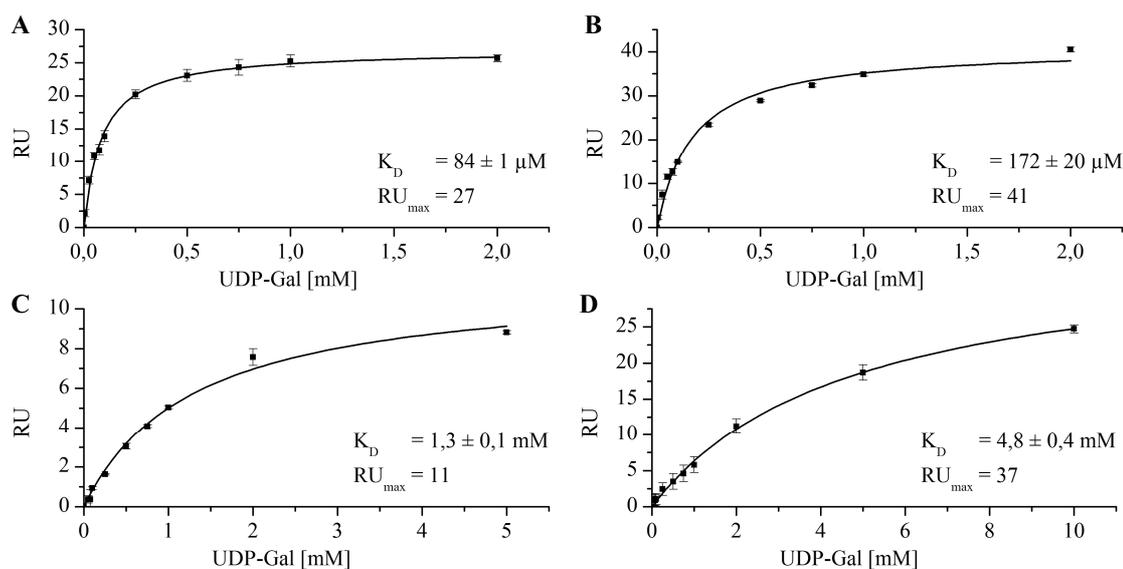


Abbildung 3.3 | Bindungsisotherme der Bindung von UDP-Gal an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und (A, B) 5 mM $MnCl_2$ bzw. (C, D) 5 mM $MgCl_2$ mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A, C) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B, D) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP-Gal Konzentrationen von 5 μM bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und von 50 μM bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. In den jeweiligen Graphen sind die Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximale Antwort RU_{max} angegeben. Teile der Ergebnisse wurden bereits in (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) veröffentlicht.

Tabelle 3.2 | Vergleich der Dissoziationskonstanten verschiedener Substrate gegenüber GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ bzw. 5 mM $MgCl_2$ mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Substrate wurden in dreifacher Bestimmung gemessen und die erhaltenen Bindungsisothermen an (Gl. 2.2) gefittet. Teile der Ergebnisse wurden bereits in (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) veröffentlicht.

Substrat	M^{2+}	GTB (Referenzzelle: leer)	GTB (Referenzzelle: NA)
UDP-Gal	Mn^{2+}	$84 \pm 1 \mu M$	$172 \pm 20 \mu M$
UDP-Glc	Mn^{2+}	$67 \pm 3 \mu M$	$135 \pm 16 \mu M$
UDP	Mn^{2+}	$40 \pm 2 \mu M$	$166 \pm 26 \mu M$
UMP	Mn^{2+}	$81 \pm 4 \mu M$	$208 \pm 28 \mu M$
Uridin	Mn^{2+}	$2,0 \pm 0,2$ mM	$2,9 \pm 0,1$ mM
3DD	Mn^{2+}	$0,30 \pm 0,03$ mM	$0,24 \pm 0,01$ mM
UDP-Gal	Mg^{2+}	$1,3 \pm 0,1$ mM	$4,8 \pm 0,4$ mM
UDP-Glc	Mg^{2+}	$1,3 \pm 0,1$ mM	$4,0 \pm 0,3$ mM
UDP	Mg^{2+}	$491 \pm 86 \mu M$	$4,2 \pm 0,3$ mM
UMP	Mg^{2+}	$1,4 \pm 0,3$ mM	$5,9 \pm 0,2$ mM
Uridin	Mg^{2+}	$2,1 \pm 0,2$ mM	$2,7 \pm 0,3$ mM

Für die Bestimmung der Bindungskonstanten wurden GTA, GTB und AAGlyB jeweils auf einem Sensorchip (Chip 1, siehe Tabelle 2.10) auf den Fc 2, 3 und 4 immobilisiert und gegen eine leere Referenzzelle (Fc 1) gemessen. Die Messungen wurden mit den Donorsubstraten UDP-Gal, UDP-Glc, UDP, UMP, Uridin und dem Akzeptorsubstratanalogon 3DD durchgeführt. Als bivalentes Kation wurde sowohl Mn^{2+} als auch Mg^{2+} verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung durchgeführt und die Messungen mit GTB wurden zusammen mit den vorangegangenen Messungen (Chip 2, Fc 2-1) ausgewertet. Auch hier haben alle Messungen die Form von Rechteckkurven und lassen sich so wie oben beschrieben gut auswerten. In Abbildung 3.4 sind die Sensorgramme und in Abbildung 3.5 die Bindungsisothermen der Messungen mit UDP-Gal und GTB in Anwesenheit von Mn^{2+} und Mg^{2+} dargestellt.

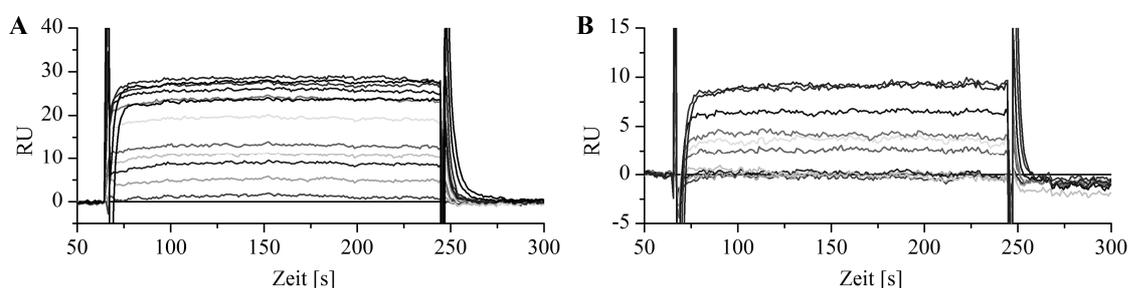


Abbildung 3.4 | Sensorgramme der Bindung von UDP-Gal an immobilisierte GTB mit Mn^{2+} (A) und Mg^{2+} (B) als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ (A) bzw. 5 mM $MgCl_2$ (B) mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP-Gal Konzentrationen von 5 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und mit UDP-Gal Konzentrationen von 50 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung. Die Ergebnisse wurden bereits in (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) veröffentlicht.

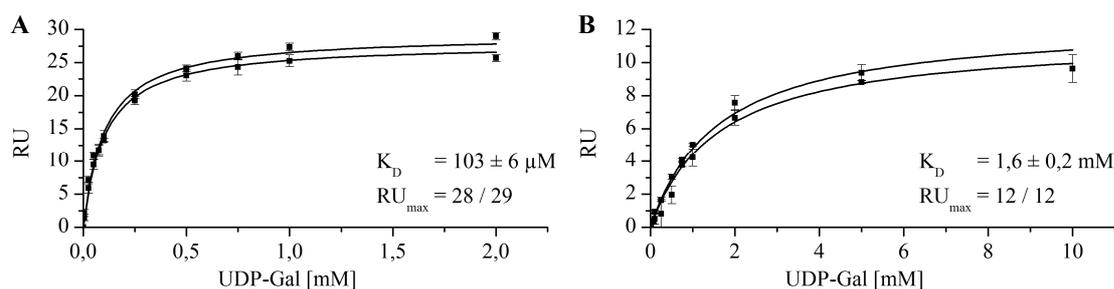


Abbildung 3.5 | Bindungsisotherme der Bindung von UDP-Gal an immobilisierte GTB mit Mn^{2+} (A) und Mg^{2+} (B) als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ (A) bzw. 5 mM $MgCl_2$ (B) mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1 und 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP-Gal Konzentrationen von 5 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und mit UDP-Gal Konzentrationen von 50 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. Die Messungen von Chip 1 und Chip 2 wurden zusammen mit einem K_D -Wert und zwei RU_{max} gefittet (Gl.2.2). Eingefügt in den Graphen wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximalen Antworten RU_{max} . Die Ergebnisse wurden bereits in (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) veröffentlicht.

Es ist deutlich zu sehen, dass die Messungen in Anwesenheit von Mg^{2+} deutlich kleinere Antworten zeigen als die mit Mn^{2+} . Dies spiegelt sich natürlich auch in den Bindungsisothermen wieder. Diese ergeben mit einem Wert von $1,6 \pm 0,2$ mM eine deutlich größere Bindungskonstante als die mit Mn^{2+} von 102 ± 6 μ M. Durch die geringen Antwortraten bei den Messungen mit Mg^{2+} sind gerade in den kleinen Konzentrationsbereichen die Fehler deutlich größer. Es konnten jedoch alle Messungen durchgeführt und ausgewertet werden. Die Sensorgramme sowie die Bindungsisothermen aller Messungen sind im Anhang (siehe 6.4.1) zu finden.

Tabelle 3.3 | Dissoziationskonstanten verschiedener Substrate gegenüber GTA, GTB und AAGlyB. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ bzw. 5 mM $MgCl_2$ mit GTA, GTB bzw. AAGlyB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1, 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Substrate wurden in dreifacher Bestimmung gemessen. Die Messungen mit GTB wurden doppelt durchgeführt. Die erhaltenen Bindungsisothermen wurden mit (Gl. 2.2) gefittet. Die Ergebnisse der GTB wurden bereits in (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) veröffentlicht.

Substrat	M^{2+}	GTA	GTB	AAGlyB
UDP-Gal	Mn^{2+}	58 ± 5 μ M	103 ± 6 μ M	29 ± 4 μ M
UDP-Glc	Mn^{2+}	62 ± 4 μ M	85 ± 5 μ M	14 ± 2 μ M
UDP	Mn^{2+}	37 ± 2 μ M	55 ± 4 μ M	25 ± 2 μ M
UMP	Mn^{2+}	95 ± 4 μ M	107 ± 7 μ M	84 ± 7 μ M
Uridin	Mn^{2+}	$1,6 \pm 0,2$ mM	$2,7 \pm 0,3$ mM	$5,5 \pm 0,6$ mM
3DD	Mn^{2+}	98 ± 9 μ M	260 ± 16 μ M	42 ± 4 μ M
UDP-Gal	Mg^{2+}	$1,7 \pm 0,3$ mM	$1,6 \pm 0,2$ mM	$0,97 \pm 0,15$ mM
UDP-Glc	Mg^{2+}	$2,2 \pm 0,6$ mM	$1,0 \pm 0,1$ mM	$0,40 \pm 0,15$ mM
UDP	Mg^{2+}	$0,54 \pm 0,04$ mM	$0,71 \pm 0,09$ mM	$0,47 \pm 0,07$ mM
UMP	Mg^{2+}	$1,4 \pm 0,2$ mM	$1,0 \pm 0,1$ mM	$1,5 \pm 0,4$ mM
Uridin	Mg^{2+}	$0,53 \pm 0,1$ mM	$1,7 \pm 0,1$ mM	$1,7 \pm 0,2$ mM

In Tabelle 3.3 sind alle Bindungskonstanten der Messungen zusammengefasst. Deutlich zu sehen ist, dass bei allen Messungen die Art des bivalenten Kations einen großen Einfluss auf die Bindungsaffinität hat. Diese ist bei Anwesenheit von Mn^{2+} deutlich größer. Wie auch in vorangegangenen Arbeiten für die GTB gezeigt wurde (Boix, Zhang et al. 2002; Blume, Angulo et al. 2006; Grimm 2010) ist auch hier die Affinität von UDP am größten und liegt bei 55 ± 4 μ M. Das Donorsubstratanalogon UDP-Glc bindet mit vergleichbaren Affinitäten an die GTB wie das natürliche Donorsubstrat UDP-Gal. Die Bindungskonstanten liegen für UDP-Glc bei 85 ± 5 μ M und für UDP-Gal bei 102 ± 6 μ M und sind somit etwa doppelt so groß wie die für UDP. Die Bindungskonstante von UMP liegt mit 107 ± 7 μ M ebenfalls über der von UDP, aber im Bereich der aktivierten Zucker. Uridin zeigt hier die schlechteste Bindung und liegt mit $2,7 \pm 0,3$ mM im millimolaren Bereich. Die Bindungskonstanten der Substrate an GTA liegen alle etwas unter denen der GTB, weisen jedoch eine vergleichbare Reihenfolge auf. Auffällig ist jedoch der Wert von Uridin in Anwesenheit von Mg^{2+} der mit $0,53 \pm 0,1$ mM deutlich unter dem Wert von $1,7 \pm 0,1$ mM der GTB. Auch der Wert von Uridin bei GTA in Anwesenheit von Mn^{2+} mit $1,6 \pm 0,2$ mM ist deutlich höher als dieser. Die Messungen mit AAGlyB zeigen ebenfalls ein vergleichbares Ergebnis mit Bindungskonstanten für UDP-Gal, UDP-Glc und

UDP nochmals kleiner als die bei GTA und GTB. Wobei bei den Messungen mit AAGlyB die Bindung von UDP-Glc sowohl bei Mn^{2+} , als auch bei Mg^{2+} am stärksten ist. Die Bindungskonstante von Uridin liegt bei den Messungen mit Mn^{2+} bei $5,5 \pm 0,6$ mM und ist damit sehr hoch. Neben den Donorsubstraten wurde auch noch das Akzeptorsubstratanalogen 3DD in Anwesenheit von Mn^{2+} gemessen. Dies bindet GTB mit einer Affinität von 260 ± 16 μ M am schlechtesten. Die Bindung an GTA liegt bei 98 ± 9 μ M und die an AAGlyB bei 42 ± 4 μ M.

3.1.2 Bestimmung der thermodynamischen Parameter mit isothermer Titrationskalorimetrie

Mit der isothermen Titrationskalorimetrie kann neben den Bindungsaffinitäten auch die Enthalpie und damit die Entropie bestimmt werden. Mit diesen Parametern können Bindungsvorgänge genauer charakterisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bindung der zuvor mit SPR-Spektroskopie untersuchten Donorsubstrate an GTB weiter untersucht werden. Jedoch wurden nur Substrate betrachtet, die im mikromolaren Bereich binden, da bei schwächerer Bindung zu viel Protein benötigt werden würde. Verwendet wurden hierfür UDP-Glc, UDP, UDP-Gal sowie das Akzeptorsubstrat H-Disaccharid (H-Dis) und das Akzeptorsubstratanalogen 3DD. Zusätzlich sollen auch kooperative Effekte zwischen den Donor- und Akzeptorsubstraten untersucht werden. Es ist bekannt, dass die Bindungsaffinität von UDP und UDP-Gal in Anwesenheit des Akzeptorsubstrats bzw. des Akzeptorsubstratanalogs 3DD deutlich steigt (Sindhuwinata, Munoz et al. 2010). Neben Messungen der Bindung von UDP, UDP-Gal, UDP-Glc und H-Dis wurden von N. Sindhuwinata bereits ITC-Messungen zur Kooperativität von UDP und H-Dis durchgeführt (Sindhuwinata 2012). Bei UDP-Gal ist zu beachten, dass es während den Experimenten hydrolysiert wird und in Anwesenheit von H-Dis eine Umsetzung stattfindet. Daher wurde für die kooperativen Untersuchungen mit H-Dis das Donorsubstratanalogen UDP-Glc verwendet, welches von der GTB nur mit 1 % der Aktivität gegenüber UDP-Gal umgesetzt wird. Für Messungen mit UDP-Gal wurde das Akzeptorsubstratanalogen 3DD verwendet, das ähnlich wie das H-Dis bindet. Allerdings fehlt bei 3DD die OH-Gruppe auf das die Galactose normalerweise übertragen wird. Desweiteren wurde dass α -L-Fuc-(1,2)- β -D-3-amino-3-deoxy-Gal-O-methyl (3AD) verwendet. Dieses Akzeptorsubstratanalogen bindet jedoch anders, als das Akzeptorsubstratanalogen 3DD an GTB (Nguyen, Seto et al. 2003).

Präparation der Blutgruppenglycosyltransferasen

Die verwendeten GTB Proben wurden freundlicherweise von T. Köhli (Institut für Chemie) hergestellt. Insgesamt wurden fünf Ansätze GTB (2-6) wie unter 2.1 angegeben jeweils in 1 l TB-Medium in *E. coli* synthetisiert und mittels Säulenchromatographie mit einem ÄKTA-System gereinigt. Die Qualität der Präparationen wurde mit SDS-PAGE (siehe 2.3.1) und Aktivitätstests (siehe 2.3.4) überprüft. Der Proteingehalt wurde sowohl mit dem NanoDrop Spektralphotometer (siehe 2.3.2) als auch mit dem Bradford-Test mit BGG als Standard (siehe

2.3.3) bestimmt. Anschließend wurden die GTB Präparationen (2-4) und (5-6) zusammengegeben, konzentriert und gegen den Messpuffer MOPS/Mn²⁺ (siehe Tabelle 2.11) ausgetauscht und erneut die Aktivität und der Proteingehalt bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Die Ausbeuten der Proteinpräparationen lagen bei allen Präparationen um die 28 mg pro Liter Kultur und damit deutlich unter den Ausbeuten die normalerweise erzielt wurden. Jedoch sind beide vereinigten Proben rein und zeigen normale Aktivitäten.

Tabelle 3.4 | Qualitätskontrolle von GTB (2-6) für ITC-Experimente. Verwendete Proteinpräparationen für ITC-Messung mit Substraten, sowie Substratanaloga der GTB. Angegeben sind die Ausbeuten pro Liter Kultur, sowie die spezifische Aktivität und die Quotienten A_{260}/A_{280} nach Austausch des Puffers. Es wurden sowohl GTB (2-4) als auch GTB (5) und (6) vereinigt

	GTB (2)	GTB (3)	GTB (4)	GTB (5)	GTB (6)
Ausbeute	25 mg/l	30 mg/ml	29 mg/l	32 mg/l	23 mg/l
Spezifische Aktivität		10 U/mg		18 U/mg	
A_{260}/A_{280}		0,6		0,67	

Isotherme Titrationskalorimetrie

Mit ITC-Messungen wurden die Bindungskonstanten und thermodynamische Parameter der Bindung von den Donorsubstraten UDP und UDP-Glc und dem Akzeptorsubstratanalogen 3AD bestimmt. Zusätzlich wurden H-Dis in Anwesenheit von UDP und UDP-Glc und 3DD in Anwesenheit von UDP-Gal und UDP-Glc gemessen. Hierbei wurde die GTB in der Probezelle vorgelegt und mit dem entsprechenden Liganden titriert. Bei Studien zur Kooperativität wurde ein Bindungspartner mit 10-fachem Überschuss zusammen mit der GTB vorgelegt und mit dem anderen Bindungspartner titriert. Alle Messungen wurden bei 25 °C, einem pH-Wert von 6,7 und mit Mn²⁺ als bivalentes Kation durchgeführt.

Für die ITC-Experimente mussten alle Proben in demselben Puffer vorliegen. Dafür wurde einmal ein MOPS/Mn²⁺-Puffer (siehe Tabelle 2.11) hergestellt, in dem anschließend alle Liganden gelöst und in dem alle Messungen durchgeführt wurden. Die GTB-Proben wurden gegen diesen Puffer dialysiert und vor jeder Injektion entgast. Zu Beginn wurde getestet, ob eine einfache Injektion von Puffer in Puffer und von Puffer in GTB eine Wärmeänderung hervorruft und die Messdaten um diesen entsprechenden Wert korrigiert werden müssen. Es wurden acht bzw. sechzehn Injektionen von je 2,5 µl injiziert, die durchschnittlich eine Differenz in der Heizleistung von Referenz- und Probezelle (ΔP) von -0,06 µcal/sec bzw. -0,08 µcal/sec zeigten. Dieser Effekt ist zu klein um einen Einfluss auf die Messungen zu haben. Bei ersten Messungen mit der GTB bildeten sich Aggregate bzw. Präzipitate, dies war durch extreme Ausschläge im Signal zu erkennen. Durch heruntersetzten der Rührgeschwindigkeit von 1000 rpm auf 500 rpm konnte dieses Problem reduziert werden. Eine geringe Aggregatbildung bzw. Präzipitation war nicht zu verhindern. Für eine optimale Auswertung der Ergebnisse ist es von Vorteil, wenn sich die Titrationskurve am Anfang und am Ende einem konstanten Wert nähert. Dies ist bei C-Faktoren über 10 normalerweise der Fall. Anhand von vorangegangenen Messungen von GTB mit UDP wurde die ideale Konzentration der Proteinlösung ermittelt. Es wurden Konzentrationen von etwa 80 µM bis 400 µM getestet.

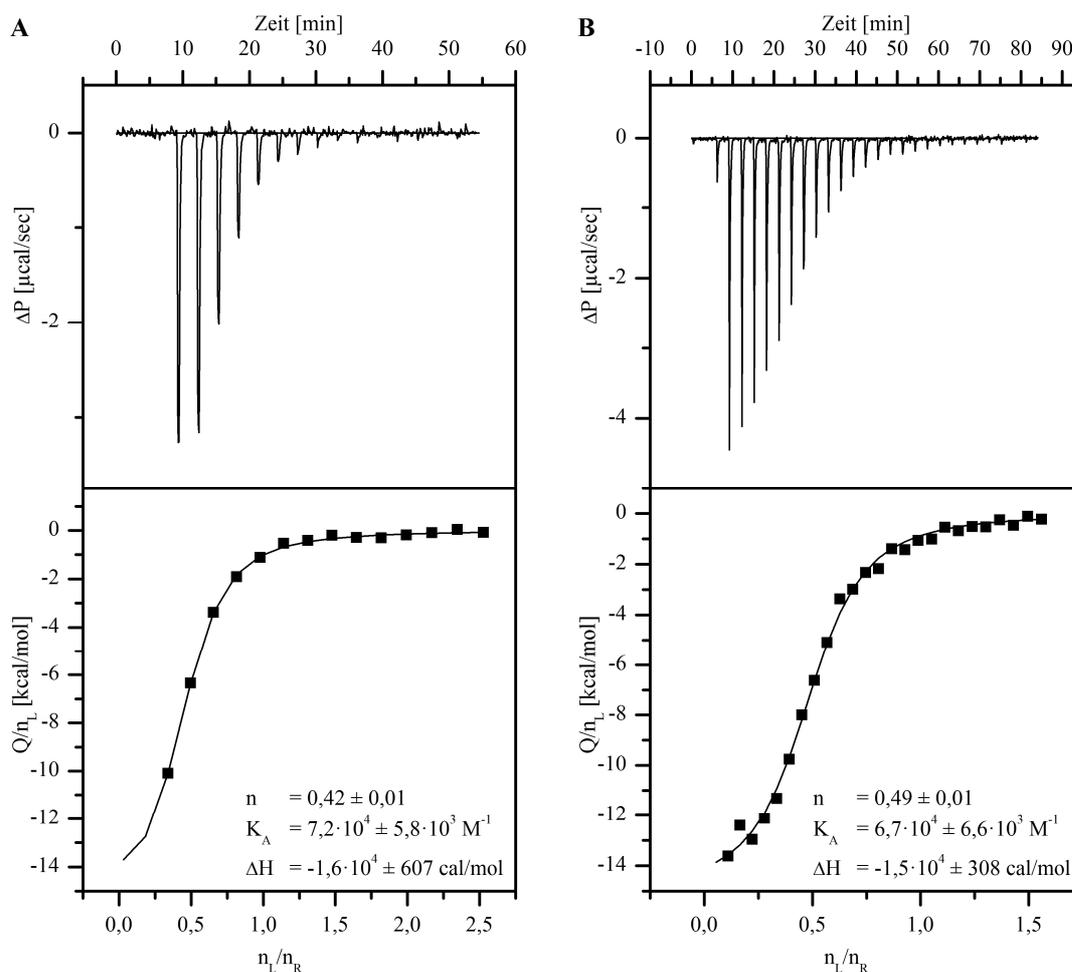


Abbildung 3.6 | ITC-Thermogram von GTB titriert mit UDP bei 25°C. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl, 5 mM MnCl₂ und 1 mM 2-Mercaptoethanol durchgeführt. Oben sind jeweils die Rohdaten gezeigt. Der Graph unten zeigt die gemessene Wärmemenge (Q) dividiert durch die injizierte Stoffmenge des Liganden n_L , aufgetragen gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Rezeptor. Eingefügt in den jeweiligen Graphen sind die Anzahl an Bindungsstellen (n), die Assoziationskonstante (K_A in M^{-1}) sowie die Enthalpie (ΔH in cal/mol) und die jeweiligen Standardabweichungen. In (A) betrug die Proteinkonzentration 242 μM GTB und es wurden 15 Injektionen mit je 2,5 μl einer 3 mM UDP-Lösung durchgeführt. In (B) betrug die Proteinkonzentration 403 μM GTB und es wurden 26 Injektionen mit je 1,5 μl einer 3 mM UDP-Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden bereits in (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) veröffentlicht.

In Abbildung 3.6 sind die Ergebnisse der Messungen mit 242 μM und 403 μM GTB dargestellt. Da sich erst bei der höchsten Proteinkonzentration der optimale Kurvenverlauf zeigte, wurden alle weiteren Messungen möglichst mit dieser Konzentration durchgeführt. Es war nicht möglich für alle Experimente einen optimalen Kurvenverlauf zu bekommen. Da diese aber einen sigmoidalen Kurvenverlauf zeigten, konnten sie trotzdem ausgewertet werden. Die Abbildungen aller Messungen, sowie die experimentellen Bedingungen, sind im Anhang (siehe 6.4.2) zu finden. Die ermittelten Parameter sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Aus Materialmangel konnten nicht alle Messungen in Mehrfachbestimmung durchgeführt werden. Bei denen es möglich war, war bei der Bestimmung der K_D -Werte und damit auch von der

freien Bindungsenergie ΔG eine sehr gute Reproduzierbarkeit gegeben. Die Enthalpie ΔH und damit auch $T\Delta S$ weichen in den Mehrfachbestimmungen stärker voneinander ab. Die Stöchiometriefaktoren (n) variieren sehr stark und liegen zwischen 0,13 und 0,69. Aus Kristallographie- (Patenaude, Seto et al. 2002; Alfaro, Zheng et al. 2008) und ESI-MS-Experimenten (Shoemaker, Soya et al. 2008; Soya, Shoemaker et al. 2009) ist bekannt, dass die Bindungsstöchiometrie 1:1 sowohl für Donor- als auch für Akzeptorsubstrat beträgt. Es ist zwar auch bekannt, dass die GTB ein stabiles Dimer mit zwei Bindungsstellen formt, diese sind jedoch unabhängig voneinander (Shoemaker, Soya et al. 2008). Daher sollte ein $n = 1$ beim Fitten gegen die Wiseman-Gleichung (Wiseman, Williston et al. 1989) erhalten werden. Abweichungen könnten durch Präzipitation und Fehler in der Bestimmung des Proteingehaltes entstanden sein.

Alle hier erhobenen thermodynamischen Parameter zeigen, dass die Bindungen mit negativen, also günstigen, Enthalpieänderungen und positiven, also ungünstigen, Entropieänderungen ablaufen. Auffällig hierbei ist die Bindung von UDP-Glc mit einem deutlich ungünstigeren Entropiebeitrag als die Bindung von UDP-Gal (Sindhuwinata 2012). Die angefallenen Daten wurden zusammen mit Sophie Weißbach (Institut für Chemie) erhoben und ausgewertet und werden zusammen mit den Daten von N. Sindhuwinata (Sindhuwinata 2012) und Sabrina Polk (Polk 2010) in Abschnitt 4.2 diskutiert.

Tabelle 3.5 | Thermodynamisch Parameter der Bindung verschiedener Substrate an GTB. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl, 5 mM $MnCl_2$ und 1 mM 2-Mercaptoethanol bei 25 °C durchgeführt. Die Ergebnisse wurden bereits in (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) veröffentlicht.

Titrierter Ligand	Vorgelegter Ligand	ΔH [kJ/mol]	$-T\Delta S$ [kJ/mol]	ΔG [kJ/mol]	K_D [μM]	n	C-Faktor
UDP	-	-66	38	-28	14	0,42	17
UDP	-	-73	47	-27	22	0,37	15
UDP	-	-63	35	-28	15	0,49	27
UDP	H-Dis	-72	40	-33	1,9	0,36	203
UDP-Gal	3DD	-109	77	-32	2,9	0,24	135
UDP-Glc	-	-47	19	-28	13	0,65	17
UDP-Glc	-	-70	43	-27	17	0,20	23
UDP-Glc	H-Dis	-54	27	-27	17	0,13	23
UDP-Glc	H-Dis	-70	40	-30	6,4	0,16	61
UDP-Glc	3DD	-45	15	-30	5,2	0,27	75
3AD	-	-23	5	-27	17	0,69	14
3AD	-	-32	6	-26	30	0,46	8

3.2 Bindungsstudien mit einem Inhibitor der humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen

Neben der Charakterisierung von Substraten und Substratanaloga sollte in dieser Arbeit auch die Bindung eines Inhibitors genauer untersucht werden. Bei dem Inhibitor handelt es sich um 3-Phenyl-5-piperazino-1,2,4-thiadiazole (Fragment **382**), welches in einem NMR-Screening gegenüber der GTB die besten inhibitorischen Eigenschaften zeigte (Rademacher, Landstrom et al. 2010). Es wurden Bindungsstudien mit SPR- und STD-NMR-Experimenten mit GTA, GTB und AAGlyB durchgeführt. Zusätzlich wurde die Verdrängung von UDP durch Fragment **382** untersucht. Die erhaltenen Daten wurden bereits in Jørgensen et al. (Jorgensen, Grimm et al. 2012) veröffentlicht.

3.2.1 Bestimmung der Bindungskonstanten mit Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie

Mit der SPR-Spektroskopie wurden die Bindungskonstanten des Glycosyltransferase Inhibitors **382** an GTA, GTB und AAGlyB bestimmt. Die Messungen wurden jeweils zum Vergleich ohne bzw. mit Mg^{2+} und Mn^{2+} als mögliche bivalente Kationen durchgeführt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob UDP einen Einfluss auf die Bindung von Fragment **382** besitzt.

Es wurden dieselben Präparationen von GTA, GTB und AAGlyB wie unter 3.1.1 beschrieben eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 und Abbildung 3.1 dargestellt. Die Experimente wurden doppelt mit zwei CM5-Sensorchips durchgeführt (Chip 3 und Chip 4, siehe Tabelle 2.10). Als Referenzzelle wurde eine leere Sensorzelle verwendet und die Proteinproben wurden mit jeweils ca. 4000 RU auf die weiteren Flusszellen immobilisiert. GTB auf Fc 2, AAGlyB auf Fc 3 und GTA auf Fc 4. Die theoretischen Maximalwerte liegen hier für Fragment **382** mit einem Molekulargewicht von 246,33 g/mol bei etwa 30 RU.

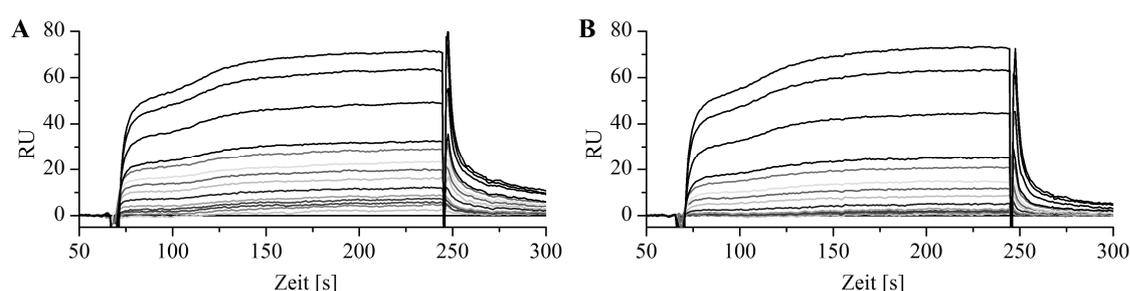


Abbildung 3.7 | Sensorgramme der Bindung von Fragment 382 an immobilisierte GTB mit Mn^{2+} in Ab- und Anwesenheit von UDP. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von 1 mM UDP mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 3) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle verwendet. Alle Messungen wurden auf zwei unterschiedlichen Sensorchips in dreifacher Bestimmung mit Konzentrationen von Fragment **382** von 25 μ M bis 7 mM durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung. Die Ergebnisse wurden bereits in (Jorgensen, Grimm et al. 2012) veröffentlicht.

In den Sensorgrammen aller Messungen konnte sowohl der Assoziations- als auch der Dissoziationsvorgang beobachtet werden. Dieser Vorgang war jedoch sehr schnell und ein Gleichgewicht stellte sich bereits nach etwa der Hälfte der injizierten Ligandenlösung ein. In Abbildung 3.7 sind exemplarisch die Sensorgramme der Messungen von Fragment **382** an GTB mit Mn^{2+} als bivalentes Kation und in Ab- bzw. Anwesenheit von UDP dargestellt. Alle weiteren Sensorgramme weisen einen ähnlichen Verlauf auf und sind im Anhang (6.5.1) abgebildet. Die SPR-Effekte wurden gegen die jeweilige Substratkonzentration aufgetragen. In Abbildung 3.8 sind die resultierenden Bindungsisothermen von Fragment **382** an GTB in Ab- bzw. Anwesenheit von UDP dargestellt. Alle weiteren Bindungsisothermen der Messungen mit GTA, GTB und AAGlyB sind im Anhang (6.5.1) zu finden. Die Werte übersteigen die theoretischen maximalen Antworten von 30 RU deutlich. Dies und der stetige Anstieg im hinteren Teil der Kurve weisen auf zusätzliche unspezifische Bindungen hin. Bei der Auswertung wird hier von einem Modell mit zwei Bindungsstellen ausgegangen, wobei die unspezifische Bindung im hohen millimolaren Bereich liegt und mit SPR-Experimenten nicht messbar ist. In Abbildung 3.9 sind die spezifischen Dissoziationskonstanten dargestellt. Alle weiteren Dissoziationskonstanten sowie gefittete Daten der gemessenen Experimente sind im Anhang (6.5.1) angegeben. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass Fragment **382** die stärkste Affinität gegenüber GTB hat. Zusätzlich nimmt der inhibitorische Effekt drastisch ab, sobald UDP und Mn^{2+} vorhanden sind. Dies ist bei allen drei Glycosyltransferasen der Fall, jedoch ist der Effekt bei GTB ebenfalls am stärksten. Es kann vermutet werden, dass der UDP- Mn^{2+} Komplex stärker an die Glycosyltransferasen binden als der UDP- Mg^{2+} Komplex, da der UDP- Mg^{2+} Komplex leichter verdrängt werden kann.

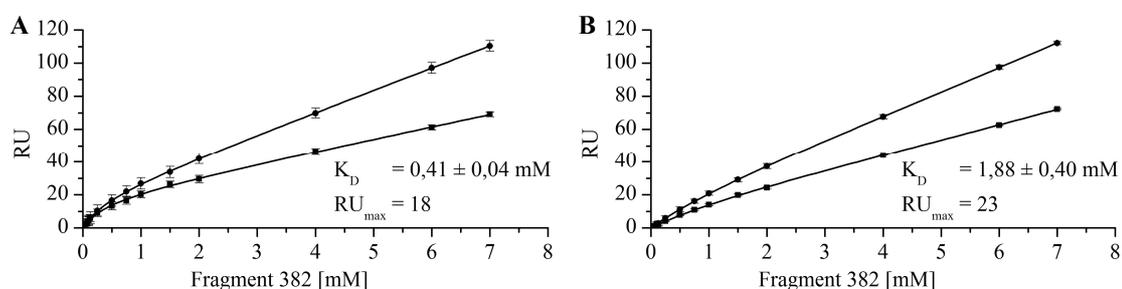


Abbildung 3.8 | Bindungsisotherme der Bindung von Fragment 382 an immobilisierte GTB mit Mn^{2+} als bivalentes Kation in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von UDP. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM MnCl_2 in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von 1 mM UDP mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 3 und 4) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden auf zwei unterschiedlichen Sensorchips in dreifacher Bestimmung mit Konzentrationen von Fragment **382** von 25 μM bis 7 mM durchgeführt. In den jeweiligen Graphen sind die Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximale Antwort RU_{max} der spezifischen Bindungsstelle eines Modells mit zwei Bindungsstellen angegeben. Die Ergebnisse wurden bereits in (Jorgensen, Grimm et al. 2012) veröffentlicht.

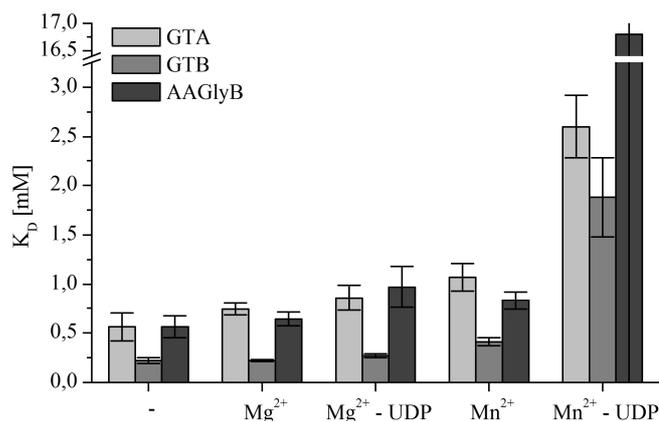


Abbildung 3.9 | Dissoziationskonstanten von Fragment 382 gegenüber GTA, GTB und AAGlyB. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂ bzw. 5 mM MnCl₂ in Ab- und Anwesenheit von 1 mM UDP mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 3 und 4) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden auf zwei unterschiedlichen Sensorchips in dreifacher Bestimmung mit Konzentrationen von Fragment 382 von 25 µM bis 7 mM durchgeführt. Die erhaltenen Bindungsisothermen wurden mit einem Bindungsmodell für zwei Bindungsstellen gefittet. Angegeben ist hier jeweils nur die spezifische Bindungskonstante. Die Ergebnisse wurden bereits in (Jorgensen, Grimm et al. 2012) veröffentlicht.

3.2.2 Bestimmung der Bindungsepitope mit STD-NMR-Spektroskopie

Um einen besseren Einblick in die Bindung des Fragmentes 382 an GTB zu bekommen, wurden die Bindungsepitope mittels STD-NMR-Spektroskopie erstellt. Zusätzlich wurde untersucht, wie sich dieses bei Bindung von UDP verändert. Auch die Veränderung des Bindungsepitopes von UDP durch Fragment 382 wurde untersucht.

Präparation der GTB

Die verwendete GTB wurde aus vorangegangener Masterarbeit (Grimm 2010) weiterverwendet und wie unter 2.1 angegeben jeweils in 1 l TB-Medium in *E. coli* synthetisiert und mittels Säulenchromatographie und einer einfachen Peristaltikpumpe gereinigt. Die Qualität der Präparation wurde mit einer SDS-PAGE (siehe 2.3.1) und einem Aktivitätstest (siehe 2.3.4) überprüft. Der Proteingehalt wurde sowohl mit dem NanoDrop Spektralphotometer (siehe 2.3.2) als auch mit dem Bradford-Test mit BGG als Standard (siehe 2.3.3) bestimmt. Verunreinigungen mit Nukleinsäuren bzw. Nukleotiden, hier vorwiegend UDP aus dem letzten Reinigungsschritt, können ebenfalls mit dem NanoDrop Spektralphotometer detektiert werden. Für die STD-NMR Experimente wurde der Puffer der Proteinproben mit STD-NMR-Puffer (siehe Tabelle 2.13) ausgetauscht und erneut die Proteinmenge, Aktivität sowie Verunreinigungen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 und Abbildung 3.10 dargestellt. Die Ausbeute lag bei 56 mg pro Liter Kultur. Die Proteinprobe zeigt nach Austausch des Puffers eine Aktivität von 8 U/mg und einen A₂₆₀/A₂₈₀ Quotienten von 0,57. Dies und die SDS-PAGE lassen auf eine erfolgreiche Herstellung einer aktiven Proteinprobe schließen.

Tabelle 3.6 | Qualitätskontrolle von GTB (7) für STD-NMR Experimente. Verwendete Proteinpräparation für STD-NMR-Messung mit Fragment **382** und UDP mit GTB. Angegeben sind die Ausbeuten pro Liter Kultur, die spezifischen Aktivitäten und die Quotienten A_{260}/A_{280} nach Austausch des Puffers.

	GTB (7)
Ausbeute	56 mg/l
Spezifische Aktivität	8 U/mg
A_{260}/A_{280}	0,57

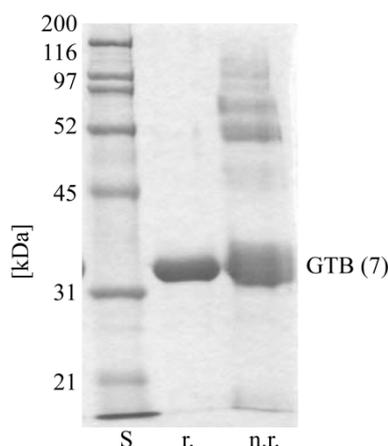


Abbildung 3.10 | SDS-Page von GTB (7). Aufgetragen ist ein Protein-Standard (S) sowie eine denaturierte Proteinprobe in reduzierendem (r.) und nicht reduzierendem (n. r.) Probenpuffer auf einem 12 %igen SDS-Gel. Die Proteinbande der monomeren GTB mit einem Molekulargewicht von 34,6 kDa liegt etwas oberhalb der 31 kDa Bande. Unter nicht reduzierenden Bedingungen sind weitere Banden bei vielfachen des monomeren Molekulargewichts zu erkennen, hierbei handelt es sich um Oligomerisierung der Proteine über intermolekulare Disulfidbrücken. Die Bezeichnung der Probe bezieht sich auf Tabelle 3.6).

STD-NMR Experimente

Für die Messungen der Bindungsepitope mussten zuerst die Protonen von UDP und von Fragment **382** zugeordnet werden. Für das Fragment **382** reichten ^1H -NMR-Spektren aus. Für die Zuordnung der Signale von UDP wurden bereits vorhandene 2D-Spektren verwendet. Die ^1H -chemischen Verschiebungen beider Verbindungen sind im Anhang (6.5.2) aufgeführt. Für die Messung der Bindungsepitope wurden drei NMR-Proben angesetzt. Jede NMR-Probe enthielt 20 μM GTB in STD-NMR-Puffer (siehe Tabelle 2.13), 300 μM TSP- d_4 sowie 1 mM von Fragment **382**, 1 mM UDP oder 1 mM von Fragment **382** und gleichzeitig 1 mM UDP. Gemessen wurden die Proben in einem 3 mm NMR-Röhrchen bei 298 K und 500 MHz. Für die Bestimmung der Bindungsepitope wurden STD-NMR-Spektren bei verschiedenen Sättigungszeiten aufgenommen. Daraus wurde eine STD-Aufbaukurve für jedes Protonensignal bestimmt. Anhand der Steigung im Punkt $t = 0$ konnte der Anteil des Sättigungstransfers auf die Protonen des Liganden bestimmt und ein Bindungsepitop erstellt werden. Das Signal mit dem stärksten Sättigungseffekt wurde auf 100 % gesetzt. Die Sättigung aller weiteren wurde relativ zu diesem Signal bestimmt. Zur besseren Übersicht wurden die relativen Sättigungsanteile in drei Gruppen mit einem starken, mittleren und schwachen STD-Effekt eingeteilt.

Zuerst wurde das Bindungsepitop von UDP ohne Einwirkung von Fragment **382** erstellt. In Abbildung 3.11 sind ausgewählte STD-NMR-Spektren bei Sättigungszeiten von 0,5 s, 1 s und 2 s im Vergleich zu einem Off-Resonanz Spektrum von UDP gezeigt. Die STD-Aufbaukurven und daraus resultierenden Bindungsepitope sind in Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15 zusammen mit den Messungen von Fragment **382** abgebildet. Die Spektren der STD-NMR-Messungen von Fragment **382** und von Fragment **382** in Anwesenheit von UDP sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

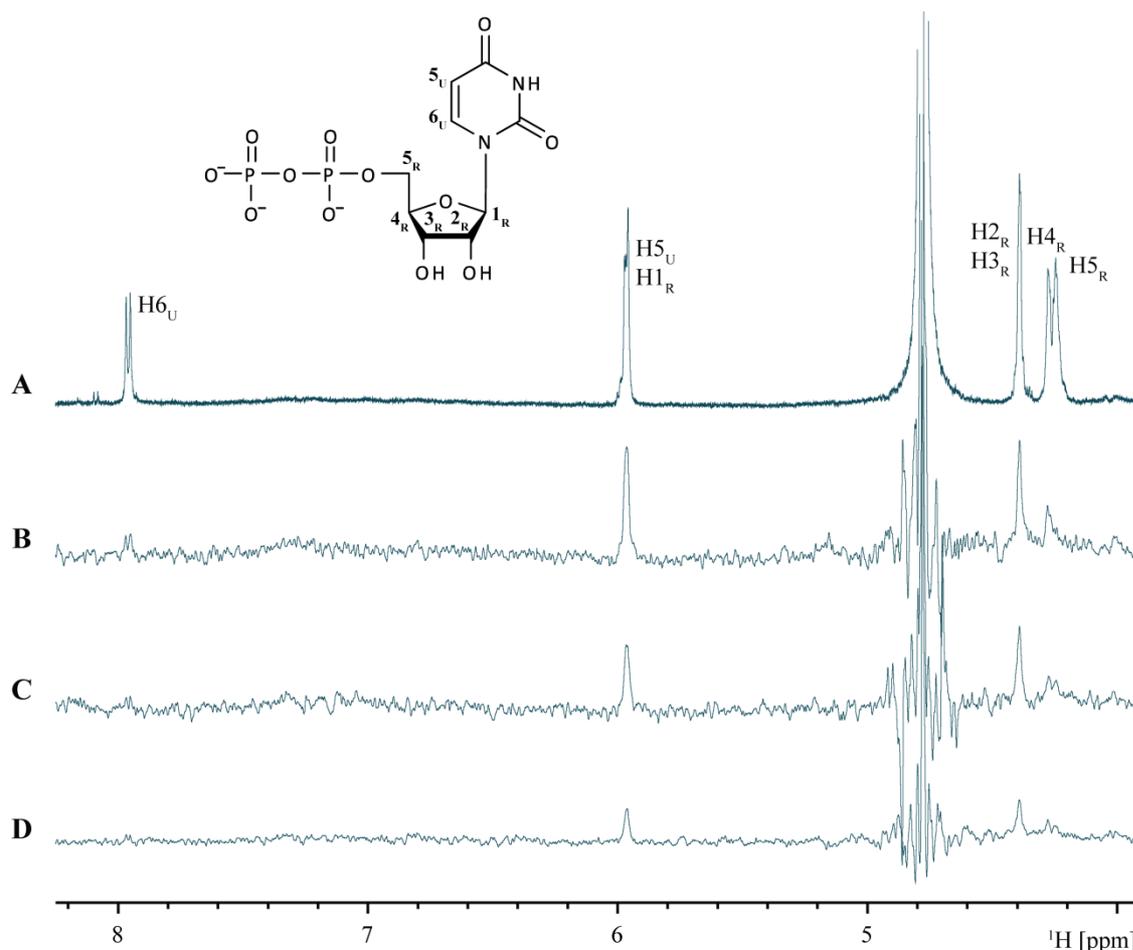


Abbildung 3.11 | STD-NMR-Spektren von UDP in Anwesenheit von GTB. Gemessen wurden 20 μM GTB in 50 mM Bis-Tris- d_{19} (pH 6,7 bei 25 $^{\circ}\text{C}$), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM 2-Mercaptoethanol- d_6 und 300 μM TSP- d_4 als interne Referenz und 1 mM UDP bei 298 K. Oben ist das Off-Resonanz-Spektrum (A) und darunter STD-NMR-Spektren mit Sättigungszeiten von 2 s (B), 1 s (C) und 0,5 s (D) abgebildet. Die Spektren mit den Sättigungszeiten von 2 s und 1 s wurden mit 256 Scans und das mit 0,5 s mit 1 k Scans aufgenommen. Dargestellt ist der Bereich in dem die UDP-Signale auftreten. Die Ergebnisse wurden bereits in (Jorgensen, Grimm et al. 2012) veröffentlicht.

An den Spektren sieht man, dass alle Protonen gesättigt wurden. Für das Proton H6_U von UDP war es nicht möglich eine Aufbaukurve zu bestimmen, da das Signal im Rauschen der Spektren lag. Aus den Aufbaukurven ist zu erkennen, dass die Protonen H5_U und H1_R von UDP am meisten gesättigt wurden. Dies stimmt mit vorangegangenen Messungen überein (Blume, Angulo

et al. 2006). Die Bindungsepitope wurden aber anhand der Steigung in Punkt $t = 0$ bestimmt, weshalb die Protonen H_{2R} und H_{3R} von UDP den größten Anteil an Sättigung erhalten. Bei Fragment **382** erhielten die Protonen des Phenylringes die größte Sättigung, wohingegen die Protonen des Piperazinringes eine geringere Sättigung zeigten. Im Vergleich der Bindungsepitope ist kein großer Unterschied zu sehen, ob die Verbindungen alleine vorlagen oder jeweils in Anwesenheit der anderen. Jedoch kann in den Aufbaukurven deutlich erkannt werden, dass sowohl UDP auf die Sättigung von Fragment **382**, als auch Fragment **382** auf die Sättigung von UDP einen großen Einfluss hat.

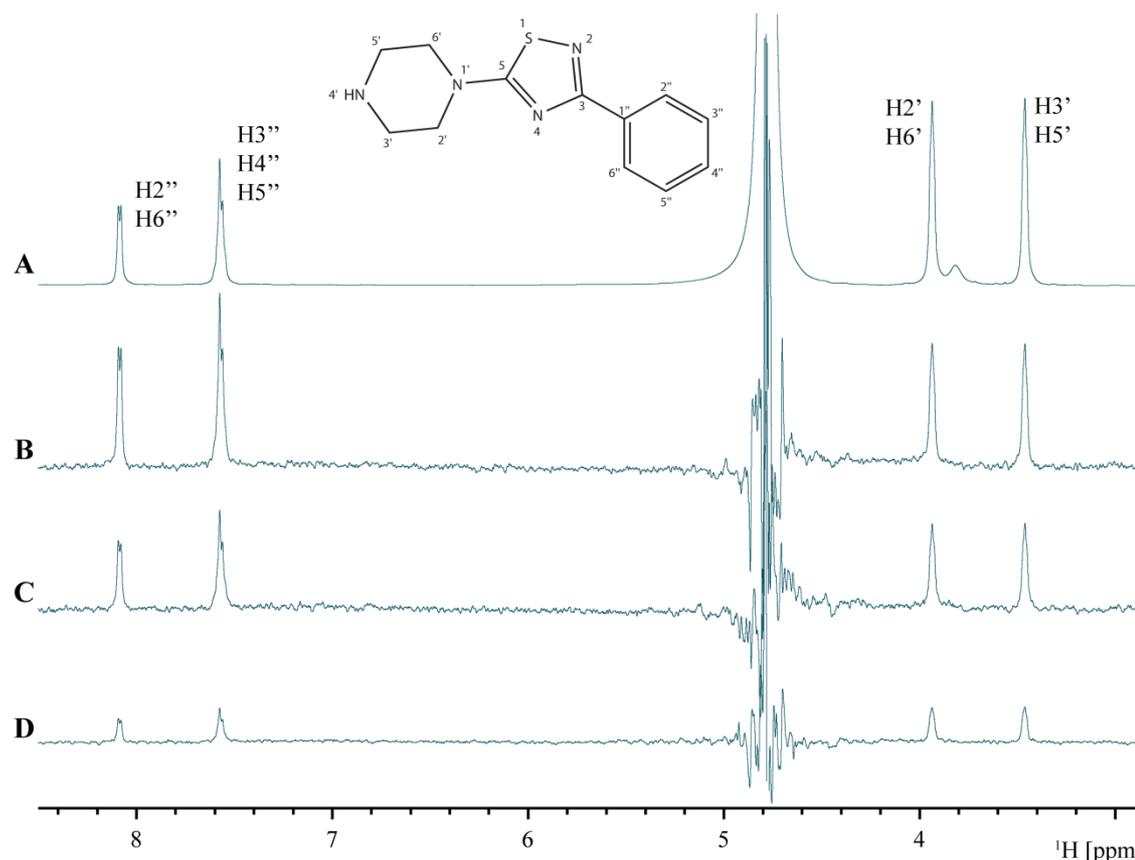


Abbildung 3.12 | STD-NMR-Spektren von Fragment 382 in Anwesenheit von GTB. Gemessen wurden 20 μM GTB in 50 mM Bis-Tris- d_{19} (pH 6,7 bei 25 $^{\circ}\text{C}$), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM 2-Mercaptoethanol- d_6 und 300 μM TSP- d_4 als interne Referenz und 1 mM von Fragment **382** bei 298 K. Oben ist das Off-Resonanz-Spektrum (A) und darunter STD-NMR-Spektren mit Sättigungszeiten von 2 s (B), 1 s (C) und 0,35 s (D) abgebildet. Die Spektren mit den Sättigungszeiten von 2 s und 1 s wurden mit 256 Scans und das mit 0,35 s mit 1 k Scans aufgenommen. Dargestellt ist der Bereich in dem die NMR-Signale von Fragment **382** auftreten. Die Ergebnisse wurden bereits in (Jorgensen, Grimm et al. 2012) veröffentlicht.

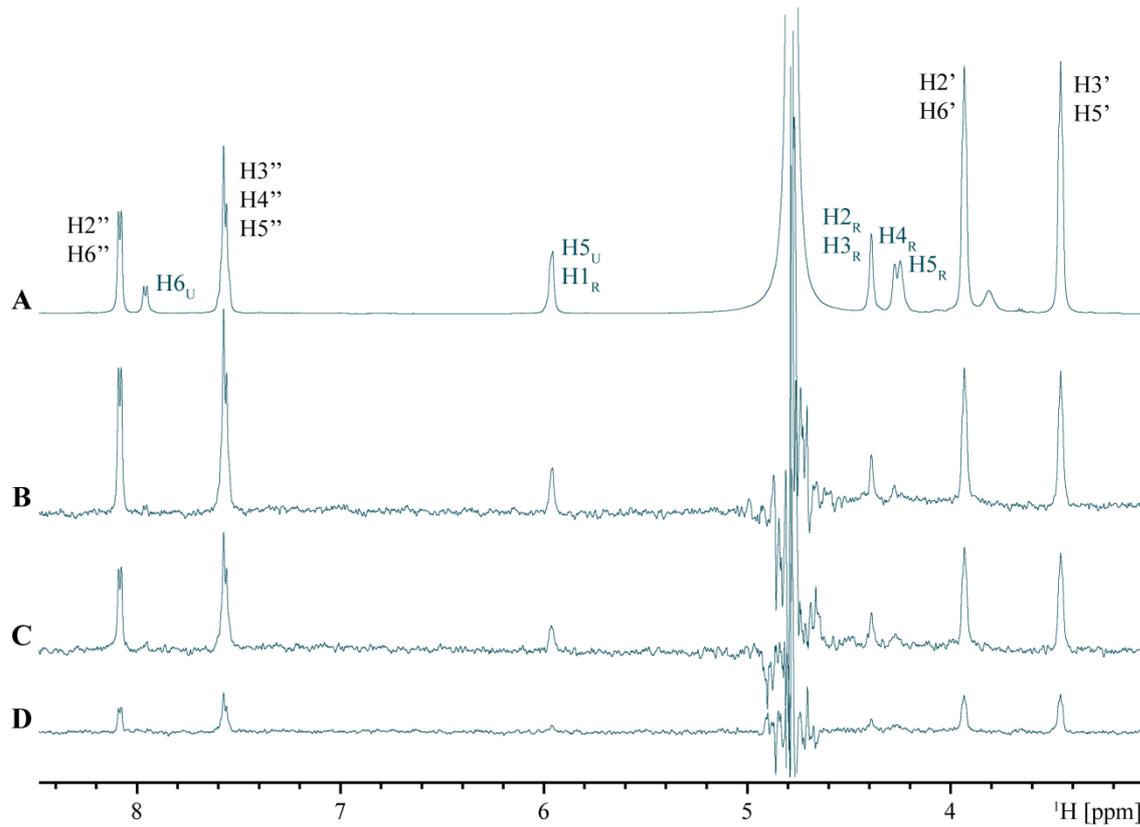


Abbildung 3.13 | STD-NMR-Spektren von Fragment 382 und UDP in Anwesenheit von GTB. Gemessen wurden 20 μM GTB in 50 mM Bis-Tris- d_{19} (pH 6,7 bei 25 $^{\circ}\text{C}$), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM 2-Mercaptoethanol- d_6 und 300 μM TSP- d_4 als interne Referenz und 1 mM von Fragment **382** und 1 mM UDP bei 298 K. Oben ist das Off-Resonanz-Spektrum (A) und darunter STD-NMR-Spektren mit Sättigungszeiten von 2 s (B), 1 s (C) und 0,35 s (D) abgebildet. Die Spektren mit den Sättigungszeiten von 2 s und 1 s wurden mit 256 Scans und das mit 0,35 s mit 1 k Scans aufgenommen. Dargestellt ist der Bereich in dem die NMR-Signale von Fragment **382** (schwarz) und UDP (blau) auftreten. Die Ergebnisse wurden bereits in (Jorgensen, Grimm et al. 2012) veröffentlicht.

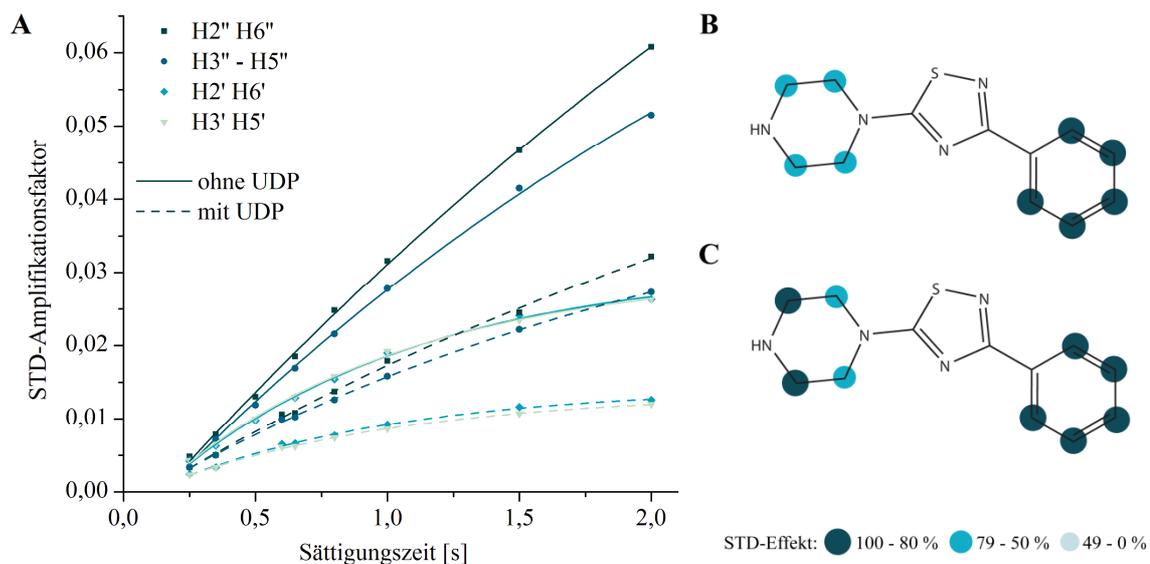


Abbildung 3.14 | STD-Aufbaukurven und Bindungsepitope von Fragment 382. Gezeigt sind die STD-Aufbaukurven (A) der Protonensignale sowie die Bindungsepitope von Fragment **382** in Abwesenheit (B) und in Anwesenheit (C) von UDP. Die NMR-Proben enthielten je 1 mM Fragment **382**, sowie 20 μ M GTB in STD-NMR-Puffer ohne und mit 1 mM UDP. Die Kreise stellen den prozentualen STD-Effekt durch Berechnung der Anfangssteigung der STD-Aufbaukurven dar. Die Ergebnisse wurden bereits in (Jorgensen, Grimm et al. 2012) veröffentlicht.

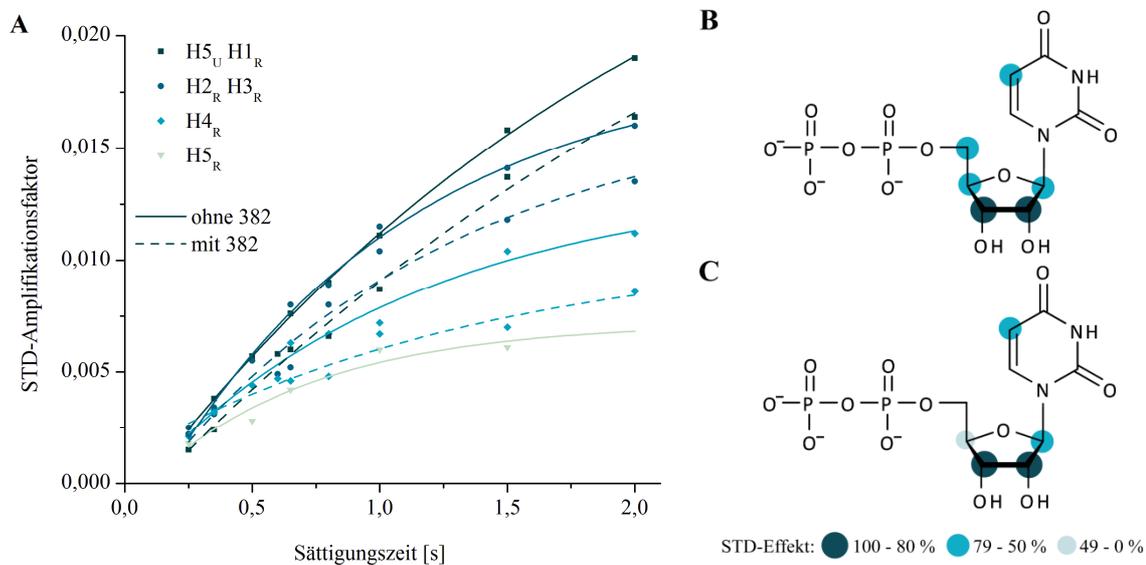


Abbildung 3.15 | STD-Aufbaukurven und Bindungsepitope von UDP. Gezeigt sind die STD-Aufbaukurven (A) der Protonensignale sowie die Bindungsepitope von UDP in Abwesenheit (B) und in Anwesenheit (C) von Fragment **382**. Die NMR-Proben enthielten je 1 mM UDP, sowie 20 μ M GTB in STD-NMR-Puffer ohne und mit 1 mM von Fragment **382**. Die Kreise stellen den prozentualen STD-Effekt durch Berechnung der Anfangssteigung der STD-Aufbaukurven dar. Die Ergebnisse wurden bereits in (Jorgensen, Grimm et al. 2012) veröffentlicht.

3.3 Struktur- und Dynamikuntersuchungen von GTB mittels NMR-Spektroskopie

Um einen besseren Einblick in die Bewegungen der GTB auf molekularer Ebene zu bekommen, wurden NMR-spektroskopische Untersuchungen gemacht. Zum einen wurde an die Arbeiten von N. Sindhuwinata (Sindhuwinata 2012) angeknüpft und Zuordnungsspektren aufgenommen. Zum anderen wurden Bewegungen bei Substratbindung im Rückgrat genauer untersucht. Da es sich bei der GTB um ein großes Protein handelt und traditionelle Protein-NMR nicht sehr gut geeignet ist, wurde das selektive markieren von Methylgruppen getestet, erste Methyl-TROSY-NMR-Spektren aufgenommen und diese für Bindungs- sowie Dynamikuntersuchungen angewendet.

3.3.1 Präparation isotoopenmarkierter GTB

Für die Struktur- und Dynamikuntersuchungen von GTB wurden verschiedene Proteinpräparationen verwendet. Es wurden zwei $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB Proben hergestellt, um die bisher verwendete Methode der Proteinbiosynthese nach Marley et al. (Marley, Lu et al. 2001) und die nach Tugarinov et al. (Tugarinov, Kanelis et al. 2006) zu vergleichen. Mit diesen beiden Proben wurde zusätzlich der Amid-Austausch getestet und die Bindung von UDP anhand der Rückgratsignale genauer untersucht. Alle weiteren Proteinpräparationen wurden nach der Methode von Tugarinov et al. (Tugarinov, Kanelis et al. 2006) präpariert. Für die Aufnahme von Tripelresonanzexperimenten wurde eine $u\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierte GTB hergestellt. Desweiteren wurden Methyl-TROSY-Experimente durchgeführt. Mit Hilfe der Methylgruppen wurde die Bindung der natürlichen Substrate, die Dynamik sowie die Bindung von Lanthanoiden untersucht. Hierfür wurden drei $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierte GTB Proben hergestellt. GTB besitzt insgesamt zehn Isoleucine, einschließlich des Isoleucins aus der durch Klonierung hinzugefügten M-A-I-G-E-F-M Sequenz. Von diesen zehn Isoleucinen befinden sich zwei im direkten Kontakt mit Donor- bzw. Akzeptorsubstrat. Das Isoleucin an Position 123 ist im Kontakt mit dem Donorsubstrat und das Isoleucin an Position 192 befindet sich am Rand des internen Loops. Um die Signale dieser beiden Methylgruppen zuordnen zu können, wurden zwei GTB-Proben hergestellt, bei denen das Isoleucin 123 bzw. das Isoleucin 192 jeweils gegen Valine ausgetauscht wurden. Dadurch fehlen diese Signale in den Methyl-TROSY-Spektren, und es kann eine eindeutige Zuordnung erfolgen.

Die Synthese der isotoopenmarkierten GTB fand in Minimalmedium statt, dem neben Salzen, Vitaminen und Antibiotika, ^{15}N -Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle sowie Glucose als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurden. Für alle Ansätze wurde $u\text{-}^2\text{H}$ -Glucose verwendet, bei der Herstellung der dreifach markierten GTB wurde jedoch $u\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C}$ -Glucose verwendet. Zusätzlich wurden 20 % eines kommerziell erhältlichen $^2\text{H},^{15}\text{N}$ - bzw. $^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierten reichhaltigen Mediums zugesetzt. Dies besteht hauptsächlich aus Aminosäuren und sollte die Proteinausbeute steigern.

Die verwendeten GTB-Präparationen wurden wie unter 2.1 angegeben in *E. coli* synthetisiert und mittels Säulenchromatographie in einem ÄKTA-System gereinigt. Die Qualität der

Präparationen wurde mit SDS-PAGE (siehe 2.3.1) und Aktivitätstests (siehe 2.3.4) überprüft. Der Proteingehalt wurde sowohl mit dem NanoDrop Spektralphotometer (siehe 2.3.2) als auch mit dem Bradford-Test mit BGG als Standard (siehe 2.3.3) bestimmt. Anschließend wurden die GTB Präparationen konzentriert und gegen den jeweiligen Puffer ausgetauscht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 und Abbildung 3.16 dargestellt.

Die Ausbeuten der Wildtyp-GTB Präparationen lagen zwischen 18 und 35 mg pro Liter Kultur. Die Ausbeute der u-²H,¹⁵N-markierten GTB (1) (siehe Tabelle 3.7), hergestellt nach dem Protokoll von Marley et al. (Marley, Lu et al. 2001), zeigte eine Ausbeute von 34 mg pro Liter Kultur, hingegen die u-²H,¹⁵N-markierten GTB (2), hergestellt nach Tugarinov et al. (Tugarinov, Kanelis et al. 2006), nur eine Ausbeute von 18 mg pro Liter Kultur. Jedoch zeigten alle weitem nach Tugarinov et al. (Tugarinov, Kanelis et al. 2006) hergestellten Proteinpräparationen eine vergleichbare Ausbeute wie die der u-²H,¹⁵N-markierten GTB (1). Die Ausbeuten beider Herstellungsweisen sind also vergleichbar. Auch die spezifischen Aktivitäten zwischen 6 und 12 U/mg weisen auf aktives Protein hin. Die Aktivität, die A₂₆₀/A₂₈₀ Quotienten von unter 0,6 und die SDS-PAGE lassen auf eine erfolgreiche Herstellung aktiver und reiner Proteinprobe schließen.

Tabelle 3.7 | Qualitätskontrolle von isotonenmarkierten GTB-Präparationen. Verwendete Proteinpräparationen für NMR-Messungen der Blutgruppen Glycosyltransferasen. Angegeben sind die Ausbeuten pro angesetztem Volumen Kultur, falls bestimmt die spezifischen Aktivitäten und die Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ nach Austausch des Puffers. u-²H,¹⁵N-GTB (1) wurde nach dem Protokoll von Marley et al. (Marley, Lu et al. 2001) hergestellt, alle weiteren nach Tugarinov et al. (Tugarinov, Kanelis et al. 2006).

	u- ² H, ¹⁵ N (1)	u- ² H, ¹⁵ N (2)	u- ² H, ¹³ C, ¹⁵ N	u- ² H, ¹⁵ N, {Ileδ1- ¹³ CH ₃ } (1)	u- ² H, ¹⁵ N, {Ileδ1- ¹³ CH ₃ } (2)	u- ² H, ¹⁵ N, {Ileδ1- ¹³ CH ₃ } (3)	u- ² H, ¹⁵ N, {Ileδ1- ¹³ CH ₃ } I192V
Ausbeute	17 mg/0,5 l	9 mg/0,5 l	24 mg/l	2,8 mg/0,1 l	7 mg/0,2 l	7 mg/0,2 l	0,5 mg/0,1 l
Spezifische Aktivität	10 U/mg	12 U/mg	- ^a	6 U/mg	10 U/mg	8 U/mg	- ^b
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	0,58	0,55	0,54	0,6	0,58	0,59	-

^a spezifische Aktivität konnte nicht bestimmt werden, da die gesamte Probe für die Messungen eingesetzt wurde;

^b spezifische Aktivität konnte nicht bestimmt werden, da zu wenig Probe vorhanden war.

Da alle diese Proben isotonenmarkiert sind, ist es möglich, diese zusätzlich mit NMR-Spektren zu charakterisieren. In Abbildung 3.17 sind die eindimensionalen Protonenspektren der u-²H,¹⁵N-markierten GTB (1) und (2) sowie der u-²H,¹³C,¹⁵N-markierten GTB dargestellt. Die Amidprotonen des Proteinrückgrats sind zwischen 10 und 7 ppm zu erkennen und überlagern mit den Signalen der Amid- und aromatischen Protonen der meisten Aminosäureseitenketten im Bereich zwischen 8 und 6 ppm. Die Spektren sind anhand der TSP-Signale skaliert und unterscheiden sich in diesem Bereich nicht. Die etwas geringeren Intensitäten in diesem Bereich im Spektrum der u-²H,¹⁵N-markierten GTB (2) kommen dadurch zustande, dass diese Probe etwa 60 % D₂O enthält und daher nicht alle Amidprotonen ausgetauscht wurden. Durch die gleichmäßige Verteilung der Signale in diesem Bereich kann zusätzlich davon ausgegangen werden, dass es sich um gefaltete Proteinproben handelt. Genauer kann dies mit einem ¹H,¹⁵N-

HSQC-Spektrum beurteilt werden. Beispiele sind in diesem Abschnitt nicht extra aufgeführt, sondern werden in jedem Ergebnisteil einzeln betrachtet (siehe 3.3.2, 3.3.3 und 3.3.4).

Interessant ist bei diesen Proben der Bereich zwischen 4 und -0,5 ppm. Hier erscheinen die Signale der aliphatischen Protonen der Seitenketten, die nicht mit dem Lösungsmittel austauschen können. Da alle hier verwendeten Proben deuteriert sind, kann durch diesen Bereich die Qualität der Deuterierung beurteilt werden. Ein komplett deuteriertes Protein sollte in diesem Bereich keine Signale zeigen. Es sind bei allen drei Proteinpräparationen Signale zu beobachten. Jedoch sind die Intensitäten im Spektrum der $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -markierten GTB (1) größer als in den anderen beiden. Diese Probe wurde nach dem Protokoll von Marley et al. (Marley, Lu et al. 2001) hergestellt. Damit kann gesagt werden, dass sich die Ausbeute nach dem Protokoll von Tugarinov et al. (Tugarinov, Kanelis et al. 2006) nicht erhöht, jedoch der Grad der Deuterierung deutlich verbessert ist. Dies ist ein essentieller Punkt bei der Aufnahme von NMR-Spektren mit der GTB, insbesondere für die Aufnahme von Methyl-TROSY-Spektren. In den Spektren sind noch Spuren von nicht markierten 2-Mercaptoethanol, Glycerin und Ethanol vorhanden und im Bereich zwischen 4 und 1 ppm zu sehen.

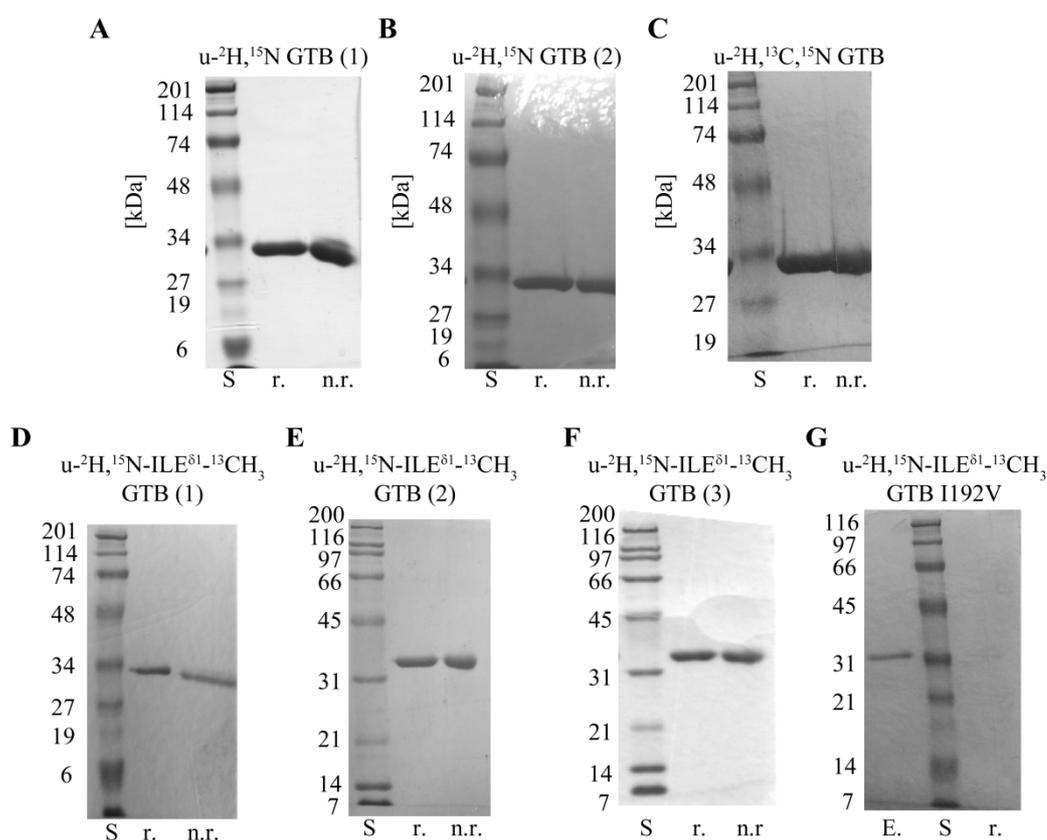


Abbildung 3.16 | SDS-PAGE von isotopenmarkierten GTB-Präparationen. Aufgetragen sind jeweils ein Protein-Standard (S) sowie je eine denaturierte Proteinprobe in reduzierendem (r.) und nicht reduzierendem (n. r.) Probenpuffer auf einem 12 %igen SDS-Gel. Die Proteinbande der monomeren GTB mit einem Molekulargewicht von 34,6 kDa liegt etwas unterhalb der 34 kDa bzw. etwas oberhalb der 31 kDa Bande. Unter nicht reduzierenden Bedingungen sind hier keine weitere Banden bei vielfachen des monomeren Molekulargewichts zu erkennen. In (G) ist zusätzlich die Elution der Affinitätschromatographie gezeigt, da nach Dialyse kaum noch Protein in der Bande (r.) zu erkennen ist. Die Nummerierung bezieht sich auf die GTB-Proben in Tabelle 3.7.

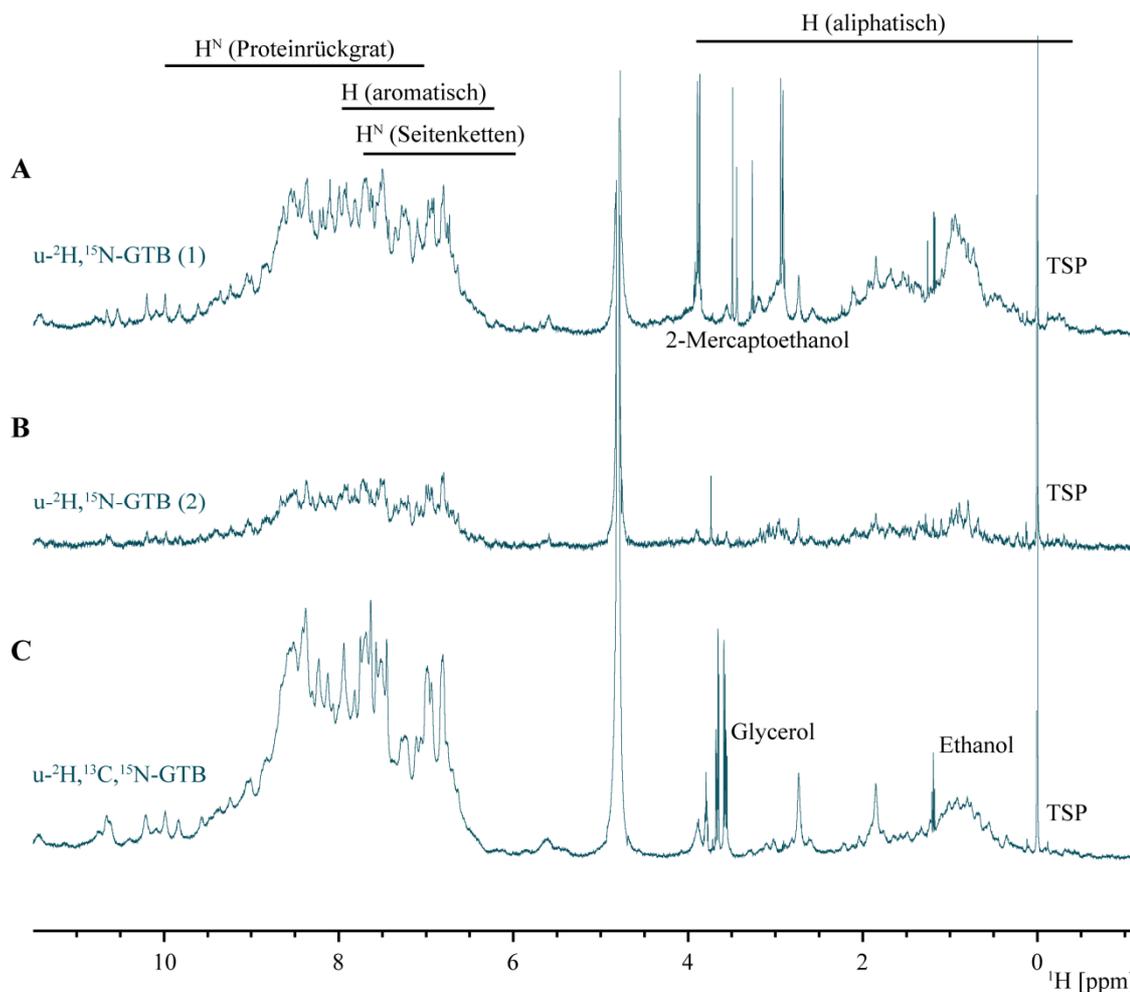


Abbildung 3.17 | 1D- ^1H -Spektren von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -markierter GTB. Alle Spektren wurden mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer mit Wasserunterdrückung bei 298 K aufgenommen und zeigen die ^1H -NMR-Spektren von (A) 500 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -markierter GTB (1), (B) 310 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -markierter GTB (2) und (C) 1,4 mM $u\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierter GTB in NMR-Phosphatpuffer (H_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz und 10 % D_2O . In NMR-Probe (B) befanden sich 60 % D_2O was zu einer Verminderung der Signalintensität im Bereich der H^{N} (Proteinrückgrat) führt. Eingezeichnet sind zusätzlich die gewöhnlichen Verschiebungen der unterschiedlichen Protonen eines Proteins. Die Bezeichnungen der Proteinproben beziehen sich auf Tabelle 3.7.

Für die selektive Markierung der δ^1 -Methylgruppen der Isoleucine wurde der Vorläufer 2-Keto-3- d_2 -4- ^{13}C -butyrat verwendet. Dieser wurde aus 2-Keto-4- ^{13}C -butyrat durch Austausch der ^1H an Position 3 zu ^2H hergestellt. Wie in Abbildung 3.18 zu sehen ist, verlief die Deuterierung quantitativ. Es sind die Protonenspektren vor und nach der Deuterierung gezeigt.

In Abbildung 3.19 sind die eindimensionalen Protonenspektren der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta^1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB (1) bis (3) dargestellt (siehe Tabelle 3.7). Da diese Spektren in deuteriertem Puffer gemessen wurden, sind keine Amidprotonen des Proteinrückgrats sichtbar. Schwach zu erkennen sind die Signale der Amid- und aromatischen Protonen der Aminosäureseitenketten im Bereich zwischen 8 und 6 ppm. Im Bereich zwischen 1,5 und -0,5 ppm erscheinen hier die selektiv markierten Signale der δ^1 -Methylgruppen der Isoleucine. Diese sind in allen Spektren deutlich sichtbar. Auch kann gesagt werden, dass die Deuterierung in diesen Proben deutlich besser ist, als in den vorher diskutierten Proben. Auch in diesen Spektren sind Spuren von

Glycerin, Ethanol und unmarkiertem Bis-Tris vorhanden und im Bereich zwischen 4 und 1 ppm zu sehen.

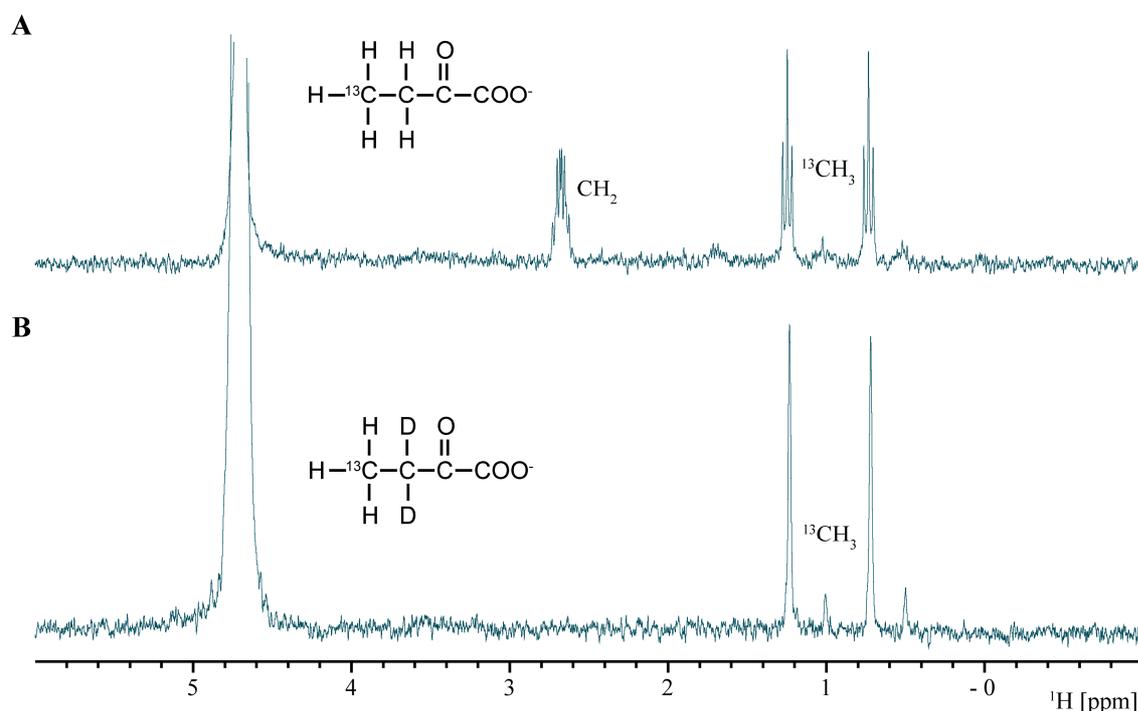


Abbildung 3.18 | 1D- ^1H -NMR-Spektren von (A) 2-Keto-4- ^{13}C -butyrat und (B) 2-Keto-3- d_2 -4- ^{13}C -butyrat. Die Spektren wurden mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer in D_2O aufgenommen. 2-Keto-3- d_2 -4- ^{13}C -butyrat wurde für die selektive Markierung der $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucine verwendet.

Ob die selektive Markierung der $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucine erfolgreich war, konnte mit einem Methyl-TROSY-Experiment überprüft werden. In Abbildung 3.20 ist ein Methyl-TROSY-NMR-Spektrum gezeigt. Erwartet wurden zehn Signale, für jede $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucine ein Signal. In dem Spektrum sind zehn intensive Signale sowie ein schwaches Signal zu erkennen. Insgesamt also elf Signale, eins mehr als erwartet.

Für die Signalzuordnung der beiden Methylgruppen der Isoleucine 123 und 192 wurden Mutanten der GTB hergestellt. Die Synthese und Reinigung der beiden $\text{u-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB-Proben I123V und I192V fanden analog zu den Wildtyp-GTB-Proben statt. Bei der $\text{u-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB I123V war am Ende der Reinigung kein Protein vorhanden. Es wurde vermutet, dass das Isoleucin 123 wichtig für die Bindung von UDP ist und die Mutante daher nicht an die Affinitätschromatographiesäule bindet. In den SDS-PAGE konnte kein Protein beobachtet werden, dies deutet zusätzlich auch eine geringe Synthese des Proteins hin. Die Mutante wurde erneut synthetisiert und gereinigt, jedoch wurde diesmal vor der Affinitätschromatographie die Probe konzentriert und ein Methyl-TROSY-Spektrum aufgenommen. Da die Mutante überexprimiert wurde und die Methylgruppen selektiv markiert waren, könnten bereits in dem nicht vollständig gereinigten Produkt die Signale der $\text{u-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB I123V sichtbar sein. In Abbildung 3.21 ist das erhaltene

Methyl-TROSY-Spektrum zu sehen. Es ist deutlich sichtbar, dass es hier nicht möglich ist, die selektiv markierten Signale von anderen Proteinsignalen zu unterscheiden

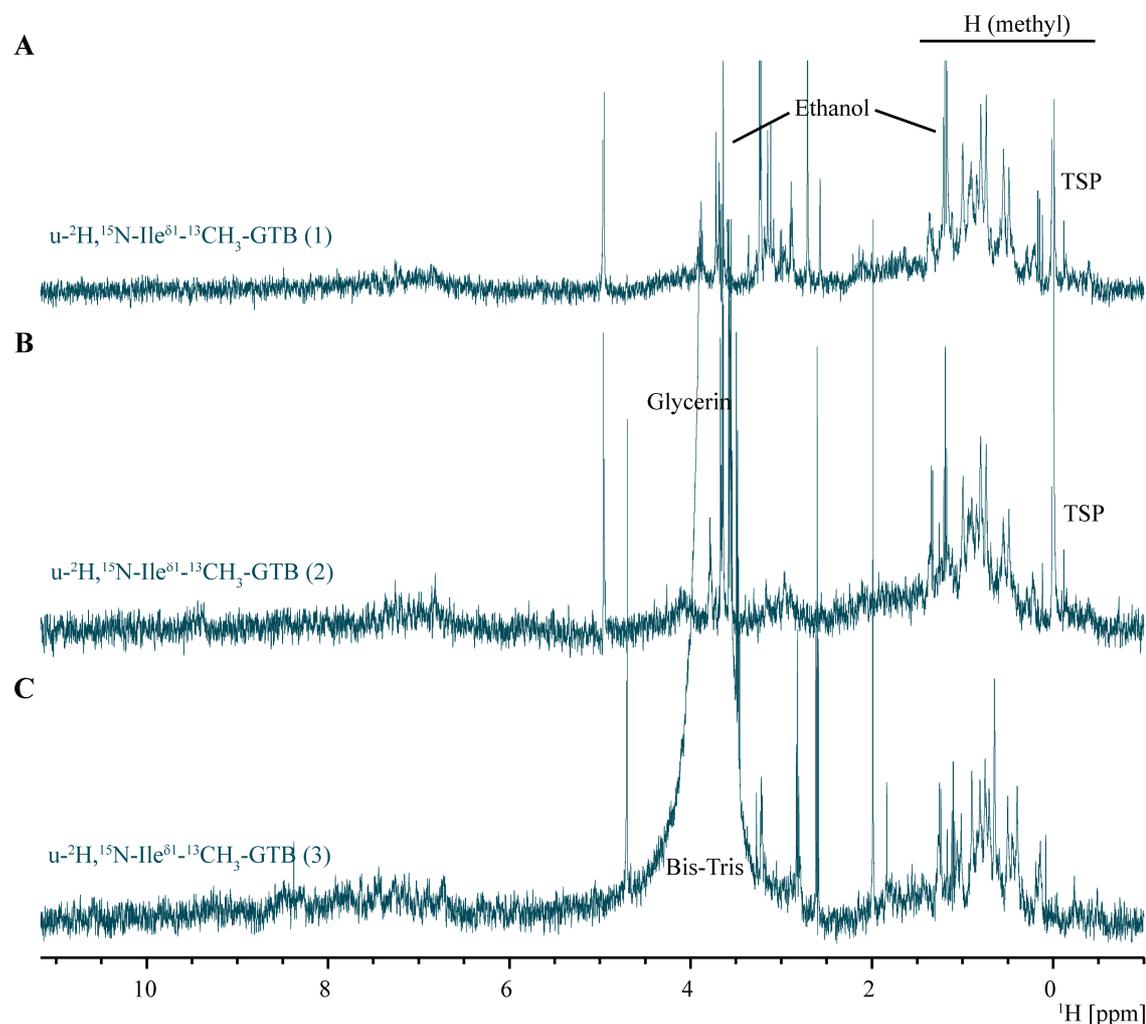


Abbildung 3.19 | 1D- ^1H -Spektren von $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}\text{-}\{\text{Ile}\delta^1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB. Alle Spektren wurden mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer mit Wasserunterdrückung aufgenommen und zeigen die ^1H -NMR-Spektren von (A) $190\ \mu\text{M}$ $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}\text{-}\{\text{Ile}\delta^1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB (1), (B) $194\ \mu\text{M}$ $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}\text{-}\{\text{Ile}\delta^1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB (2) in NMR-Phosphatpuffer (D_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit $100\ \mu\text{M}$ TSP- d_4 als interne Referenz gemessen bei 283 K und (C) $188\ \mu\text{M}$ $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}\text{-}\{\text{Ile}\delta^1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB in Bis-Tris-Puffer (D_2O) (siehe Tabelle 2.16) gemessen bei 298 K. Im Bereich von $-0,5$ bis $1,5$ ppm sind die Signale der selektiv markierten δ^1 -Methylgruppen der Isoleucine zu sehen. Die Bezeichnungen der Proteinproben beziehen sich auf Tabelle 3.7.

Im Gegensatz dazu war es möglich, die $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}\text{-}\{\text{Ile}\delta^1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierte GTB I192V zu synthetisieren und zu reinigen (siehe SDS-PAGE Abbildung 3.16). Die Ausbeute mit 5 mg pro Liter Kultur lag deutlich unter der anderen. Der Grund dafür wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht, da mit dieser Probe nur eine Zuordnung stattfinden sollte und dafür die Menge ausreichte. In Abbildung 3.21 ist das Methyl-TROSY-Spektrum der $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}\text{-}\{\text{Ile}\delta^1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierte GTB I192V gezeigt. Es fehlt ein intensives Signal, bei dem es sich um das Isoleucin 192 handelt. Zusätzlich ist das schwache Signal ebenfalls nicht sichtbar. Ob es sich hier um das

Isoleucin 192 handelt oder dieses auf Grund der Mutation und daraus folgenden strukturellen Änderungen verschwindet, kann nicht eindeutig geklärt werden. Es könnte sich hierbei auch um einen zweiten Zustand bzw. eine inaktive Form des internen Loops handeln. Die Herkunft dieses Signales wird in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass isotopenmarkierte GTB sowohl für Rückgratexperimente als auch für Methyl-TROSY-Experimente in ausreichender Menge und als aktives Protein hergestellt werden konnte. Durch Anwendung des Protokolls nach Tugarinov et al. (Tugarinov, Kanelis et al. 2006) konnte der Deuterierungsgrad nochmal verbessert werden. Die Zuordnung des Signales von Isoleucin 192 war erfolgreich, die des Signales von Isoleucin 123 hingegen nicht.

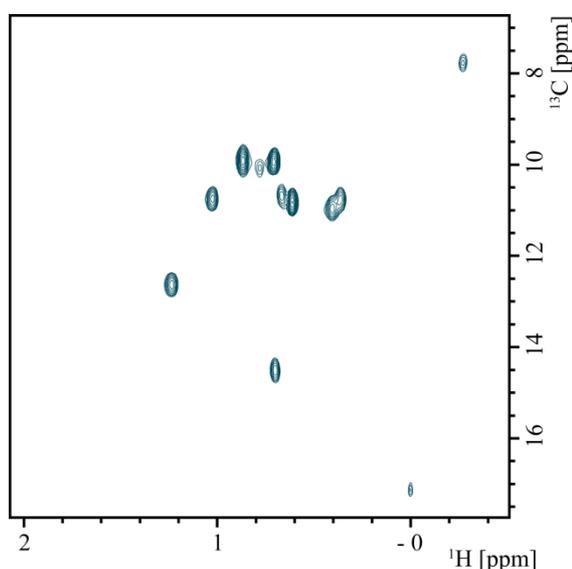


Abbildung 3.20 | ^1H , ^{13}C -Methyl-TROSY-Spektrum von $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB. Das Spektrum wurde mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen und zeigt die $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucine einer $120\ \mu\text{M}$ $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB (1) in NMR-Phosphatpuffer (D_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit $100\ \mu\text{M}$ TSP- d_4 als interne Referenz gemessen bei 298 K. Die Bezeichnung der Proteinprobe bezieht sich auf Tabelle 3.7.

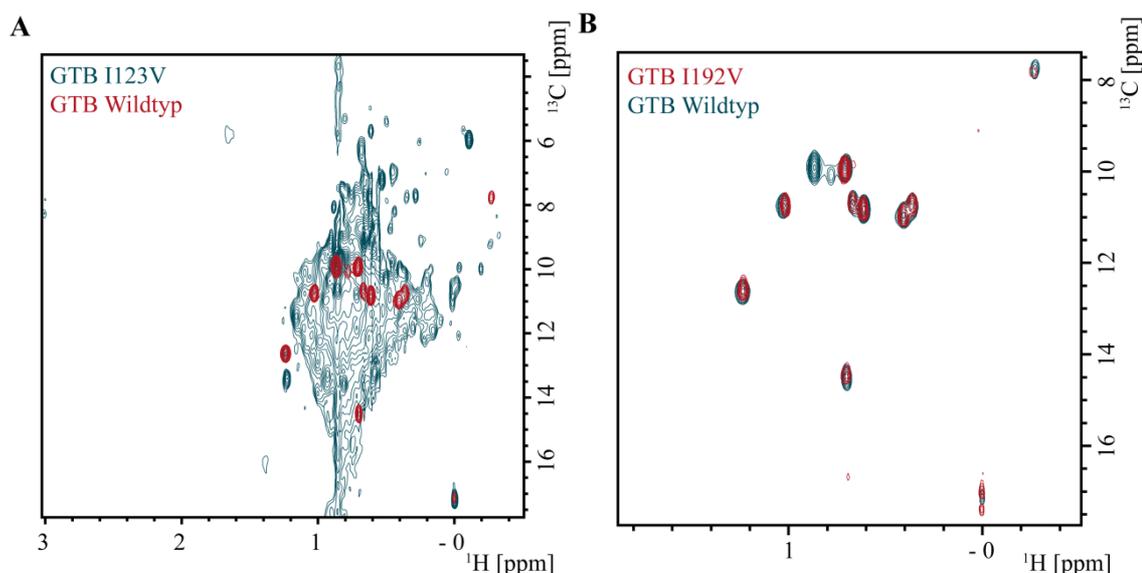


Abbildung 3.21 | Überlagerung der $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Methyl-TROSY-Spektren von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB mit (A) GTB I123V und (B) GTB I192V. Die Spektren wurde mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen und zeigen die $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucine einer $120\ \mu\text{M}$ $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB (1) in NMR-Phosphatpuffer (D_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit $100\ \mu\text{M}$ TSP- d_4 als interne Referenz gemessen bei 298 K überlagert mit (A) dem konzentrierten SP-Sepharose-Eluat einer $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB I123V Probe und (B) $192\ \mu\text{M}$ einer $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB I192V. Die Bezeichnungen der Proteinproben beziehen sich auf Tabelle 3.7.

3.3.2 Aufnahme und Auswertung von Tripelresonanzexperimenten

Wie bereits im Abschnitt 2.6.3 beschrieben, sollten die Arbeiten von N. Sindhuwinata (Sindhuwinata 2012) fortgesetzt werden und eine Zuordnung der NMR-Signale der GTB erfolgen. Hierbei sollte vor allem getestet werden, ob ein höherer Proteingehalt zu einer Verbesserung der Tripelresonanzspektren führt. Hierfür wurde eine $1\ \text{mM}$ $u\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierte GTB-Probe in NMR-Phosphatpuffer (H_2O) verwendet. Die Tripelresonanz-Experimente wurden von Dr. F. Lühr an der Goethe Universität Frankfurt bei 298 K und 600 MHz bzw. 950 MHz aufgenommen. Die Messzeit der Spektren betrug etwa eine Woche. Die genauen Aufnahmeparameter sind in Tabelle 2.14 und im Abschnitt 2.6.3 aufgeführt. In Abbildung 3.22 ist ein $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -BEST-TROSY-HSQC-Spektrum der dreifach-markierten GTB-Probe bei 950 MHz gezeigt. Die Auflösung der Signale ist größtenteils sehr gut. Jedoch sind auch Bereiche mit starker Signalüberlagerung zu erkennen. Deutlich zu sehen sind auch die Signale der Amide der Asparagin- und Glutaminseitenketten. Diese befinden sich bei einer ^{15}N -chemischen Verschiebung von etwa 113 ppm und bei einer ^1H -chemischen Verschiebung zwischen 7,9 und 6,6 ppm. Auch in den Tripelresonanzexperimenten sind diese deutlich zu sehen und erschweren die Auswertung. Da diese Signale intensiver sind und daher eine Phasenkorrektur nicht möglich ist, überlagern sie teilweise mit den Signalen der Amide des Proteinrückgrates.

Alle Tripelresonanzexperimente sind in Abbildung 3.23 dargestellt. Die Spektren wurden mit CCPNmr Analysis 2.3.1 (Vranken, Boucher et al. 2005) ausgewertet. In Tabelle 3.8 ist für jedes Spektrum die erwartete Anzahl an Signalen gegenüber der Anzahl an detektierten Signalen

dargestellt. In einem normalen ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum der GTB wurden 280 Signale des Proteinrückgrats (298 Reste minus 17 Pro-Reste und der N-Terminus) sowie zusätzlich 6 Trp-, 21 Arg-, 2x 7 Asn- und 2x 15 Gln-Reste erwartet. Von diesen insgesamt 351 Signalen konnten 294 Signale detektiert werden. Dies entspricht etwa 84 % und ist vergleichbar mit den 308 Signalen in den Spektren von N. Sindhuwinata (Sindhuwinata 2012). Im HNCO-Spektrum konnten mit 313 Signalen von 325 Signalen (298 Reste minus 17 Pro-, plus 2x 7 Asn- und 2x 15 Gln-Reste) 96 % detektiert werden. Zusammen mit dem HNCO korreliert das HN(CA)CO jeweils den ^1H - und ^{15}N -Kern mit dem Carbonyl-Kohlenstoff des vorangegangenen bzw. des eigenen Aminosäurerestes. Im HN(CA)CO wurde mit 562 Signalen die doppelte Anzahl (2x 298 Reste minus 2x 17 Pro-Reste) gegenüber dem HNCO erwartet. Es konnten jedoch nur 48 %, also 268 Signale detektiert werden. Das HNCA und das HN(CO)CA korrelieren jeweils den ^1H - und ^{15}N -Kern mit dem C_α -Kern des vorangegangenen bzw. des eigenen Aminosäurerestes. Im HNCA konnten von 583 Signalen (2x 298 Reste minus 2x 17 Pro- plus 21 Arg-Reste) 346 Signale und im HN(CO)CA von 325 Signalen (298 Reste minus 17 Pro-, plus 2x 7 Asn- und 2x 15 Gln-Reste) 178 Signale detektiert werden. Dies entspricht 59 % bzw. 55 %. Das HNCACB korreliert für jeden Aminosäurerest das C_α und C_β der eigenen Aminosäure mit dem C_α und C_β der vorangegangenen Aminosäure. Die Gly-Reste weisen je nur ein Signal für das C_α auf. Teilweise sind auch Seitenkettensignale in diesem Spektrum vorhanden, diese werden jedoch nicht weiter betrachtet. Mit 256 Signalen von 1160 Signalen zeigt dieses Spektrum mit 22 % die geringste Menge an detektierten Signalen. Das HNCACB ist vor allem für die Identifikation der Aminosäurereste wichtig, da die chemischen Verschiebungen der C_β -Kerne charakteristischer sind als die der anderen hier besprochenen Kerne.

Im Vergleich zu den Spektren von N. Sindhuwinata (Sindhuwinata 2012) (HNCO: 222 Signale, HC(CA)CO: 91 Signale, HNCA: 291 Signale, HN(CO)CA: 156 Signale und HNCACB: 105 Signale) konnten die Qualitäten der Spektren durch Erhöhung des Proteingehaltes deutlich verbessert werden. Dennoch gab es viel Signalüberlagerung wodurch keine vollständige Signalzuordnung möglich war. Es konnten 22-mal eine Verknüpfung von 2-Resten, 8-mal eine Verknüpfung von 3-Resten, sowie eine Verknüpfung von 4-Resten und eine Verknüpfung von 6-Resten erfolgen. Teilweise konnte mit Hilfe des HNCACB-Spektrums die Art des Aminosäurerestes festgestellt werden, jedoch nur bei der Verknüpfung der 6-Reste war eine eindeutige Zuordnung möglich. Die Verknüpfung der 6-Reste ist in Abbildung 3.24 gezeigt. Es handelt sich um die Aminosäurereste 161 bis 166 (Arg-Val-Thr-Leu-Gly-Thr). In den HNCA- und HN(CO)CA-Spektren konnten alle ^1H - und ^{15}N -Kerne mit den C_α -Kernen des vorangegangenen bzw. des eigenen Aminosäurerestes dieser Kette detektiert werden. Bei der Korrelation über das HNCO und HN(CA)CO, die jeweils den ^1H - und ^{15}N -Kern mit dem Carbonyl-Kohlenstoff des vorangegangenen bzw. des eigenen Aminosäurerestes korrelieren, fehlte die Korrelation zwischen den Aminosäurerest 161 Arg und 162 Val sowie zwischen 165 Gly und 166 Thr. Durch das HNCACB konnte nur die Korrelation der Aminosäurereste 161 und 162 durch die C_β -Korrelationen bestätigt werden, da es sich bei dem Aminosäurerest 165 um ein Glycin handelt und dieser keine C_β -Kerne besitzt. Die Signale der C_β -Kerne sind im HNCACB deutlich intensiver als die die Signale der C_α -Kerne. Anhand der charakteristischen

chemischen Verschiebung der C_β-Kerne von Threonin und Serin sowie das Fehlen der C_β-Signale bei Glycin konnten diese sechs Aminosäureseitenketten eindeutig zugeordnet werden. Die chemischen Verschiebungen, Korrelationen sowie mögliche Zuordnungen der Art der Aminosäureseitenketten sind im Anhang zu finden (6.6.1).

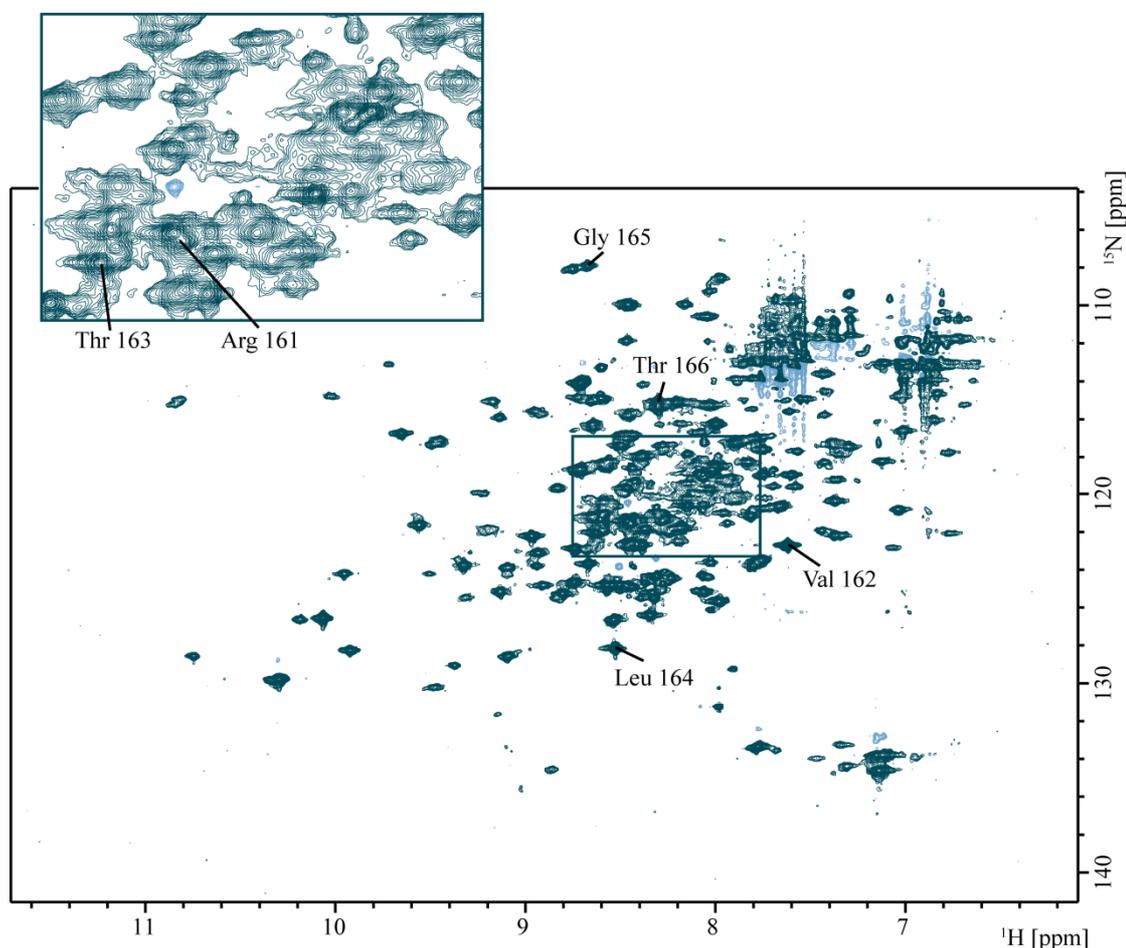


Abbildung 3.22 | $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -BEST-TROSY-HSQC-Spektrum von $u\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierter GTB bei 950 MHz. Die NMR-Probe enthielt 1 mM $u\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierte GTB in NMR-Phosphatpuffer (H_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz und 10 % D_2O . Weitere Aufnahmeparameter sind unter 2.6.3 angegeben. Es konnte die Zuordnung von sechs Aminosäureresten durch Tripelresonanzexperimente erfolgen (siehe Text im Abschnitt 3.3.2).

Tabelle 3.8 | Beobachtete und erwartete Signale der Tripelresonanzexperimente der $u\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierten GTB bei 298 K. Die NMR-Probe enthielt 1 mM $u\text{-}^2\text{H},^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierte GTB in NMR-Phosphatpuffer (H_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz und 10 % D_2O . Die Spektren sind in Abbildung 3.23 gezeigt und die Aufnahmeparameter sind in Tabelle 2.14 angegeben.

Spektrum	Erwartete Signale	Detektierte Signale	Prozentsatz
HSQC	351	294	84 %
HNCO	325	313	96 %
HN(CA)CO	562	268	48 %
HNCA	583	346	59 %
HN(CO)CA	325	178	55 %
HNCACB	1160	256	22 %

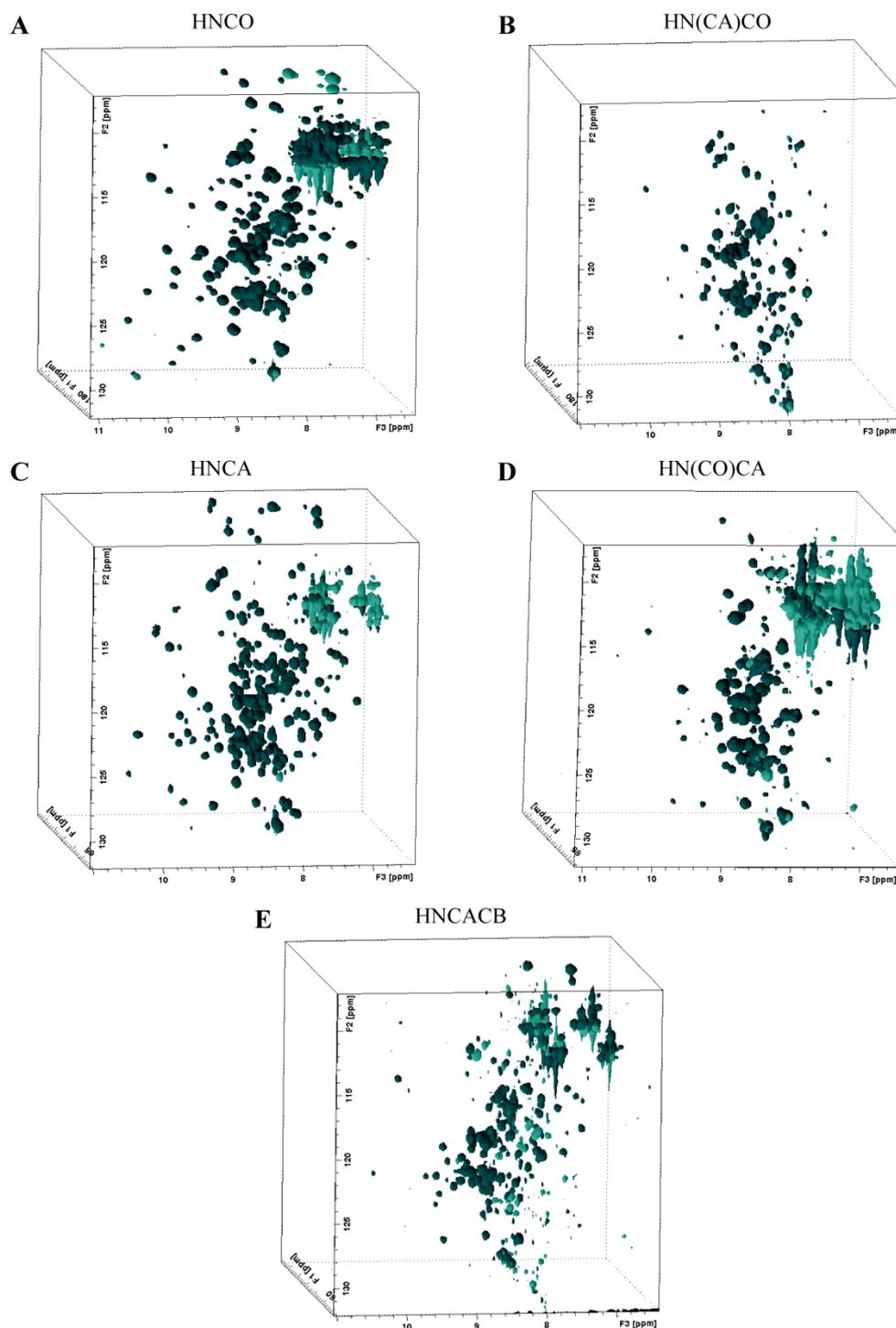


Abbildung 3.23 | Tripelresonanzexperimente der $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N -markierten GTB bei 298 K. Die NMR-Probe enthielt 1 mM $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N -markierte GTB in NMR-Phosphatpuffer (H_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz und 10 % D_2O . Die Aufnahmeparameter sind in Tabelle 2.14 angegeben. Positive Signale sind dunkel und negative Signale hell dargestellt. F1 ist die ^{13}C -, F2 die ^{15}N - und F3 die ^1H -chemische Verschiebung.

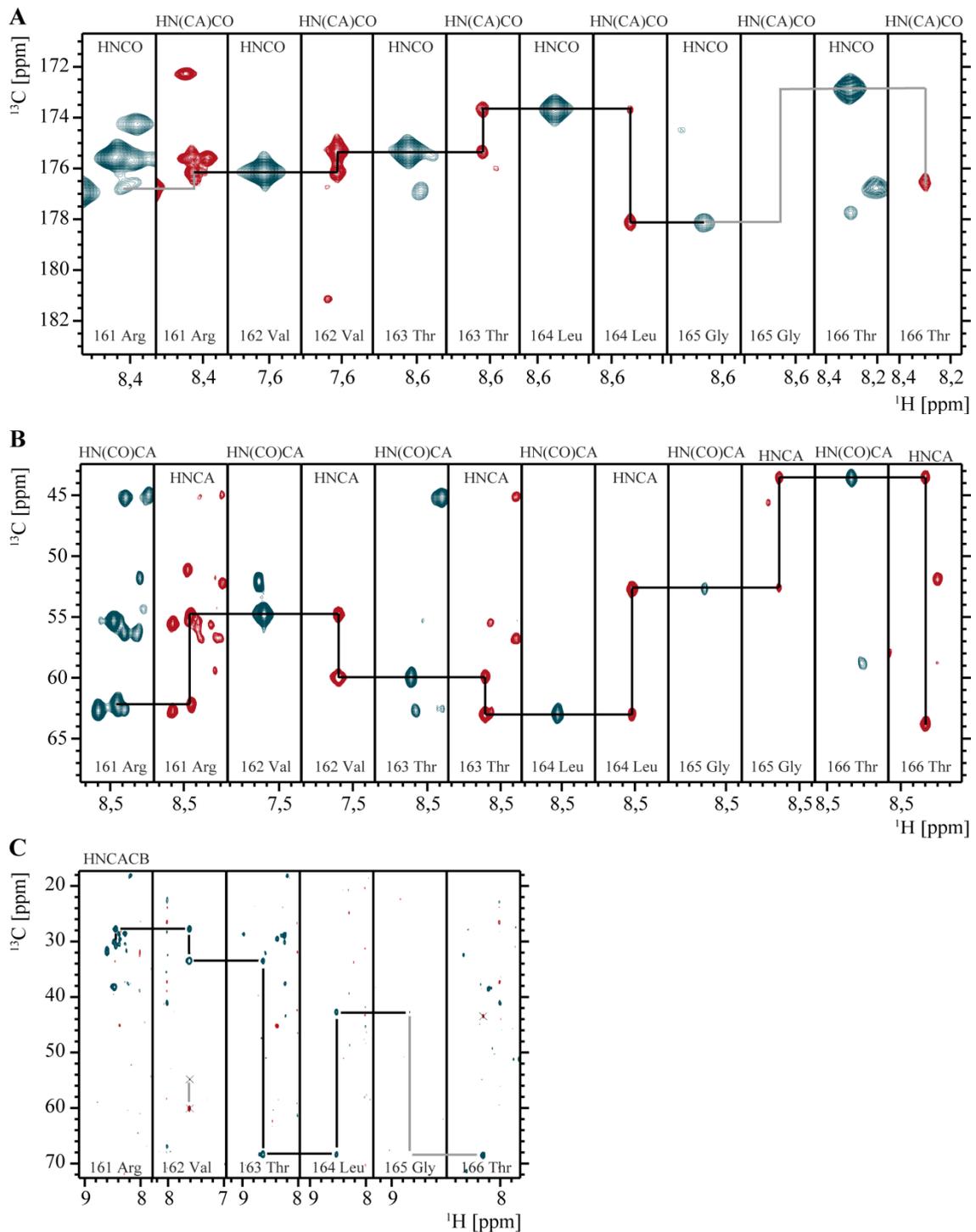


Abbildung 3.24 | Beispiel einer Zuordnung mit Tripelresonanzexperimenten von $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N -markierter GTB. Die NMR-Probe enthielt 1 mM $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N -markierte GTB in NMR-Phosphatpuffer (H_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz und 10 % D_2O . Weitere Aufnahmeparameter sind unter 2.6.3 angegeben. Die Abbildung zeigt die Zuordnungsspektren der Aminosäurereste 161 bis 166. In (A) sind jeweils die ^{15}N -Ebenen der HNCO- und HN(CA)CO-Spektren, in (B) die ^{15}N -Ebenen der HN(CO)CA- und HNCA-Spektren und in (C) die ^{15}N -Ebenen der HNCACB-Spektren gezeigt. Die Korrelation der Signale wird durch schwarze Linien dargestellt, fehlt ein Signal, ist die Linie grau. In den HNCACB-Spektren erfolgte die Korrelation durch die C_β -Kerne (blau), eine Korrelation über die C_α -Kerne (rot) war nicht möglich, diese sind mit Kreuzen gekennzeichnet.

3.3.3 Protonen-Deuterium Austausch bei GTB

Um den Austausch der Amidprotonen bei der GTB zu untersuchen, wurden 520 μM der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -markierten GTB (2) verwendet. Hierfür wurde der Puffer der GTB-Probe mit NMR-Phosphatpuffer (D_2O), pH 6,7, ausgetauscht und anschließend mehrere $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren über die Zeit gemessen. Da in diesen Spektren zwar noch einige Signale zu sehen waren, diese aber keine Aussage über eine korrekte Faltung der GTB zulassen, wurde der GTB-Probe schrittweise wässriger NMR-Phosphatpuffer, pH 6,7, dazugegeben. Auch hier wurde nach jedem Schritt sowie weitere acht Stunden später ein $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum aufgenommen. Dadurch konnte überprüft werden, ob die verwendete GTB-Probe noch gefaltet vorliegt oder bereits aggregiert ist. Zusätzlich konnten weitere Informationen über den Austausch der Amidprotonen gewonnen werden.

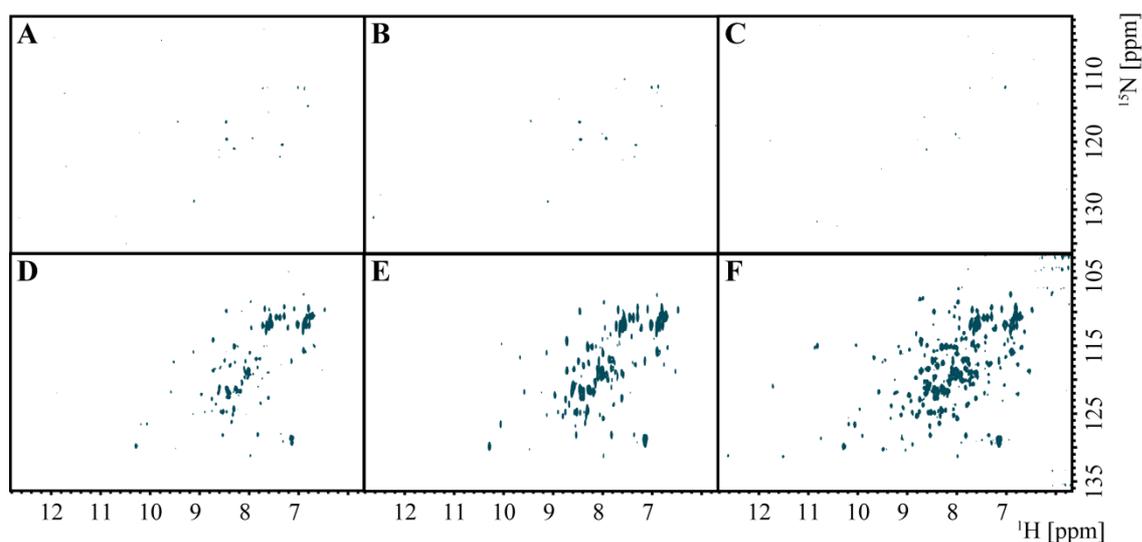


Abbildung 3.25 | Verfolgung des Amidaustausches einer $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -markierten GTB-Probe. Die NMR-Probe enthielt 520 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -markierte GTB in NMR-Phosphatpuffer (D_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz. Es wurden $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren direkt nach dem Pufferaustausch (A), 6 Stunden (B) sowie einen Tag (C) später aufgenommen. Anschließend wurde schrittweise NMR-Phosphatpuffer (H_2O) dazugegeben um den Austausch der Amidprotonen zu verfolgen. In (D) enthält die Probe 10 % H_2O und 460 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB in (E) 20 % H_2O und 410 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB und in (F) 40 % H_2O und 310 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -GTB. Weitere Aufnahmeparameter sind unter 2.6.4 angegeben.

In Abbildung 3.25 ist eine Auswahl der aufgenommenen $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren zu sehen. Das erste Spektrum wurde direkt nach dem Austausch des Puffers aufgenommen. Der Pufferaustausch hat etwa 6 Stunden gedauert und die Aufnahme eines Spektrums etwa 4 Stunden. Alle Spektren wurden so geschnitten, dass noch Rauschen zu erkennen ist, da ansonsten eventuell Signale nicht zu sehen sind. In den Spektren direkt nach Austausch des Puffers und 6 Stunden danach sind nur noch drei Seitenketten- und etwa acht Amidprotonensignale zu sehen. Teilweise konnten noch weitere Signale beobachtet werden, diese waren jedoch kaum vom Rauschen zu unterscheiden. Bereits nach einem Tag konnten nur noch zwei der Seitenkettensignale erkannt werden, alle weiteren Signale waren vom Rauschen

nicht unterscheidbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Austausch der Amidprotonen innerhalb eines Tages stattfindet. Diese Informationen sind vor allem für Messungen von Methyl-TROSY-Spektren von großer Bedeutung, da hierfür eine größtmögliche Deuterierung vorliegen sollte. Im unteren Teil der Abbildung sind jeweils $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren direkt nach Zugabe von wässrigem Puffer abgebildet. Der Proteingehalt wird mit jedem Schritt geringer. Die Spektren wurden alle auf der gleich Höhe geschnitten um einen Vergleich möglich zu machen. Es ist deutlich zu sehen, dass mit jedem Schritt mehr Signale hinzugekommen sind. Nach einer Zeit von 8 h nach Zugabe des Puffers wurde jeweils nochmal ein $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum aufgenommen. Die Spektren direkt nach Zugabe des Puffers und die 8 h später gemessenen unterscheiden sich in den Signalen nicht. Einzig hat sich die Signalintensität minimal erhöht. Bei einem Wassergehalt von 40 % in der Probe sind alle Signale detektierbar. Diese Probe wurde nach drei Monaten erneut gemessen, auch nach dieser Zeit sind keine weiteren Signale hinzugekommen. Es kann also gesagt werden, dass sich die austauschbaren Protonen in der GTB schnell austauschen und auch schnell ins Gleichgewicht gelangen. Es gibt jedoch Bereiche im Protein, die zugänglicher für das Lösungsmittel sind und Bereiche die nicht so zugänglich sind. Da jedoch keine Zuordnung der Signale vorliegt, können daraus keine weiteren Informationen gezogen werden.

3.3.4 $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experimente zur Untersuchung der Bindung von UDP an GTB

Anhand der chemischen Verschiebungsänderungen in einem $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum sollte die Bindung von UDP an GTB auf struktureller Ebene weiter untersucht werden. Hierfür wurden 500 μM der $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -markierten GTB-Probe (1) (siehe Tabelle 3.7) verwendet und schrittweise mit UDP versetzt. Die Titrationslösung enthielt die gleiche Menge an Protein wie die NMR-Probe, damit wurde gewährleistet, dass der Proteingehalt in jedem Spektrum vergleichbar blieb. In Abbildung 3.27 (A) ist der Verlauf der Titration dargestellt. Für die Übersichtlichkeit wurden nicht alle $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -BEST-TROSY-HSQC-Spektren abgebildet. Zu sehen sind die Spektren mit 0 μM , 250 μM , 1,2 mM und 4,3 mM UDP. Diese entsprachen einer UDP-Sättigung von 0 %, 20 %, 60 % und 87 % mit einem K_D -Wert von 0,57 μM aus SPR- und STD-NMR-Experimenten (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013). Interessanterweise verhalten sich die Signale sehr unterschiedlich. Einige verschieben sich wie erwartet bei Erhöhung der UDP-Konzentration. Andere Signale verschwinden bei Erhöhung der Konzentration bzw. es kommen weitere Signale hinzu. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die UDP-Konzentration nicht korrekt ist. Betrachtet man die Protonenspektren der Titration (siehe Abbildung 3.26) ist deutlich zu sehen, dass während der Titration Uracil entstanden ist. Jedoch sind im Spektrum mit der höchsten UDP-Konzentration auch die Signale $\text{H5}_U/\text{H1}_R$ von UDP zu sehen. Da die Linienbreite der UDP-Signale deutlich größer ist als die der Uracil-Signale und die Affinität von UDP zu GTB deutlich größer ist als die von Uracil, kann davon ausgegangen werden, dass hauptsächlich UDP an GTB gebunden hat. Aus diesem Grund konnten aus diesen Spektren jedoch keine Bindungskonstanten extrahiert werden. Zusätzlich lagen einige Signale sehr nah am Rauschen und die Signalüberlagerung war sehr groß, so dass bei einigen Signalen die Verschiebung nicht

verfolgt werden konnte. Aus diesen Gründen konnte die Auswertung nur auf einer qualitativen Ebene gemacht werden. Hierfür wurden die chemischen Verschiebungen und Intensitäten der Signale aus den Spektren extrahiert und aus dem ersten und letzten Spektrum mit Gl 2.10 die durchschnittliche euklidische Verschiebung berechnet. Alle Signale bei denen die euklidischen Verschiebungen über einer Grenze, die aus der Standardabweichung aller berechneten euklidischen Verschiebungen bestand, lagen wurden weiter betrachtet. Insgesamt konnten im ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum ohne UDP 261 Signale detektiert werden. Davon lag die euklidische Verschiebung von 57 Signalen über der berechneten Grenze. Bei 17 dieser 57 Signale fand eine Verschiebung ab Zugabe der ersten UDP-Konzentration statt. Bei 19 Signalen erfolgte die Verschiebung erst bei höheren UDP-Konzentrationen. Etwa die Hälfte dieser 19 Signale änderte ihre chemische Verschiebung ab einer UDP-Konzentration von $600\ \mu\text{M}$, dies entsprach einer Sättigung von 40 %. Bei zwei Signalen konnte ein langsamer Austausch beobachtet werden. In Abbildung 3.27 (B-D) sind Beispiele für alle drei unterschiedlichen chemischen Verschiebungsänderungen dargestellt. Zusätzlich zur chemischen Verschiebungsänderung konnte eine Verbreiterung der Signale während der Titration festgestellt werden. Bei einigen Signalen führte dies zum Verschwinden dieser, andere Signale erlangten ihre anfängliche Signalintensität wieder.

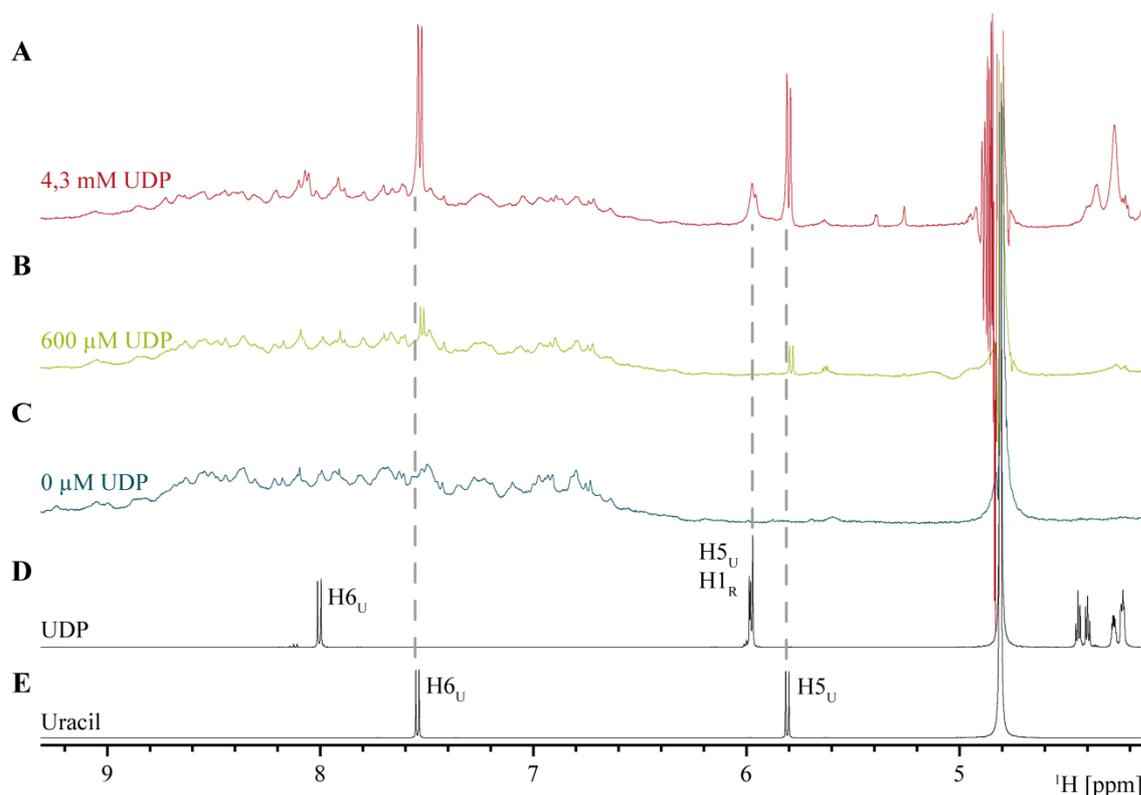


Abbildung 3.26 | 1D- ^1H -Spektren der UDP-Titration von $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -markierter GTB. Die Spektren (A-C) wurden mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer mit Wasserunterdrückung bei 298 K aufgenommen und zeigen die ^1H -NMR-Spektren der UDP-Titration aus Abbildung 3.27. Die NMR-Proben enthielt (C) $500\ \mu\text{M}$ $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -markierte GTB in NMR-Phosphatpuffer (H_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit $100\ \mu\text{M}$ TSP- d_4 als interne Referenz und 10 % D_2O sowie (A) $4,3\ \text{mM}$ bzw. (B) $600\ \mu\text{M}$ UDP. In (D) ist das Referenzspektrum von UDP und in (E) das von Uracil gezeigt.

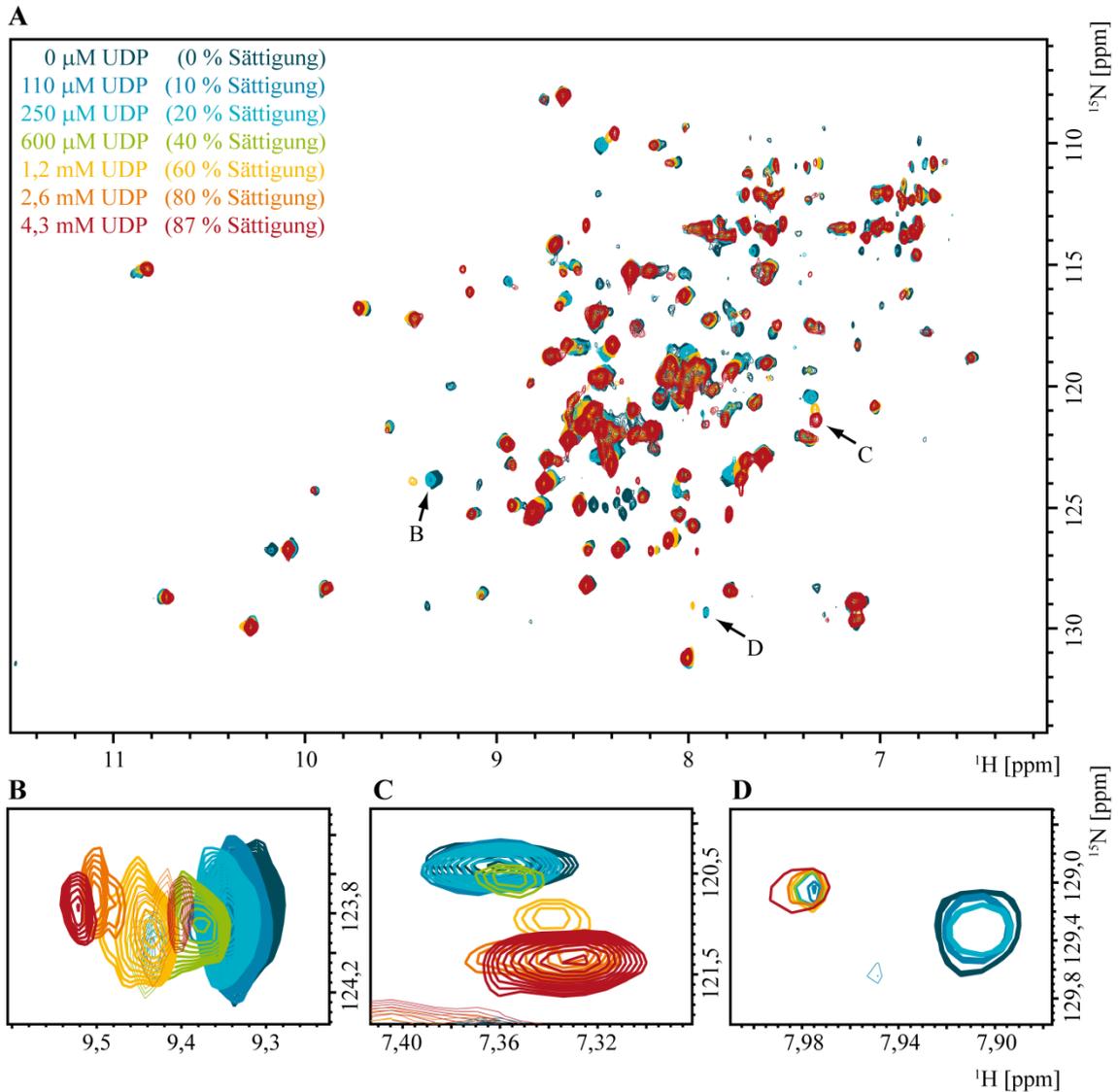


Abbildung 3.27 | UDP-Titration von $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -markierter GTB. Die NMR-Probe enthielt 500 μM $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -markierte GTB in NMR-Phosphatpuffer (H_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz und 10 % D_2O . Es wurden ^1H , ^{15}N -BEST-TROSY-HSQC-Spektren mit steigenden UDP-Konzentrationen aufgenommen, um die chemische Verschiebungsänderung bei Bindung von UDP an GTB zu untersuchen. Alle Aufnahmeparameter sind unter 2.6.5 angegeben. Die unterschiedlichen UDP-Konzentrationen bzw. Sättigungen sind durch verschiedene Farben dargestellt und in der Legende in (A) zu finden. (A) zeigt den kompletten Bereich der ^1H , ^{15}N -BEST-TROSY-HSQC-Spektren, wobei in (B), (C) und (D) jeweils spezifische Verschiebungsmuster einzelner Signale (durch Pfeile in (A) gekennzeichnet) zu sehen sind. In (B) fand eine chemische Verschiebung bereits ab der ersten UDP-Konzentration statt und in (C) erfolgte die chemische Verschiebung erst nach 40 % Sättigung durch UDP. In (D) handelt es sich um einen langsamen Austausch, um diesen Austausch besser zu veranschaulichen sind nicht die kompletten Signale gezeigt, sondern nur einzelne Ebenen der 2D-Projektion.

3.3.5 Methyl-TROSY-Experimente mit GTB

Da eine Zuordnung der GTB mit den Standard Tripelresonanzexperimenten nicht möglich war, wurde in dieser Arbeit erstmals das selektive Markieren der δ 1-Methylgruppen von Isoleucinseitenketten angewandt. Wie bereits unter 3.3.1 beschrieben verlief die selektive Markierung erfolgreich. Mit $190\ \mu\text{M}$ der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB in NMR-Phosphatpuffer (D_2O) und $100\ \mu\text{M}$ TSP- d_4 wurden verschiedene Methyl-TROSY-Pulsprogramme wie in 2.6.6 beschrieben bei $298\ \text{K}$ getestet. Alle Spektren wurden mit 4 Scans aufgenommen und mit den gleichen Parametern prozessiert. Dies entsprach einer Aufnahmezeit von etwa 14 Minuten.

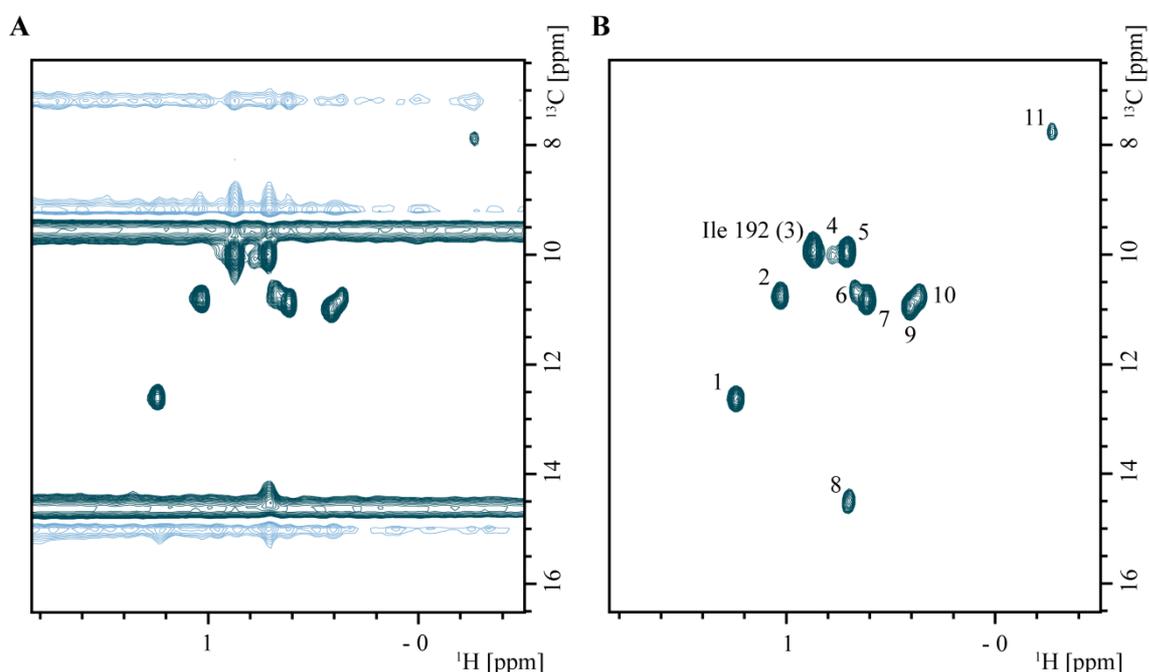


Abbildung 3.28 | Vergleich von HMQC- und Methyl-TROSY-NMR-Spektren der GTB. Zum Vergleich wurde ein (A) HMQC-NMR-Spektrum und ein (B) Methyl-TROSY-NMR-Spektrum mit einem $500\ \text{MHz}$ NMR-Spektrometer aufgenommen. Gezeigt sind die δ 1-Methylgruppen der Isoleucine einer $190\ \mu\text{M}$ $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB in NMR-Phosphatpuffer (D_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit $100\ \mu\text{M}$ TSP- d_4 als interne Referenz gemessen bei $298\ \text{K}$. Beide Spektren wurden unter den gleichen Bedingungen aufgenommen.

In Abbildung 3.28 ist zum Vergleich ein normales HMQC-NMR-Spektrum (hmqcph) und ein Methyl-TROSY-NMR-Spektrum (metr_hmqcphpr-III.tb) dargestellt. In dem HMQC-NMR-Spektrum ist noch deutlich ein Restsignal vom Wasser zu sehen. Dieses sowie weitere Artefakte sind im Methyl-TROSY-NMR-Spektrum komplett verschwunden. Ob die Gradienten symmetrisch oder nicht symmetrisch um den Refokussierungspuls lagen, hat keinen großen Unterschied in den Spektren gemacht. In weiteren Experimenten wurde die symmetrische Version verwendet, da diese geringfügig besser war. Zusätzlich wurde eine optionale Wasserunterdrückung durch Vorsättigung des Wassersignales eingefügt. Diese verbesserte die Qualität des Spektrums deutlich und wurde daher in allen weiteren Experimenten verwendet. Eine Vergrößerung der spektralen Breite von $20\ \text{ppm}$ auf $30\ \text{ppm}$ in der ^{13}C -Dimension zeigte

keine Veränderung in den Spektren. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass keines der Signale rein gefaltet wurde. Da bis auf das Isoleucin 192 bisher kein weiteres Isoleucin zugeordnet werden konnte, wurden die Signale von 1 bis 11 durchnummeriert. Signal Nummer 3 entspricht hier dem Isoleucin 192.

In Abbildung 3.29 sind die Methyl-TROSY-NMR-Spektren bei 298 K und 283 K dargestellt. Hier ist deutlich zu sehen, dass die Temperatur Einfluss auf die chemische Verschiebung einiger Signale hat. Allerdings lagen alle Verschiebungen unterhalb der digitalen Auflösung, weshalb eine Quantifizierung nicht möglich war. Die größte Verschiebung zeigten die Signale 2, 4, 5, 8 und 10. Signal 1, 7, 9 und Ile 192 zeigten minimale Verschiebungen und Signal 6 und 11 zeigten keine Verschiebung.

Die $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierte GTB-Probe eignet sich sehr gut um weitere strukturelle sowie dynamische Untersuchungen zu machen. Es konnten mit einer sehr geringen Menge an Protein und kurzer Messzeit sehr gute Spektren erhalten werden.

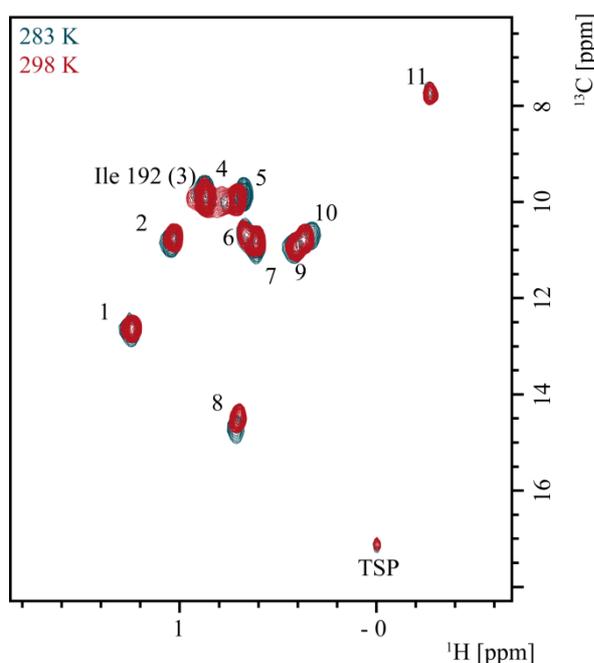


Abbildung 3.29 | Methyl-TROSY-NMR-Spektren bei 283 K und 298 K von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB. Zum Vergleich wurden Methyl-TROSY-NMR-Spektren bei 283 K (blau) und 298 K (rot) mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen und zeigen die $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucine einer $190\ \mu\text{M}$ $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB in NMR-Phosphatpuffer (D_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit $100\ \mu\text{M}$ TSP- d_4 als interne Referenz gemessen bei 298 K. Die Spektren wurden unterschiedlich skaliert, da das Spektrum bei 283 K mit 64 Scans und das bei 298 K mit 4 Scans aufgenommen wurden. Alle weiteren Messparameter sind identisch.

3.3.6 Methyl-TROSY-Experimente zur Untersuchung der Bindung von UDP und H-Disaccharid an GTB

Wie bereits zuvor mit der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N}$ -markierten GTB sollte auch mit der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB die Bindung von UDP und H-Disaccharid an GTB anhand der chemischen Verschiebungsänderung untersucht werden. Hierfür wurden $100\ \mu\text{M}$ der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}$

$^{13}\text{CH}_3$ }-markierten GTB-Probe (2) verwendet und erst schrittweise mit UDP und anschließend mit H-Disaccharid-O- $^{13}\text{CH}_3$ (H-Dis) versetzt. Die Titrationslösung enthielt die gleiche Menge an Protein wie die NMR-Probe, damit wurde gewährleistet, dass der Proteingehalt in jedem Spektrum vergleichbar blieb. In Abbildung 3.30 ist der Verlauf der Titration dargestellt. Für die Übersichtlichkeit wurde nur das Spektrum ohne Substrat, das Spektrum mit 6,8 mM UDP (92 % Sättigung) sowie das Spektrum mit 10 mM UDP (94,5 % Sättigung) und 380 μM H-Dis (98 % Sättigung) abgebildet. Am deutlichsten verschieben sich Signal 2 und Ile 192 bei der Zugabe von UDP. Auch Signal 5, 7, 8 und 9 verschieben sich leicht. Hier ist jedoch zu beachten, dass die digitale Auflösung der Spektren in der ^1H -Dimension 10,4 Hz und in der ^{13}C -Dimension 41,9 Hz betrug. Nur die Verschiebung von Signal 2 und Ile 192 waren größer als die digitale Auflösung. Da Ile 123 an der UDP-Bindung beteiligt ist, wird vermutet, dass es sich bei Signal 2 um das Ile 123 handelt. Ile 123 und Ile 192 erfuhren auch bei der Zugabe von H-Dis die größte Verschiebung. Die Verschiebung von Ile 192 lag knapp über und die Verschiebung von Ile 123 lag knapp unter der digitalen Auflösung von 41,9 Hz in der ^{13}C -Dimension. Eine Verschiebung in der ^1H -Dimension fand hier nicht statt. Desweiteren verschob sich Signal 5 wieder in die Ausgangsposition, Signal 6, 7, 8 und 9 erfuhren erneut eine leichte Verschiebung die jedoch wieder unterhalb der digitalen Auflösung lag. Die Verschiebung von Signal 9 nach Zugabe von UDP und H-Dis lag bei 20 Hz und damit über der digitalen Auflösung. UDP und H-Dis haben einen Einfluss auf dieses Signal. Da sich das Signal jedoch kontinuierlich in eine Richtung bewegt und nicht wie bei Ile 123 und Ile 192 durch Zugabe von H-Dis die Richtung ändert, könnte die Änderung der chemischen Verschiebung auch allein durch die Bindung von UDP verursacht worden sein. Die UDP-Konzentration erhöhte sich bei der H-Dis-Titration ebenfalls. Die chemischen Verschiebungen der beiden Signale Ile 123 und Ile 192 wurden für jeden Schritt extrahiert, anhand der Berechnung der durchschnittlichen euklidischen Verschiebung (Gl. 2.10) eine Bindungsisotherme erstellt und die Daten global mit einem K_D -Wert an Gl. 2.11 angepasst. Die Bindungsisothermen sind in Abbildung 3.31 zu sehen.

Der K_D -Wert für UDP liegt bei $76 \pm 16 \mu\text{M}$ und der für H-Dis in Anwesenheit von UDP bei $4,3 \pm 5,2 \mu\text{M}$. Bei Vergleich mit den zuvor erhobenen SPR-Daten für UDP mit einem K_D -Wert von $710 \pm 90 \mu\text{M}$ liegt der hier bestimmte K_D -Wert deutlich darunter. Jedoch muss beachtet werden, dass es sich um eine andere Messmethode handelt und durch die geringen Verschiebungen der Fehler recht groß ist. Der K_D -Wert für H-Dis in Anwesenheit von UDP wurde nur mit ITC-Experimenten bestimmt (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) und ist mit $7 \mu\text{M}$ vergleichbar mit dem hier bestimmten K_D -Wertes von $4,3 \pm 5,2 \mu\text{M}$. Zusätzlich ist noch anzumerken, dass bei diesen Experimenten UDP stabil blieb und sich nicht wie bei der Titration der $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -markierten GTB-Probe in Uracil zersetzte. Die Protonenspektren sind in Abbildung 3.32 dargestellt.

Die Verteilung der δ^1 -Methylgruppen der Isoleucine über das gesamte Protein spiegelten sich im unterschiedlichen Verhalten der Signale der selektiv $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta^1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB-Probe deutlich wieder.

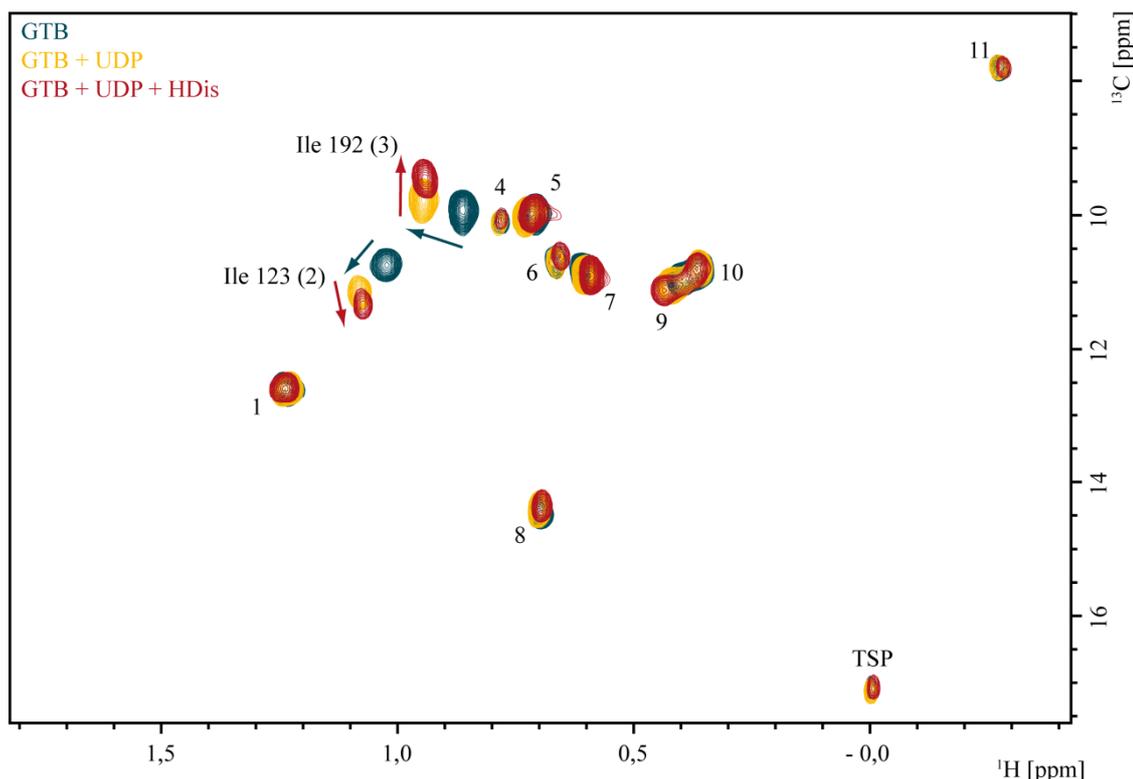


Abbildung 3.30 | UDP- und H-Disaccharid-Titration von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB. Die NMR-Probe enthielt $100\ \mu\text{M}$ $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierte GTB in NMR-Phosphatpuffer (D_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit $100\ \mu\text{M}$ TSP- d_4 als interne Referenz. Es wurden Methyl-TROSY-NMR-Spektren mit steigenden UDP-Konzentrationen und anschließend steigender H-Dis-Konzentration aufgenommen, um die chemische Verschiebungsänderung bei Bindung von UDP und UDP/H-Dis an GTB zu untersuchen. Alle Aufnahmeparameter sowie Titrationschritte sind unter 2.6.7 angegeben. Gezeigt sind die Spektren ohne Substrat (blau), mit $6,8\ \text{mM}$ UDP (92 % Sättigung) (gelb) sowie mit $10\ \text{mM}$ UDP (94,5 % Sättigung) und $380\ \mu\text{M}$ H-Dis (98 % Sättigung) (rot). Die Pfeile zeigen den Verlauf der chemischen Verschiebung durch Zugabe von UDP (blau) und H-Dis (rot).

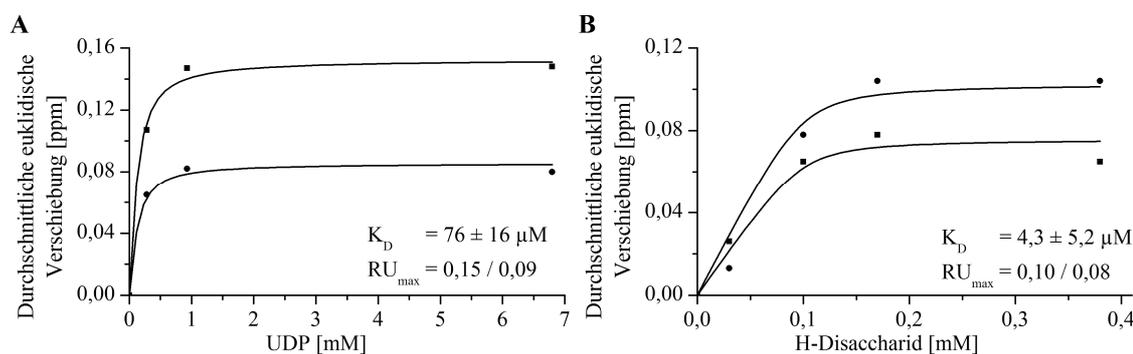


Abbildung 3.31 | Bindungsisotherme der Bindung von UDP und H-Disaccharid in Anwesenheit von UDP an $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB. Die durchschnittlichen euklidischen Verschiebungen wurden aus den Methyl-TROSY-NMR-Spektren der Titration von (A) 0 bis $6,8\ \text{mM}$ UDP und (B) 0 bis $380\ \mu\text{M}$ H-Dis in Anwesenheit von $6,8$ bis $10\ \text{mM}$ UDP extrahiert (siehe Abbildung 3.30). Es wurden die Signale von Ile 123 (eckig) und Ile 192 (rund) ausgewertet.

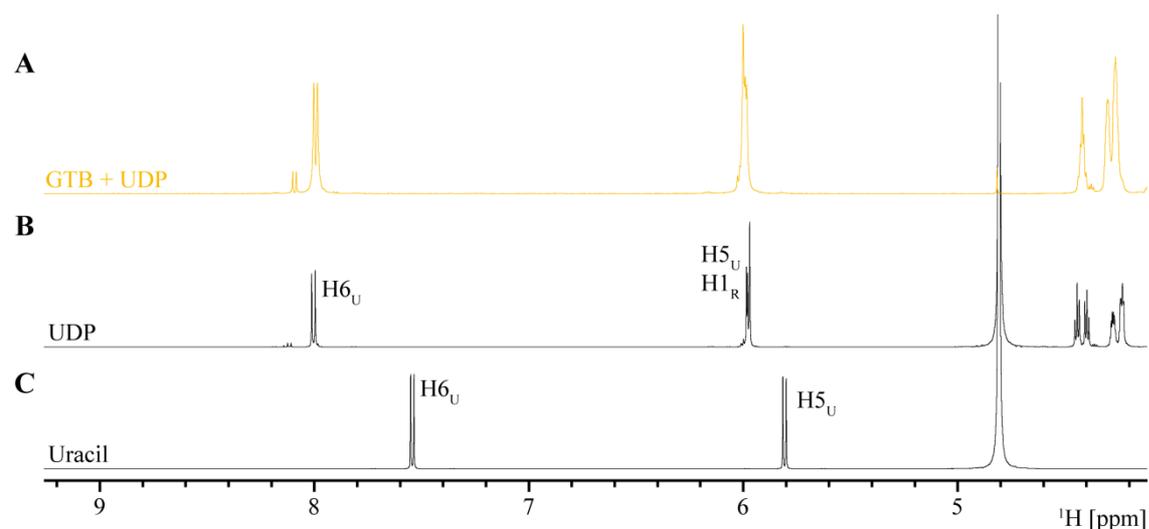


Abbildung 3.32 | 1D- ^1H -Spektrum der UDP-Titration von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB. Das Spektrum (A) wurde mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer mit Wasserunterdrückung bei 298 K aufgenommen und zeigt das ^1H -NMR-Spektren der UDP-Titration aus Abbildung 3.30. Die NMR-Proben enthielt 100 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierte GTB in NMR-Phosphatpuffer (D_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz und 6,8 mM UDP. In (B) ist das Referenzspektrum von UDP und in (C) das von Uracil gezeigt.

3.3.7 Methyl-TROSY CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit GTB

Da gezeigt werden konnte, dass die Methyl-TROSY-NMR-Spektren der selektiv $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB-Probe einen guten Überblick über das Enzym lieferten, sollte die Dynamik mit Hilfe von CPMG-Relaxations-Dispersions Experimenten untersucht werden. Hierbei können Bewegungen im Bereich von Milli- bis Mikrosekunden untersucht werden. Verwendet wurden hierfür 190 μM der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB-Probe in NMR-Phosphatpuffer (D_2O) und 100 μM TSP- d_4 für Testmessungen sowie die Messungen ohne Substrat. Für die Messungen mit UDP, sowie mit UDP und H-Disaccharid- $\text{O-}^{13}\text{CH}_3$ (H-Dis) wurden 170 μM der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB-Probe (2) in NMR-Phosphatpuffer (D_2O) und 100 μM TSP- d_4 verwendet. Die UDP Konzentration betrug 9,45 mM. Für die Messungen mit UDP und H-Dis wurde zusätzlich 380 μM H-Dis hinzugegeben. Zuerst sollte getestet werden, ob das purge-Element für Messungen mit der GTB nötig ist. Zusätzlich wurden verschiedene Mischzeiten von 20 ms, 40 ms und 60 ms bei unterschiedlichen Temperaturen getestet. Es ist bekannt, dass die GTB bei zu hohen Temperaturen leicht ausfällt, daher war die höchste Temperatur, die getestet wurde 298 K. Zusätzlich wurden die Messungen auch noch bei 283 K und 275 K durchgeführt. Die Spektren, die ohne und mit purge-Element aufgenommen wurden, zeigen keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Das purge-Element ist also, wie vermutet, für die Messungen mit GTB nicht nötig. Alle weiteren Experimente wurden ohne das purge-Element aufgenommen.

Desweiteren sollte getestet werden, welche Mischzeit für die Messungen mit GTB verwendet werden sollte. Die Wahl der Mischzeit ist von der Dynamik des Proteins abhängig. Je länger die Mischzeit ist, desto mehr Zeit hat das Protein zu relaxieren und desto kleiner werden die Signale. Bei einem schnell relaxierenden Protein sollten also kürzere Mischzeiten gewählt werden. Hingegen sollten bei einem langsam relaxierenden Protein entsprechend längere

Mischzeiten gewählt werden, da ansonsten eventuell nur geringe Effekte zu beobachten sind. Für Proteine liegen die Mischzeiten typischerweise zwischen 20 und 60 ms. Da die Signalintensitäten von den Mischzeiten und Relaxationseigenschaften des Proteins abhängig sind, wurden anhand dieser die Mischzeiten verglichen. Hierbei sollte die Signalintensität der Spektren mit der CPMG-Frequenz etwa um die 50 % der Signalintensität der Referenzspektren ohne CPMG-Frequenz liegen. Hierfür wurden Spektren mit ν_{CPMG} -Frequenzen von 50 Hz bis 500 Hz bei Mischzeiten von 20 ms, 40 ms und 60 ms bei 298 K, 283 K und 275 K aufgenommen. Da die Signale bei einer Frequenz von 50 Hz die geringsten Signalintensitäten zeigen, wurden diese mit den jeweiligen Referenzspektren verglichen. In Abbildung 3.33 sind die prozentualen Signalintensitäten der Messungen mit 298 K und 275 K dargestellt. Bei 298 K lagen die Signalintensitäten der Messungen mit einer Mischzeit von 20 ms deutlich über, die mit einer Mischzeit von 40 ms leicht über und die mit einer Mischzeit von 60 ms leicht unter den 50 %. In den Messungen mit 275 K sanken die prozentualen Signalintensitäten. Hier lagen nur noch die Messungen mit einer Mischzeit von 20 ms bei ca. 50 % der Signalintensität. Die Messungen mit Mischzeiten von 40 ms bzw. 60 ms lagen deutlich darunter. Aus diesem Grund wurden für die CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente eine Mischzeit von 20 ms gewählt.

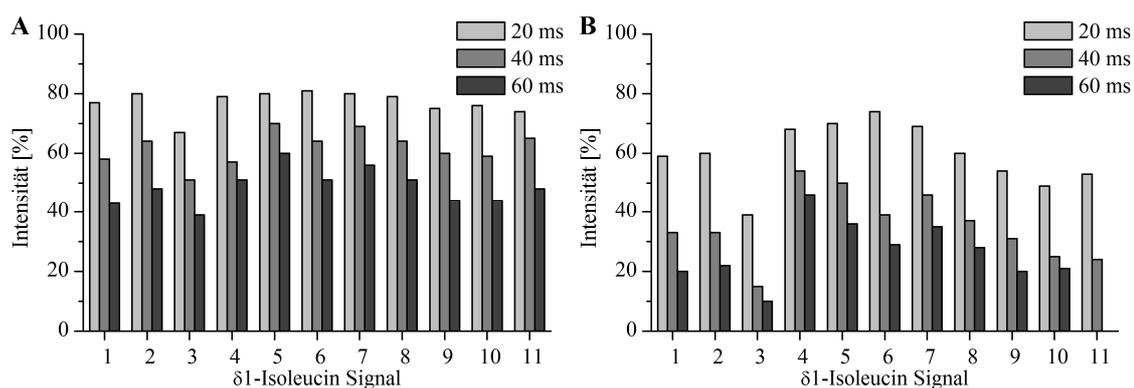


Abbildung 3.33 | Testen unterschiedlicher Mischzeiten bei (A) 298 K und (B) 275 K für CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit der GTB. Es wurden die Signalintensitäten der CPMG-Relaxations-Dispersions Methyl-TROSY-Spektren mit einer CPMG-Frequenz von 50 Hz gegenüber den Referenzspektren einer $190 \mu\text{M}$ $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB-Probe in NMR-Phosphatpuffer (D_2O) (siehe Tabelle 2.15) und $100 \mu\text{M}$ TSP- d_4 bei (A) 298 K und (B) 275 K sowie Mischzeiten von 20 ms, 40 ms und 60 ms verglichen. Gemessen wurden die Spektren an einem 500 MHz NMR-Spektrometer, alle weiteren Messparameter sind unter 2.6.8 und 3.3.7 angegeben.

Es wurden anschließend für alle drei Proben (ohne Substrat, mit UDP und mit UDP und H-Dis) CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit ν_{CPMG} -Frequenzen von 50 bis 500 Hz bei 275 K, 283 K und 298 K mit einer Mischzeit von 20 ms in Doppelbestimmung aufgenommen. Die Aufnahmeparameter waren bei allen Spektren dieselben und sind unter 2.6.8 zu finden. Einzig die Anzahl an Scans unterschied sich in den Experimenten. Die Messungen ohne Substrat wurden alle mit 16 Scans durchgeführt. Bei den Messungen mit Substrat wurde die Anzahl an Scans bei 275 K auf 48, bei 283 K auf 24, 32 bzw. 48 und bei 298 K auf 24 erhöht. Dies lag daran, dass die Signalintensität vor allem bei Zugabe von UDP deutlich geringer wurde. In Abbildung 3.34 ist eine Überlagerung der Spektren von allen drei Temperaturen mit einer ν_{CPMG} -Frequenz von 50 Hz zu sehen. Die Spektren bei 298 K und 283 K wurden mit 24

Scans aufgenommen, das Spektrum bei 275 K mit 48 Scans. Es ist deutlich zu sehen, dass je tiefer die Temperatur ist, desto geringer ist die Signalintensitäten. Dieser Effekt ist bei Ile 192 besonders groß.

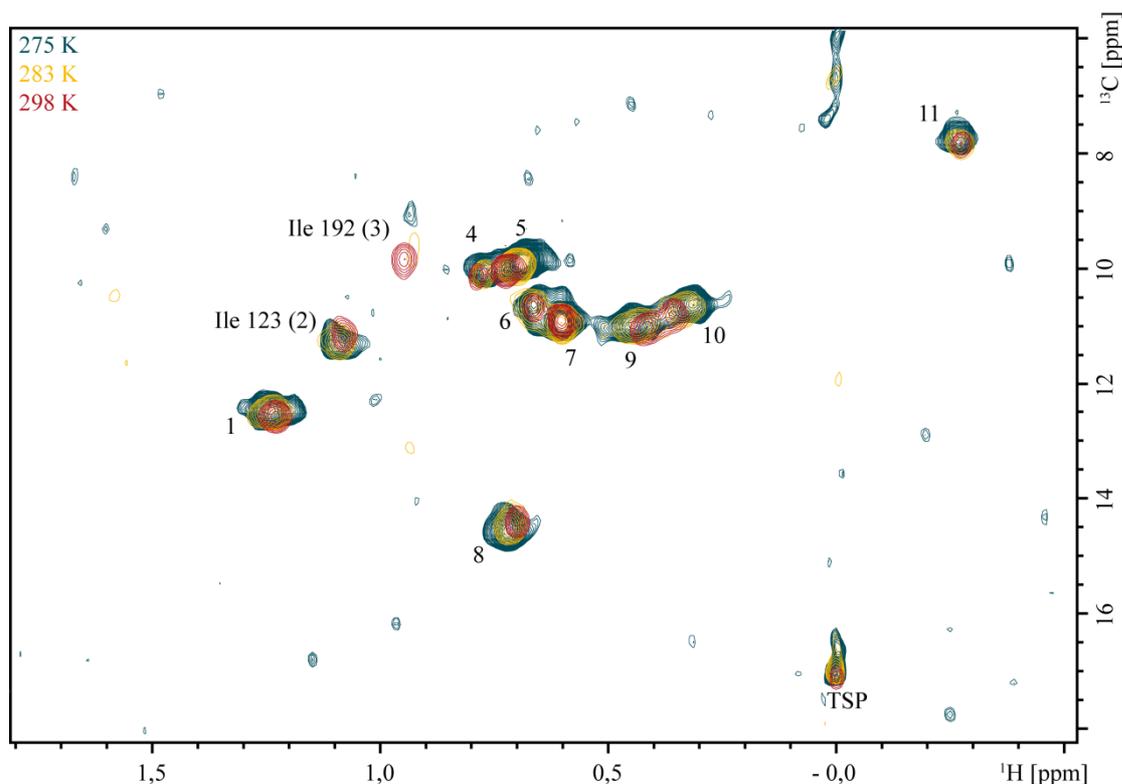


Abbildung 3.34 | CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen von $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB. Gezeigt sind CPMG-Relaxations-Dispersions Methyl-TROSY-NMR-Spektren aufgenommen bei 500 MHz mit einer ν_{CPMG} -Frequenzen von 50 Hz bei 275 K (blau), 283 K (gelb) und 298 K (rot). Es sind die $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucine einer $170 \mu\text{M}$ $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB in NMR-Phosphatpuffer (D_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit $100 \mu\text{M}$ TSP- d_4 als interne Referenz zu sehen. Die Spektren bei 283 K und 298 K wurden mit 24 Scans aufgenommen, das bei 275 K mit 48 Scans. Die Spektren wurden alle in den gleichen Ebenen geschnitten.

Eine erste Abschätzung der Daten konnte mit der Differenz der $R_2^{\text{eff}}(\nu_{\text{CPMG}})$ -Werte mit den ν_{CPMG} -Frequenzen von 50 und 500 Hz gemacht werden. In Abbildung 3.35 sind die Differenzen sowie deren Fehler ohne Substrat, mit UDP und mit UDP und H-Dis bei jeder der gemessenen Temperaturen abgebildet. Es ist deutlich zu sehen, dass fast alle ΔR_2^{eff} -Werte nahe der 0 lagen. Dies weist auf einen fehlenden Austausch in diesem Bereich hin. Zusätzlich waren die Fehler in diesem Bereich sehr groß, wodurch auch die negativen Werte zustande kamen. Einzig allein beim Ile 192 konnte eine Veränderung der ΔR_2^{eff} -Werte bei den Messungen mit den unterschiedlichen Substraten sowie Temperaturen beobachtet werden. Dieser stieg bei der Zugabe von UDP von ΔR_2^{eff} -Werten von etwa 5 s^{-1} auf ΔR_2^{eff} -Werte von etwa 40 s^{-1} an. Die Zugabe von H-Dis senkte diese Werte wieder auf etwa 5 s^{-1} ab. Dies war jedoch nur der Fall bei Temperaturen von 275 K und 283 K. Bei 298 K blieben die ΔR_2^{eff} -Werte konstant bei etwa 5 s^{-1} . Dies bedeutet, dass das Ile 192 durch Zugabe von UDP bei niedrigen Temperaturen eine

signifikante Veränderung in der Dynamik erfährt. Für weitere Auswertungen wurden anschließend alle $R_2^{\text{eff}}(V_{\text{CPMG}})$ -Werte berechnet, die Mittelwerte sowie Fehler bestimmt und mittels GUARDD (Kleckner and Foster 2011) die Dispersionsprofile dargestellt.

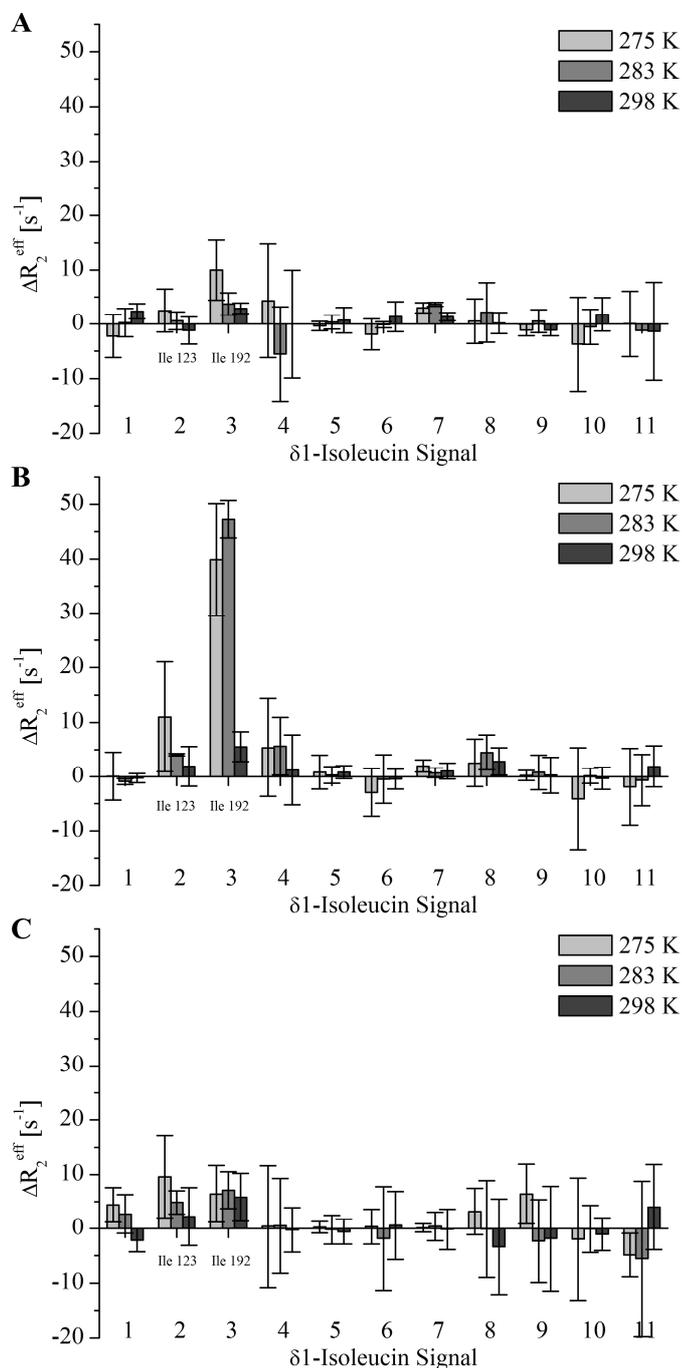


Abbildung 3.35 | Methyl-TROSY CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB. Dargestellt sind die $\Delta R_2^{\text{eff}} = R_2^{\text{eff}}(V_{\text{CPMG } 50 \text{ Hz}}) - R_2^{\text{eff}}(V_{\text{CPMG } 500 \text{ Hz}})$ Werte der Messungen mit $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB (A) ohne, (B) mit UDP sowie (C) mit UDP und H-Disaccharid bei 275 K, 283 K und 298 K. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung an einem 500 MHz NMR-Spektrometer durchgeführt.

In Abbildung 3.36 sind die Dispersionsprofile der beiden zugeordneten Signale Ile 123 und Ile 192, sowie von Signal 8 dargestellt. Alle weiteren Dispersionsprofile befinden sich im Anhang (0). Auch hier ist deutlich zu sehen, dass sich die Dynamik von Ile 192 durch Zugabe von UDP bei niedrigen Temperaturen stark verändert. Auch Ile 123 erfährt bei Zugabe von UDP eine leichte Veränderung, jedoch sind hier die Fehler zu groß, um eine genauere Aussage treffen zu können. Aus den Dispersionsprofilen kann auch gesehen werden, dass R_2^0 mit tieferen Temperaturen ansteigt. Bei der Abbildung ist jedoch zu beachten, dass die abgebildeten Linien nur den Verlauf der Kurven wiedergeben sollten. Für eine Erhebung der Austauschraten, Populationen sowie chemischen Verschiebungsdifferenzen waren die Daten nicht aussagekräftig genug. Auch wurde von einer Messung bei einer weiteren Feldstärke abgesehen.

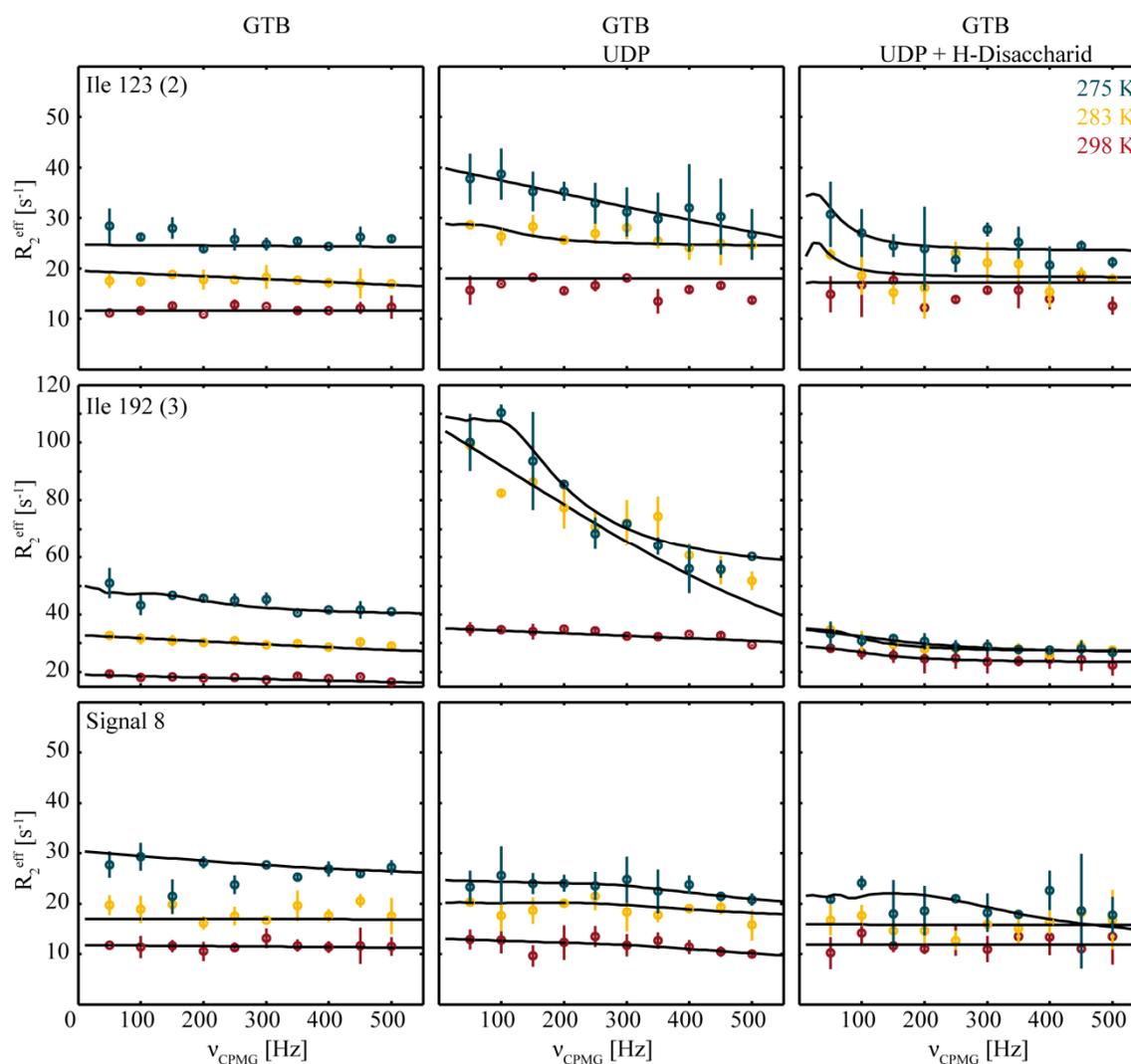


Abbildung 3.36 | Relaxations-Dispersionsprofile von GTB in Abhängigkeit von Substraten. Es wurden Methyl-TROSY CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB bei einer Feldstärke von 500 MHz, ν_{CPMG} -Frequenzen von 50 bis 500 Hz und 275 K (blau), 283 K (gelb) sowie 298 K (rot) durchgeführt. Gezeigt sind die Dispersionsprofile von Signal 2 (Ile 123) (obere Reihe), Signal 3 (Ile 192) (mittlere Reihe) und Signal 8 (untere Reihe) ohne (links), mit UDP (mitte) sowie mit UDP und H-Disaccharid (rechts). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der doppeltbestimmten Messwerte an. Es ist zu beachten, dass die abgebildeten Linien nur den Verlauf der Messwerte darstellen, da diese für eine Erhebung weiterer Daten nicht aussagekräftig genug waren. Die Darstellung erfolgte mit GUARDD (Kleckner and Foster 2011).

3.3.8 Strukturelle Untersuchungen an der GTB mit Lanthanoiden

Eine weitere Methode Struktur und Dynamik von Biomolekülen zu untersuchen, ist die Anwendung von paramagnetischer NMR-Spektroskopie. Dafür notwendig ist eine Bindungsstelle für das paramagnetische Metallion und eine dreidimensionale Struktur des Proteins für theoretische Berechnungen. Da die GTB über eine natürliche Metallbindungsstelle verfügt und verschiedene Kristallstrukturen vorhanden sind, sollte in dieser Arbeit getestet werden ob, es Möglich ist, mittels paramagnetischer NMR-Spektroskopie weitere Information über die GTB zu erhalten. Hierbei bieten sich die Methyl-TROSY-Experimente gut an, da diese sehr sensitiv sind und intensive Signale liefern. Es sollten verschiedene paramagnetische Metallionen getestet werden. Verwendet wurden drei Metallionen aus der Familie der Lanthanoide. Gadolinium (Gd^{3+}), welches nur PREs liefert und keine PCSs, Ytterbium (Yb^{3+}) und Dysprosium (Dy^{3+}). Die letzten beiden liefern sowohl PREs als auch PCSs, unterscheiden sich aber in der Reichweite der PREs sowie im Vorzeichen des magnetischen Tensors. Als Referenz wurde das diamagnetische Lanthan (La^{3+}) verwendet.

Ob die hier verwendeten Lanthanoide an die GTB binden, wurde mit Aktivitätstests und SPR-Spektroskopie untersucht. Zuerst wurden die Aktivitäten wie unter 2.3.4 beschrieben gemessen. Hierfür wurde die GTB, die freundlicherweise von A. Mallagaray (Institut für Chemie) zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. Diese besaß eine spezifische Aktivität von 12,3 U/mg. Da die Probe noch Mn^{2+} enthielt, wurde diese mit 10 mM EDTA versetzt, um die vorhandenen Metallionen zu binden und anschließend wurde der Puffer gegen MOPS/- Puffer mit 1 mM DTT ausgetauscht. Die Konzentration der Probe betrug 3 mg/ml und wies das Verhältnis A_{260}/A_{280} von 0,54 auf, was auf eine reine Probe hinwies. Für die Aktivitätstests wurde 10 x A/B-Puffer mit $MnCl_2$, $MgCl_2$, $LaCl_3$, $DyCl_3$, $GdCl_3$, $YbCl_3$ sowie einer ohne Metallion (H_2O) und einer ohne Metallion und EDTA ($H_2O/EDTA$) hergestellt und die GTB-Probe entsprechend damit verdünnt und mit GTB-Stockmix versetzt. Die Verdünnungen sowie gemessenen spezifischen Aktivitäten sind im Anhang in Tabelle 6.6 aufgeführt. Die spezifische Aktivität mit Mn^{2+} betrug 13,2 U/mg und war damit vergleichbar mit der spezifischen Aktivität vor Austausch des Puffers. Enthielt die Probe Mg^{2+} statt Mn^{2+} sank die spezifische Aktivität auf 0,9 U/mg und betrug 7 % der ursprünglichen spezifischen Aktivität. Überraschenderweise zeigte die GTB-Probe mit H_2O ebenfalls eine spezifische Aktivität zwischen 0,1 und 1,9 % abhängig von der eingesetzten Verdünnung. Erst durch Zugabe von EDTA fand keine Übertragung der Galactoseeinheit statt. Daher wurde vermutet, dass entweder in der GTB-Probe noch Metallionen vorhanden waren oder die im Wasser enthaltenden Metallionen für eine messbare Aktivität ausreichten. Die maximale spezifische Aktivität der Lanthanoide lag bei der GTB-Probe mit Dysprosium bei 0,15 U/mg und damit bei 1,2 % der spezifischen Aktivität der GTB-Probe mit Mn^{2+} . Alle anderen zeigten geringere bis gar keine Aktivität. Da die gemessenen Zerfallsraten jedoch unter den 10 % der maximalen Aktivität der angesetzten Probe lagen und auch bei geringeren Verdünnungen nicht anstiegen, kann davon ausgegangen werden, dass die GTB mit den hier getesteten Lanthanoide keine Aktivität aufweist. Um auszuschließen, dass der pH-Wert der Probe in einen Bereich rutscht in dem die GTB nicht aktiv ist, wurde der pH-Wert der verwendeten Puffer gemessen. Diese wiesen pH-Werte zwischen 6,52 und 6,7 bei

22 °C auf. Somit kann eine Inaktivität aufgrund des pH-Wertes ausgeschlossen werden, da das Aktivitätsmaximum der GTB bei einem pH-Wert von 6,5 bei 37 °C liegt. Da bei der Aktivität die Übertragung der Galactoseeinheit gemessen wird heißt das nicht, dass keine Bindung der Lanthanoide an GTB stattfindet. Daher wurden SPR-Experimente mit UDP in Anwesenheit der vier Lanthanoide angeschlossen.

Für die SPR-Experimente wurde ein bereits mit GTB belegter CM5-Sensorchip (Chip 5, siehe Tabelle 2.10) verwendet. Dieser wurde von F. Flügge (Institut für Chemie) zur Verfügung gestellt und mit einer GTB Dichte von 4190 RU belegt (Flügge 2014). Als Referenz wurde eine leere Zelle verwendet. Als Laufpuffer wurde MOPS/Ln³⁺ (siehe Tabelle 2.9) mit dem jeweiligen Lanthanoid verwendet. Zwischen den Messungen wurde das System mit 10 mM EDTA in MOPS/- Puffer und mit MOPS/- Puffer gespült, um sicher zu gehen, dass alle Metallionen entfernt wurden. UDP wurde ebenfalls in den entsprechenden MOPS/Ln³⁺ Puffer gelöst und je 20 µl von Konzentrationen zwischen 5 µM und 1 mM injiziert. In Abbildung 3.37 sind die Sensorgramme von je einer Messung der dreifach-Bestimmung dargestellt. Bei allen vier verschiedenen Lanthanoiden konnte die Bindung von UDP gemessen werden. Allerdings unterscheiden sich die Sensorgramme deutlich von den Messungen von UDP mit Mg²⁺ bzw. Mn²⁺. Bei keiner Messung konnte eine Rechteckkurve beobachtet werden und die Basislinie stieg bei allen Messungen kontinuierlich an. Besonders auffällig sind die Bindungskurven mit Ytterbium als Metallion. Diese zeigten zwar ein für Konzentrationsreihen typisches Verlaufsmuster, jedoch in den negativen Bereich. Woran dies lag und warum dies nur bei den Messungen mit Ytterbium der Fall war, kann hier nicht weiter gesagt werden. Für die anderen drei Messungen wurden die Bindungsisothermen erstellt, um eine Idee der Bindung von UDP in Anwesenheit der verschiedenen Lanthanoide zu bekommen. Diese sind in Abbildung 3.38 dargestellt. Die maximalen theoretischen Antworten sollten etwa 50 RU annehmen.

Bei den Messungen mit Lanthan wurden für die Bestimmung der Dissoziationskonstante nur die ersten beiden Messungen berücksichtigt, da die dritte Messung sehr stark von den vorangegangenen abwich. Der K_D- Wert beträgt 64 ± 26 µM und der maximale RU-Wert liegt mit 17 RU deutlich unter dem erwarteten. Die Messungen mit Gadolinium zeigen einen K_D-Wert von 1,7 ± 0,5 mM. Hier liegt der maximale RU-Wert mit 308 RU deutlich über dem theoretischen Wert und weist auf unspezifische Bindung hin. Dies ist auch der Fall bei den Messungen mit Dysprosium mit einem maximalen RU-Wert von 87 RU. Die Dissoziationskonstante beträgt 361 ± 106 µM. Wurden nur die ersten sechs Konzentrationen berücksichtigt sank der K_D-Wert auf 16 ± 3 µM und der maximale RU-Wert auf 22 RU. Bei allen drei Bindungsisothermen ist deutlich zu erkennen, dass je höher die UDP-Konzentrationen waren, der Fehler immer größer wurde. Schlussendlich konnten diese Messungen keinen Aufschluss über die Bindungskonstanten geben, jedoch weisen sie darauf hin, dass eine Bindung von UDP an die GTB auch in Anwesenheit der hier verwendeten Lanthanoide stattfindet.

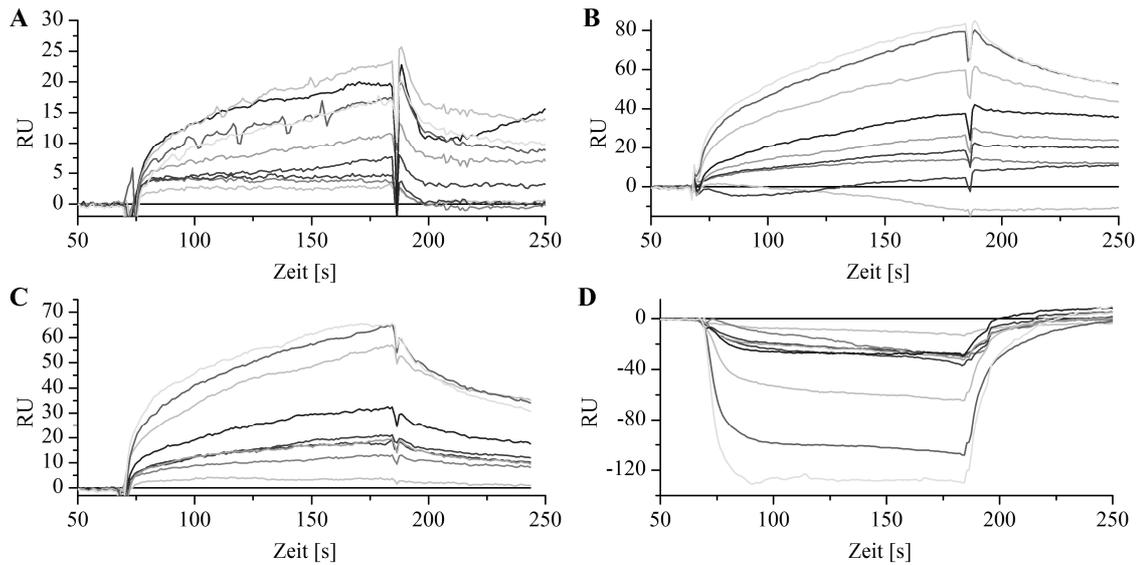


Abbildung 3.37 | Sensorgramme der Bindung von UDP an immobilisierte GTB in Anwesenheit verschiedener Lanthanoide. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM LaCl₃ (A), GdCl₃ (B), DyCl₃ (C) und YbCl₃ (D) mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 5) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP Konzentrationen von 5 µM bis 1 mM durchgeführt.

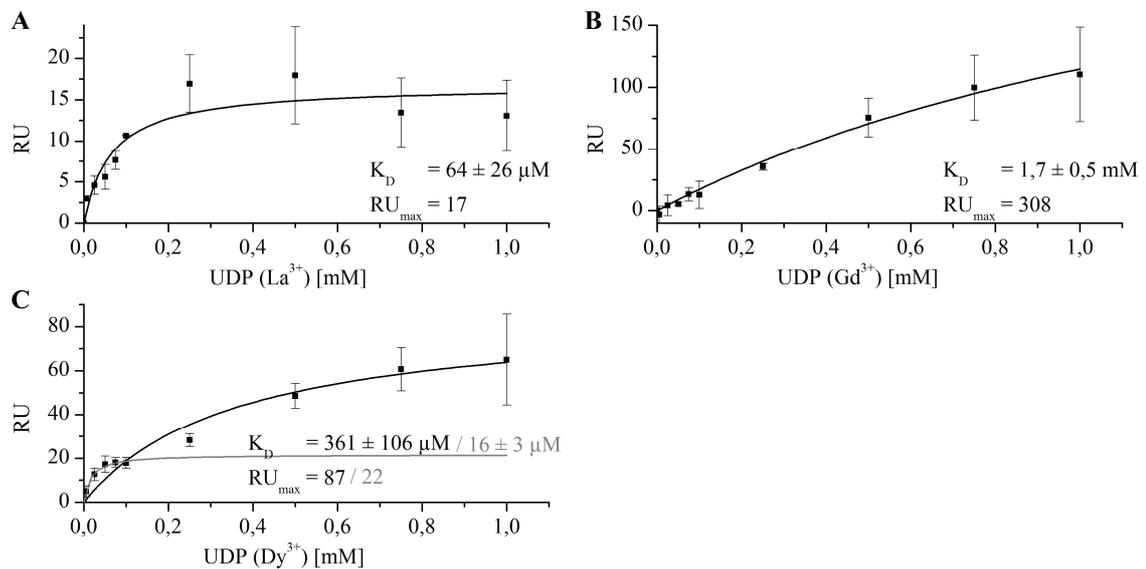


Abbildung 3.38 | Bindungsisotherme der Bindung von UDP an immobilisierte GTB in Anwesenheit verschiedener Lanthanoide. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM LaCl₃ (A), GdCl₃ (B) und DyCl₃ (C) mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 5) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP Konzentrationen von 5 µM bis 1 mM durchgeführt. Für die Messungen mit La³⁺ (A) wurden nur die ersten beiden Bestimmungen berücksichtigt. In den jeweiligen Graphen sind die Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximale Antwort RU_{max} angegeben. Bei den Messungen mit Dy³⁺ (C) wurden zusätzlich nur die ersten sechs Werte gefittet (grau).

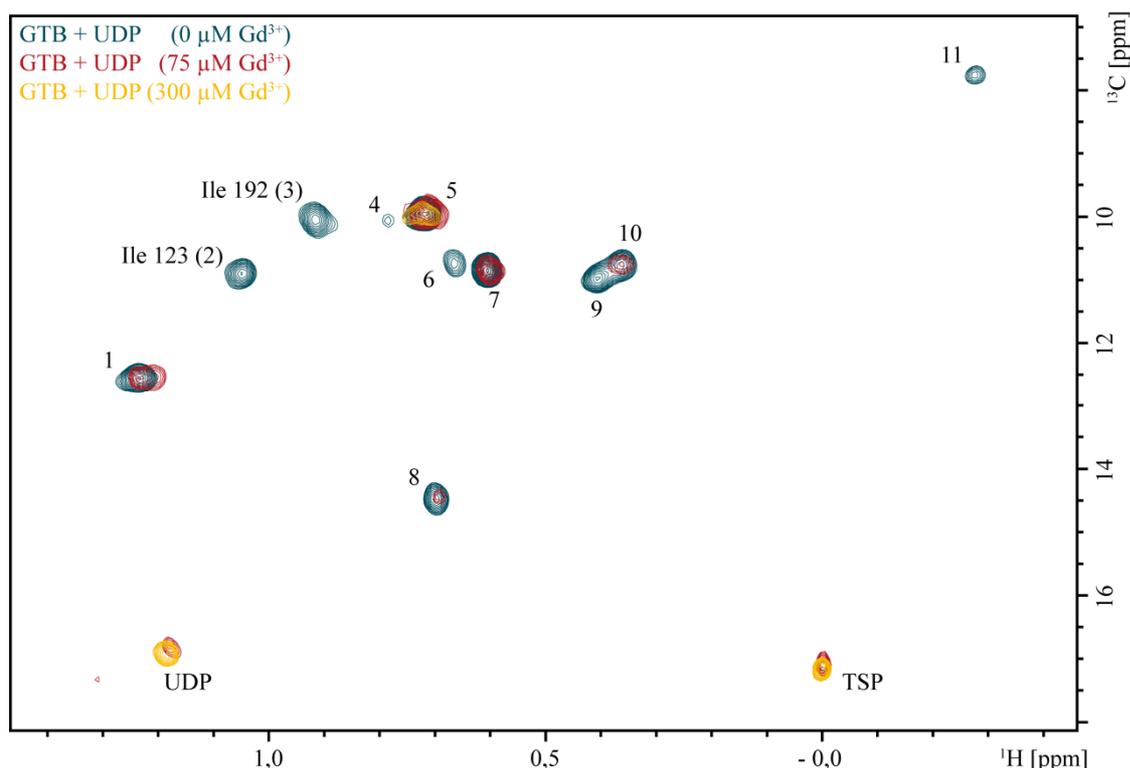


Abbildung 3.39 | Titration von $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB mit GdCl_3 . Die NMR-Probe enthielt $100 \mu\text{M}$ $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB in Bis-Tris- d_{19} (pH 6,7 bei 25°C), 40 mM NaCl, $0,8 \text{ mM}$ 2-Mercaptoethanol- d_6 , $100 \mu\text{M}$ TSP- d_4 sowie $6,5 \text{ mM}$ UDP. Es wurden Methyl-TROSY-NMR-Spektren mit steigenden GdCl_3 -Konzentrationen aufgenommen und die Linienbreiten extrahiert. Alle Aufnahmeparameter sowie Titrationsschritte sind unter 2.6.9 angegeben. Gezeigt sind die Spektren ohne GdCl_3 (blau), mit $75 \mu\text{M}$ GdCl_3 (rot) und $300 \mu\text{M}$ GdCl_3 (gelb).

Mit $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB wurden anschließend NMR-spektroskopische Untersuchungen der vier Lanthanoiden durchgeführt. Hierfür wurden $100 \mu\text{M}$ der $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB-Probe (3) in Bis-Tris- d_{19} (pH 6,7 bei 25°C), 40 mM NaCl, $0,8 \text{ mM}$ 2-Mercaptoethanol- d_6 , $100 \mu\text{M}$ TSP- d_4 sowie $6,5 \text{ mM}$ UDP verwendet und schrittweise LaCl_3 , GdCl_3 , DyCl_3 oder YbCl_3 versetzt. Die Titrationslösung enthielt die gleiche Menge an Protein und UDP wie die NMR-Probe, damit wurde gewährleistet, dass der Proteingehalt in jedem Spektrum vergleichbar blieb. Da es bei Anwesenheit von Gadolinium abstandsabhängig zur Verbreiterung der Signale kommt, wurde in diesen Spektren bei jeder Konzentration mit CCPNmr Analysis 2.3.1 (Vranken, Boucher et al. 2005) die Linienbreiten der Signale extrahiert. In Abbildung 3.39 sind drei Methyl-TROSY-NMR-Spektren der Titration abgebildet. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass abhängig von der Konzentration Signale aufgrund der verbreiterten Linien nicht mehr detektierbar sind. Da die Linienverbreiterung, die durch Bindung von UDP bei steigender Metallionenkonzentration entsteht, berücksichtigt werden musste, wurden die Methyl-TROSY-NMR-Spektren mit Lanthan als Referenz hinzugezogen. Hier wurde ebenfalls die Linienbreite extrahiert und die Differenz der Linienbreiten beider Metallionen gebildet. Anhand dieser sowie das Verschwinden der Signale wurde eine abstandsabhängige Zuordnung der Signale gemacht. In Tabelle 6.7 sind die jeweiligen Differenzen sowie die Konzentration bei der das jeweilige Signal verschwindet angegeben. Aus

der Kristallstruktur von GTB mit UDP und Mn^{2+} (PDB ID 2RIX) (Alfaro, Zheng et al. 2008) wurde jeweils der Abstand vom $\delta 1$ -Kohlenstoff zum Mn^{2+} -Ion bestimmt und anhand dieser Abstände und der Daten aus der Titration eine vorläufige Zuordnung der Ile-Signale gemacht. Diese ist in Tabelle 3.9 angegeben.

Tabelle 3.9 | Abstandsabhängige Zuordnung der Ile ^{$\delta 1$} -Methylgruppen der GTB. Angegeben sind jeweils die Ile-Methylgruppen, der Abstand vom $\delta 1$ -Kohlenstoff zum Mn^{2+} -Ion und die aus Titration von $u\text{-}^2H, ^{15}N, \{Ile\delta 1\text{-}^{13}CH_3\}$ -markierter GTB mit $GdCl_3$ ermittelte Zuordnung der Signale. Die Abstände wurden aus der Kristallstruktur von GTB mit UDP/ Mn^{2+} (PDB ID: 2RIX) (Alfaro, Zheng et al. 2008) ermittelt. Für das Ile 59 war in der Kristallstruktur keine Elektronendichte vorhanden. Die Nummerierung der Signale kann aus Abbildung 3.39 entnommen werden. Es ist zu beachten, dass dies nur eine vorläufige Zuordnung ist. Diese wurde anhand von PREs ermittelt, die Daten sind im Anhang (siehe Tabelle 6.7) zu finden.

	Abstand C ^{$\delta 1$} -Mn ²⁺ [Å]	Zuordnung Signal #
Ile 192	13,6	3
Ile 123	13,7	2
Ile 224	16,6	9
Ile 256	20,2	6
Ile 116	22,4	8
Ile 94	22,8	7
Ile 296	23,4	10
Ile 102	24,9	1
Ile 104	33,9	5
Ile 59	-	11

Für das Signal Ile 59 konnte kein Abstand gemessen werden, da keine Elektronendichte in der Kristallstruktur vorhanden war. Es wurde jedoch vermutet, dass es sich bei Signal #11 aufgrund der charakteristischen chemischen Verschiebung um das Ile 59 handelt, welches sich am N-Terminus des Proteins befindet. Signal #2 verschwand direkt nach Zugabe von 25 μM $GdCl_3$ und befindet sich somit am nächsten am Metallion welches laut Kristallstruktur das Ile 192 ist. Dieses Signal wurde jedoch bereits durch selektive Mutation dem Ile 123 zugeordnet. Da es sich bei dem Ile 192 um einen Aminosäurerest im internen Loop handelt, der sich bei Bindung von UDP bewegt, entsprach der gemessene Abstand vermutlich nicht der Realität. Außerdem unterscheidet er sich mit 13,6 Å kaum vom Abstand des Ile 123 mit 13,7 Å. Daher wurde dieses Signal dem Ile 123 zugeordnet. Es ist anzumerken, dass es sich bei dieser Zuordnung um eine vorläufige Zuordnung handelt, die durch weitere Experimente bestätigt werden sollte. Neben der Zuordnung von Ile 123 und Ile 192 kann die Zuordnung von Signal #5 als korrekt betrachtet werden. Signal #5 ist das einzige Signal, welches bei der höchsten $GdCl_3$ -Konzentration noch zu sehen ist und konnte daher dem Ile 104 zugeordnet werden, welches am weitesten vom Metallion entfernt liegt. Um die Zuordnung zu bestätigen, sollten weitere Titrations mit Dysprosium und Ytterbium durchgeführt werden. Diese weisen neben einen PRE-Effekt auch PCSs auf, wodurch die räumliche Orientierung der Ile ^{$\delta 1$} -Methylgruppen in Abhängigkeit des Metallions ermittelt werden können.

In Abbildung 3.40 und Abbildung 3.41 ist jeweils das Anfangs- und Endspektrum der Titration mit Dysprosium und Ytterbium gezeigt. Es war nicht möglich aus diesen Spektren PCSs zu

extrahieren, da aus einem Signal durch Zugabe des Lanthanoids mehrere Signale wurden. Dies war vor allem bei Dysprosium sehr deutlich zu erkennen. Daher konnte vermutet werden, dass sowohl Dysprosium als auch Ytterbium die GTB in der Metallionenbindungsstelle in unterschiedlichen Konformationen gebunden hat und diese Methode daher für eine Zuordnung nicht geeignet war. Für die Zuordnung mittels Gadolinium sollten die unterschiedlichen Konformationen jedoch keinen Einfluss auf die entstandenen PREs haben.

Zum Abschluss ist anzumerken, dass obwohl die GTB bereits eine Metallionenbindungsstelle besitzt, Untersuchungen mit Lanthanoiden nicht zu empfehlen sind. Zum einem war keine Aktivität der GTB vorhanden, zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Lanthanoide in unterschiedlichen Konformationen binden, was es nicht möglich macht, mit diesen NMR-spektroskopisch zu arbeiten.

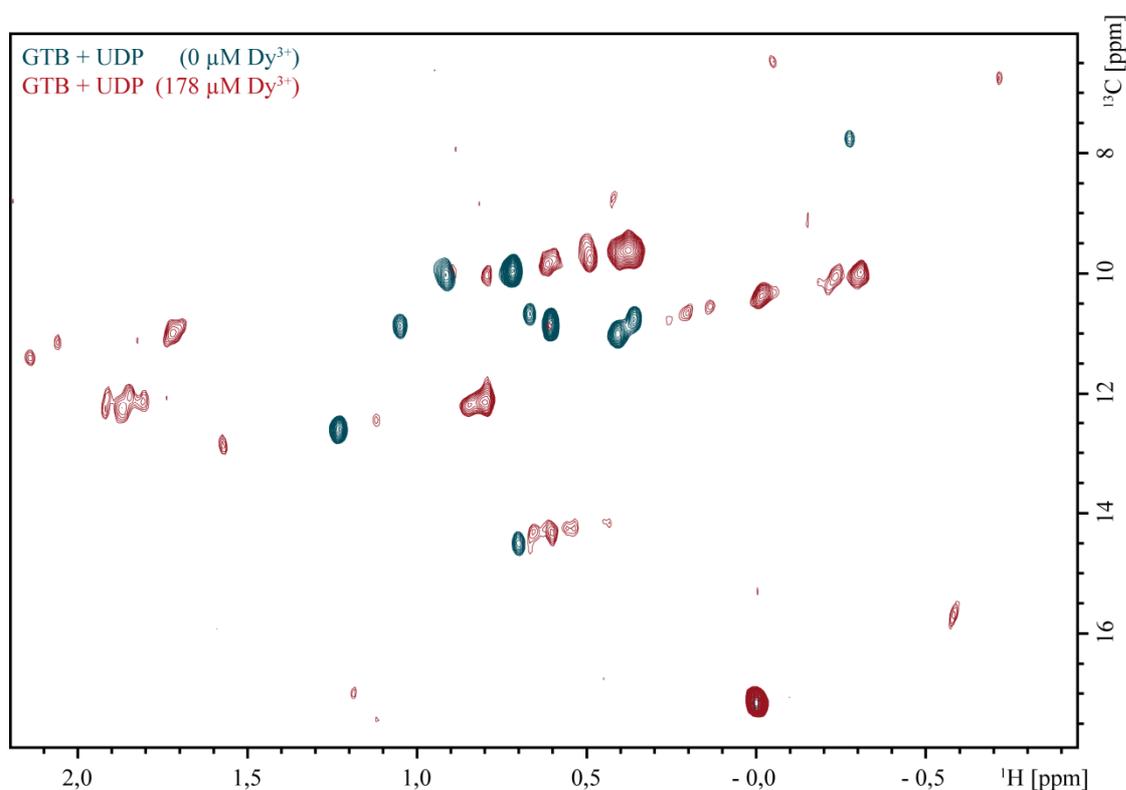


Abbildung 3.40 | Titration von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB mit DyCl_3 . Die NMR-Probe enthielt $100\ \mu\text{M}$ $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB in Bis-Tris- d_{19} (pH 6,7 bei $25\ ^\circ\text{C}$), $40\ \text{mM}$ NaCl, $0,8\ \text{mM}$ 2-Mercaptoethanol- d_6 , $100\ \mu\text{M}$ TSP- d_4 sowie $6,5\ \text{mM}$ UDP. Es wurden Methyl-TROSY-NMR-Spektren mit steigenden DyCl_3 -Konzentrationen aufgenommen und die Linienbreiten extrahiert. Alle Aufnahmeparameter sowie Titrationsschritte sind unter 2.6.9 angegeben. Gezeigt sind die Spektren ohne DyCl_3 (blau) und mit $178\ \mu\text{M}$ DyCl_3 (rot).

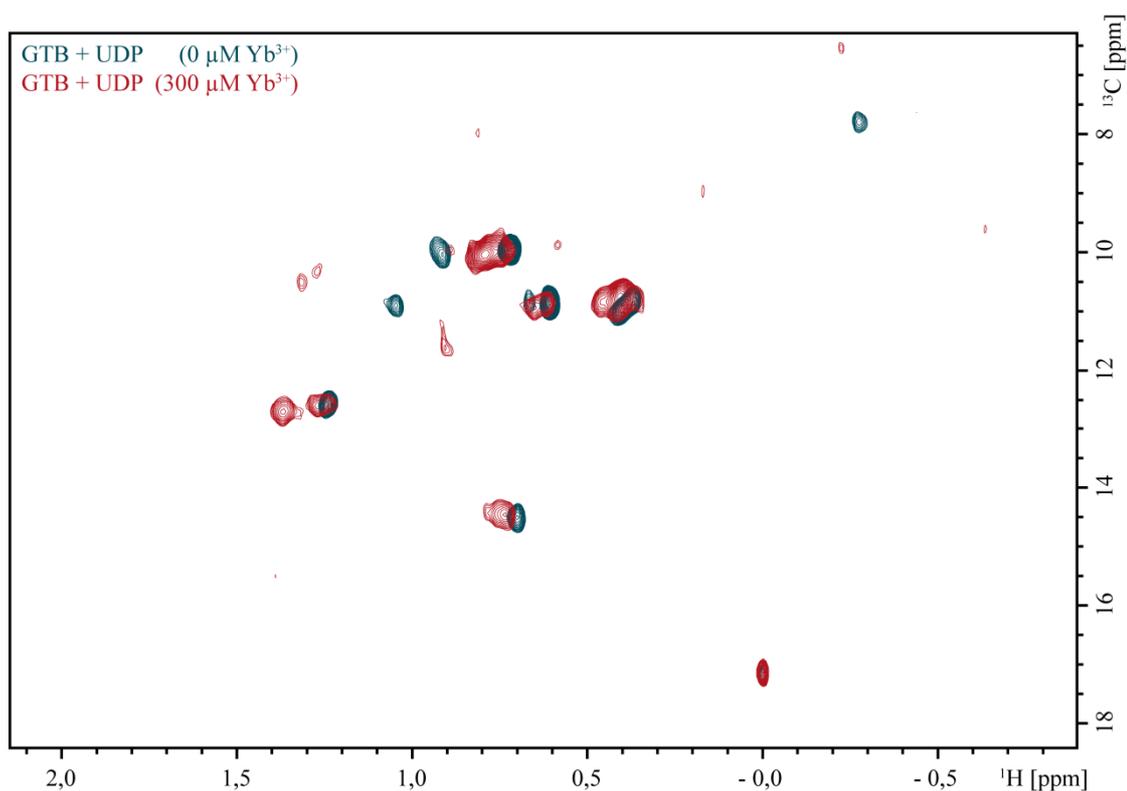


Abbildung 3.41 | Titration von $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB mit YbCl_3 . Die NMR-Probe enthielt 100 μM $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB in Bis-Tris- d_{19} (pH 6,7 bei 25 $^\circ\text{C}$), 40 mM NaCl, 0,8 mM 2-Mercaptoethanol- d_6 , 100 μM TSP- d_4 sowie 6,5 mM UDP. Es wurden Methyl-TROSY-NMR-Spektren mit steigenden YbCl_3 -Konzentrationen aufgenommen und die Linienbreiten extrahiert. Alle Aufnahmeparameter sowie Titrationsschritte sind unter 2.6.9 angegeben. Gezeigt sind die Spektren ohne YbCl_3 (blau) und mit 178 μM YbCl_3 (rot).

3.4 Charakterisierung der strukturellen Dynamik der West-Nil-Virus Protease

Neben den NMR-spektroskopischen Untersuchungen der GTB sollte in dieser Arbeit auch die West-Nil-Virus Protease untersucht werden. Da auch hier die δ 1-Methylgruppen der Isoleucinseitenketten ein gutes Gesamtbild der Protease widerspiegeln, wurden diese hier ebenfalls spezifisch markiert und die Dynamik mittels CPMG-Relaxations-Dispersions Experimenten untersucht. Dabei wurden zusätzlich die Änderungen in der Dynamik bei Bindung zweier bekannter Inhibitoren untersucht.

3.4.1 Präparation isotopenmarkierter West-Nil-Virus Protease

Für Untersuchungen an der WNV-Protease wurden drei $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierte WNV-Protease-Präparationen nach Protokoll von Tugarinov et al. (Tugarinov, Kanelis et al. 2006) hergestellt. Für WNV-Protease (1) wurde der pQE60-Vektor und für WNV-Protease (2) und (3) der pET22b-Vektor verwendet. Genauere Beschreibungen der Vektoren sind unter 2.2.1 zu finden. Für die Präparation der WNV-Protease (1) und (2) wurden die *E. coli* Kulturen bei 37 °C wachsen gelassen, bei der Präparation der WNV-Protease (3) wurde die Temperatur nach der Induktion auf 17 °C herunter gestellt und die Zellen wachsen gelassen, bis diese die stationäre Phase erreicht hatten. Mit der WNV-Protease (1) wurden alle Testmessungen mit den Inhibitoren sowie für die Testmessungen für die CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente gemacht. Die WNV-Protease Präparationen (2) und (3) wurden für die CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente bei 500 MHz und 700 MHz verwendet.

Die Synthese fand analog zu der von GTB in Minimalmedium statt. Neben Salzen, Vitaminen und Antibiotika diente ^{15}N -Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle und $u\text{-}^2\text{H}$ -Glucose als Kohlenstoffquelle. Zusätzlich enthielten alle Ansätze 20 % eines kommerziell erhältlichen $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -markierten reichhaltigen Mediums. Dies besteht hauptsächlich aus Aminosäuren und sollte die Proteinausbeute steigern. Alle Präparationen wurden wie unter 2.2 angegeben in *E. coli* synthetisiert und mittels Säulenchromatographie in einem ÄKTA-System gereinigt. Die Qualität der Präparationen wurde mit SDS-PAGE (siehe 2.3.1) überprüft. Der Proteingehalt wurde mit dem NanoDrop Spektralphotometer (siehe 2.3.2) bestimmt. Anschließend wurden die WNV-Protease Präparationen konzentriert und gegen entsprechenden NMR-Probenpuffer ausgetauscht.

Die Ausbeute von WNV-Protease (1) war mit 1,6 mg pro 100 ml Kultur etwa halb so hoch wie die der GTB mit gleicher Markierung. Für die Herstellung der WNV-Protease (2) wurde anstelle eines pQE60-Vektors ein pET22b-Vektor verwendet, hier betrug die Ausbeute nur 1,5 mg pro 300 ml Kultur. In Abbildung 3.42 ist sowohl das Profil, als auch die SDS-PAGE des zweiten Reinigungsschrittes mittels einer Größenausschlusschromatographie dargestellt. Es sind deutlich zwei Fraktionen zu sehen. Laut SDS-PAGE war in beiden Fraktionen WNV-Protease vorhanden, in Fraktion 1 befanden sich jedoch noch weitere Proteine. Da vermutet wurde, dass sich die WNV-Protease in bakteriellen Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) aggregierte, wurde die Temperatur bei der Präparation der WNV-Protease (3) nach der Induktion auf 17 °C

herabgesetzt. Die Ausbeute lag bei 9,4 mg pro 500 ml Kultur und war vergleichbar mit der Ausbeute der WNV-Protease (1). In Abbildung 3.42 ist ebenfalls das Profil und die SDS-PAGE des zweiten Reinigungsschrittes dargestellt. Hier ist zu sehen, dass die Größe der ersten Fraktion deutlich reduziert ist, was darauf schließen lässt, dass die Induktion bei niedrigerer Temperatur die Bildung von *inclusion bodies* verringert. Zukünftige Präparationen der WNV-Protease sollten nach der Induktion bei niedrigen Temperaturen (hier 17 °C) durchgeführt werden.

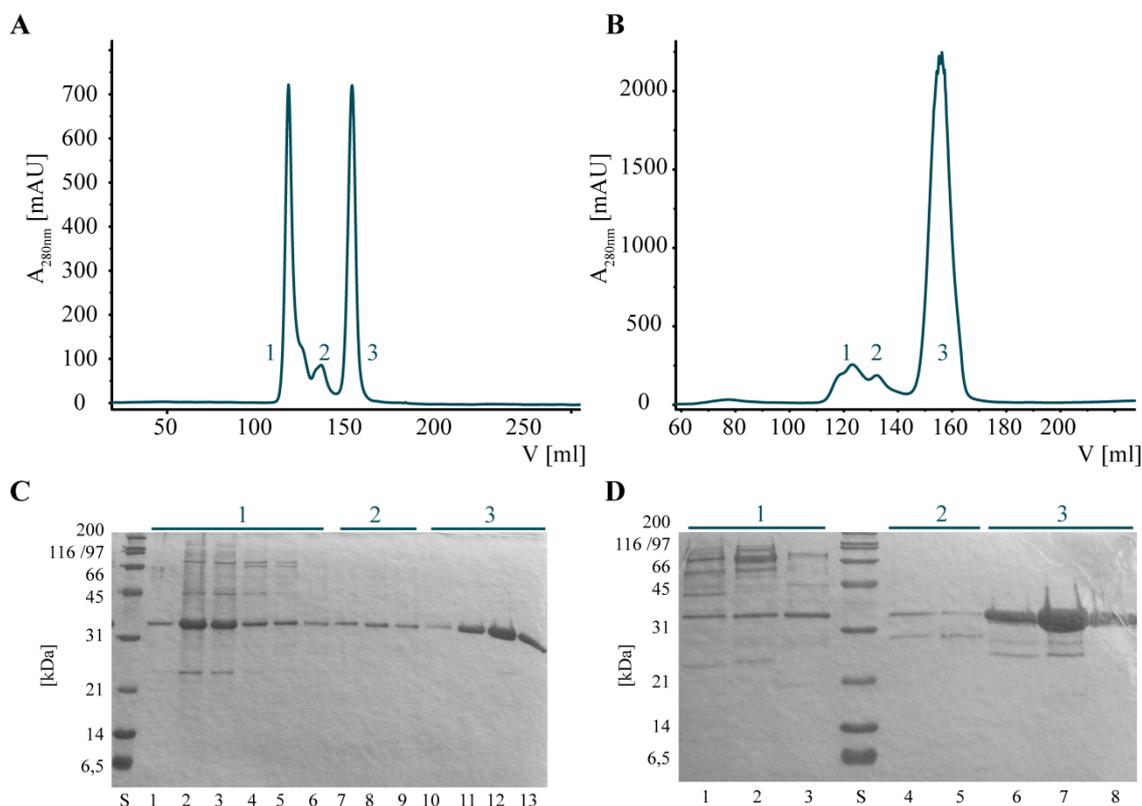


Abbildung 3.42 | Absorptionsspektrum und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie von isotopenmarkierter WNV-Protease. Dargestellt ist der Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierte WNV-Protease bei Temperaturen nach der Induktion von (A,C) 37 °C und (B,D) 17 °C. In (A) und (B) sind jeweils die Absorptionsspektren im Bereich der Elution der Proteinfractionen zu sehen, in (C) und (D) die dazugehörigen 15 %igen SDS-Gele. Aufgetragen wurden je 13 μl (C) bzw. 30 μl (D) unterschiedlicher Fraktionen in reduzierendem Probenpuffer sowie 7 μl eines Protein-Standards (S). Die Banden der jeweiligen Signale sind entsprechend gekennzeichnet. Die Proteinbande der WNV-Protease mit einem Molekulargewicht von 26,5 kDa liegt etwas oberhalb der 31 kDa Bande.

In Abbildung 3.43 sind die eindimensionalen Protonenspektren aller drei $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Proteasen dargestellt. Da die Spektren in deuterierten Puffer gemessen wurden, sollten keine Amidprotonen des Proteinerückgrats sichtbar sein. Da diese aber bei allen dreien noch erkennbar sind, kann davon ausgegangen werden, dass hier noch nicht der komplette Austausch der Amidprotonen gegen Deuterium stattgefunden hat. Jedoch sind im Bereich zwischen 1,5 und -0,5 ppm deutlich die selektiv markierten Signale der $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucine zu sehen. In Abbildung 3.44 ist ein Methyl-TROSY-Experiment

der WNV-Protease (1) gezeigt. Die WNV-Protease besitzt elf Isoleucine, davon 3 in NS2B und 8 in NS3. Besonders interessant ist das Ile 68 der NS2B-Domäne, da dieses im Scharnier zwischen der offenen und geschlossenen Konformation sitzt. Von den erwarteten elf Signalen sind neun deutlich zu erkennen, sowie ein Signal, das sehr schwach ist. Dieses Signal, sowie das fehlende Signal, hatten vermutlich eine sehr große Linienbreite und waren daher nicht bzw. nur schwer in den Spektren detektierbar. Dies ist auch für die Amidprotonen des Rückgrades beschrieben (Ekonomiuk, Su et al. 2009). Durch Zugabe eines WNV-Protease Inhibitors wurden die Linienbreiten der Signale sowie die Überlagerung dieser im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum geringer. Daher ist zu vermuten, dass auch hier bei Zugabe dieses Inhibitors sich die Linienbreite verringert und alle Signale sichtbar werden. Diese Experimente sowie weitere allgemeine Untersuchungen werden im Folgenden Kapitel genauer beschrieben.

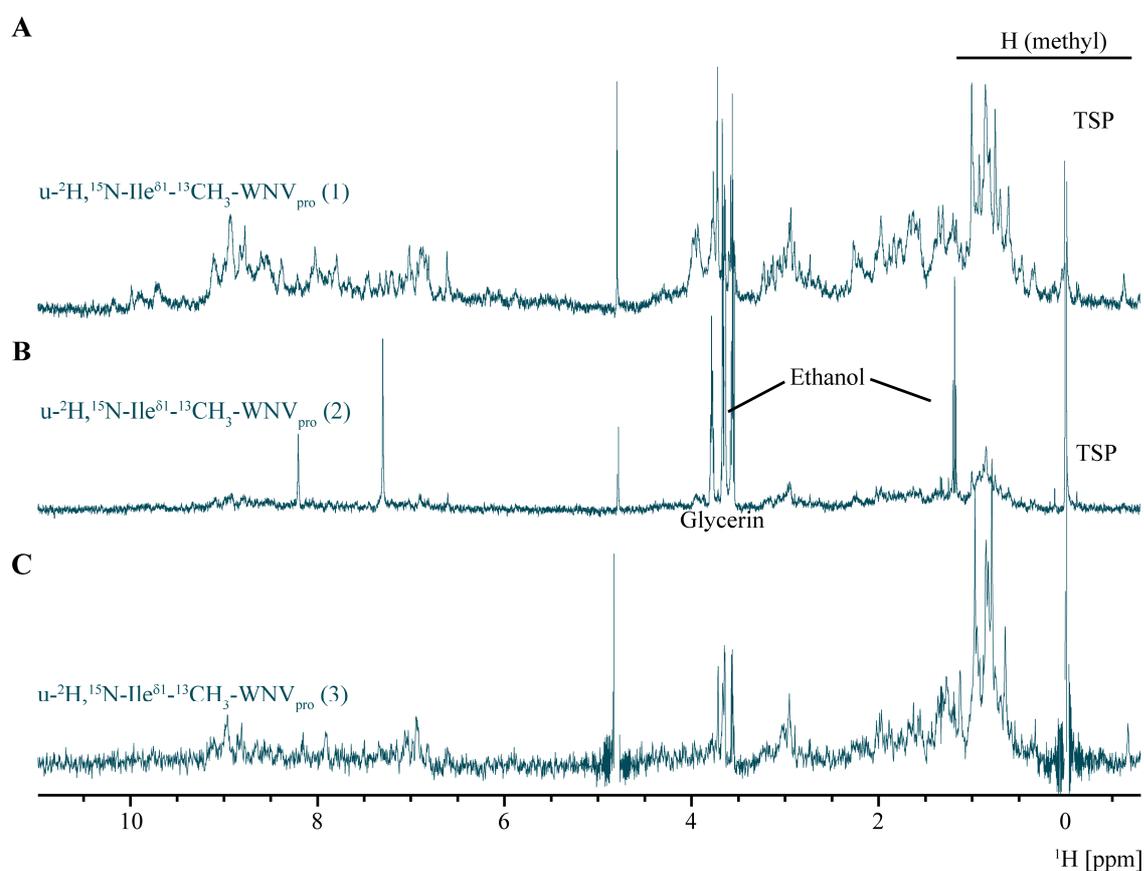


Abbildung 3.43 | 1D- ^1H -Spektren von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease. Die Spektren (A) und (B) wurden mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer, das Spektrum (C) mit einem 700 MHz NMR-Spektrometer mit Wasserunterdrückung aufgenommen und zeigen die ^1H -NMR-Spektren von (A) 300 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease (1), (B) 92 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease (2) und (C) 300 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease (3) in 20 mM (A) bzw. 25 mM (B,C) $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25 °C) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz gemessen bei 298 K. Im Bereich von -0,5 bis 1,5 ppm sind die Signale der selektiv markierten $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucine zu sehen.

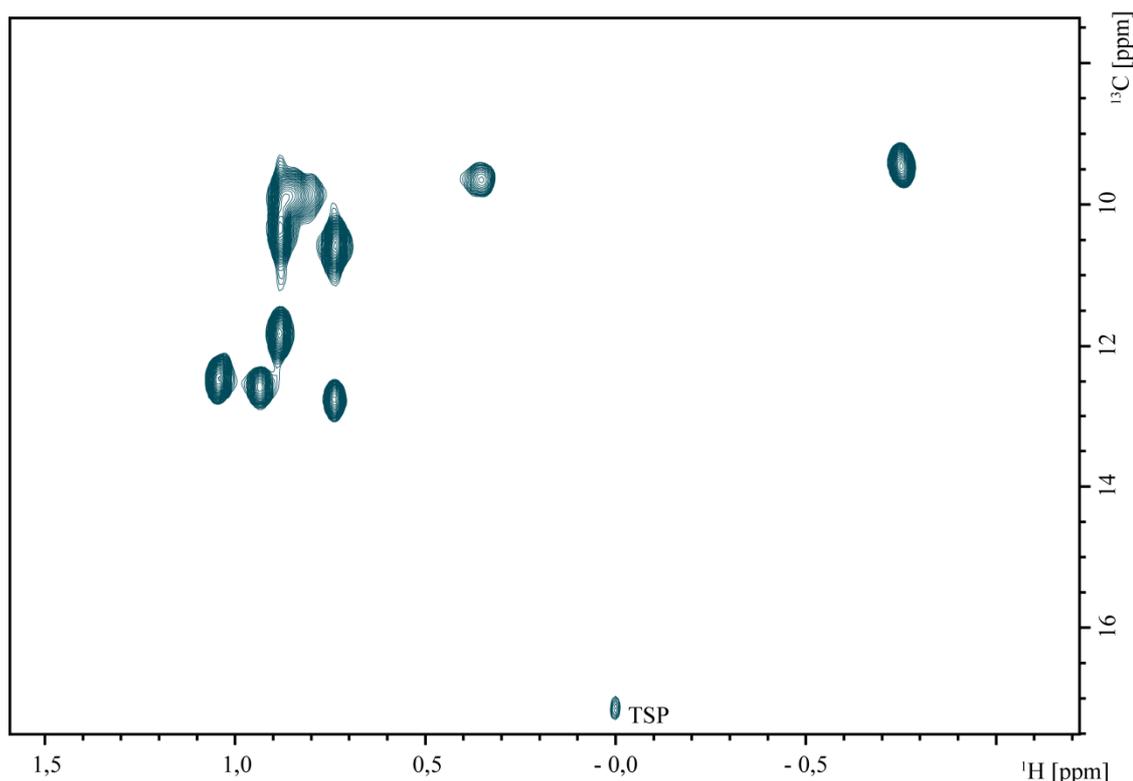


Abbildung 3.44 | $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Methyl-TROSY-Spektrum von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease. Das Spektrum wurde mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen und zeigen die $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucine einer 300 μM $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Protease (1) in 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25 $^\circ\text{C}$) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz gemessen bei 298 K.

3.4.2 Methyl-TROSY-Experimente mit der West-Nil-Virus Protease

Wie zuvor beschrieben verlief die Präparation der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Protease erfolgreich und konnte für weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen eingesetzt werden. Eine Zuordnung in Anwesenheit des WNV-Inhibitors war bereits vorhanden (Su, Ozawa et al. 2009; Su, Ozawa et al. 2009). Zusätzlich wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. G. Otting (The Australian National University, Australien) eine Zuordnung der Methylgruppen der Isoleucinseitenketten mittels Mutagenese in einem zellfreien System speziell für diese Arbeiten durchgeführt. Hierbei fand eine Zuordnung ohne und in Anwesenheit des WNV-Inhibitors statt. In Abbildung 3.45 ist die Zuordnung der Signale der Methyl-TROSY-NMR-Spektren von 300 μM der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Protease (1) in 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25 $^\circ\text{C}$), 100 μM TSP- d_4 als internen Standard ohne und mit 1 mM des WNV-Inhibitors dargestellt. Die Signale der Isoleucine, die sich im NS2B-Teil befinden, wurden mit einem Stern markiert, alle anderen befinden sich im NS3-Teil der WNV-Protease. Ile 123 konnte ohne WNV-Inhibitor kaum und Ile 162 gar nicht detektiert werden. Das Signal von Ile 155 war ohne WNV-Inhibitor sehr breit, wurde jedoch durch Zugabe des WNV-Inhibitors schärfer und erfuhr zusätzlich eine starke chemische Verschiebung. In Abbildung 3.46 ist der Titrationsverlauf der Signale der $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucinseitenketten der WNV-Protease gezeigt. Verwendet wurde dieselbe NMR-Probe

wie zuvor und schrittweise 100 μM (30 %), 240 μM (60 %) und 1 mM (95 %) des WNV-Inhibitors hinzugegeben. In den Klammern steht jeweils der Sättigungsgrad des Proteins mit dem WNV-Inhibitor. Dieser wurde mit einem K_D -Wert von 40 μM berechnet (Ekonomiuk, Su et al. 2009). Hier konnte die Verschiebung von Ile 155 deutlich verfolgt werden. Auch die Verschiebung sowie Änderung der Linienbreite von Ile 123 ist aus diesen Spektren ersichtlich. Das Signal von Ile 162 hingegen kann erst bei dem Spektrum mit der höchsten Konzentration an WNV-Inhibitor detektiert werden.

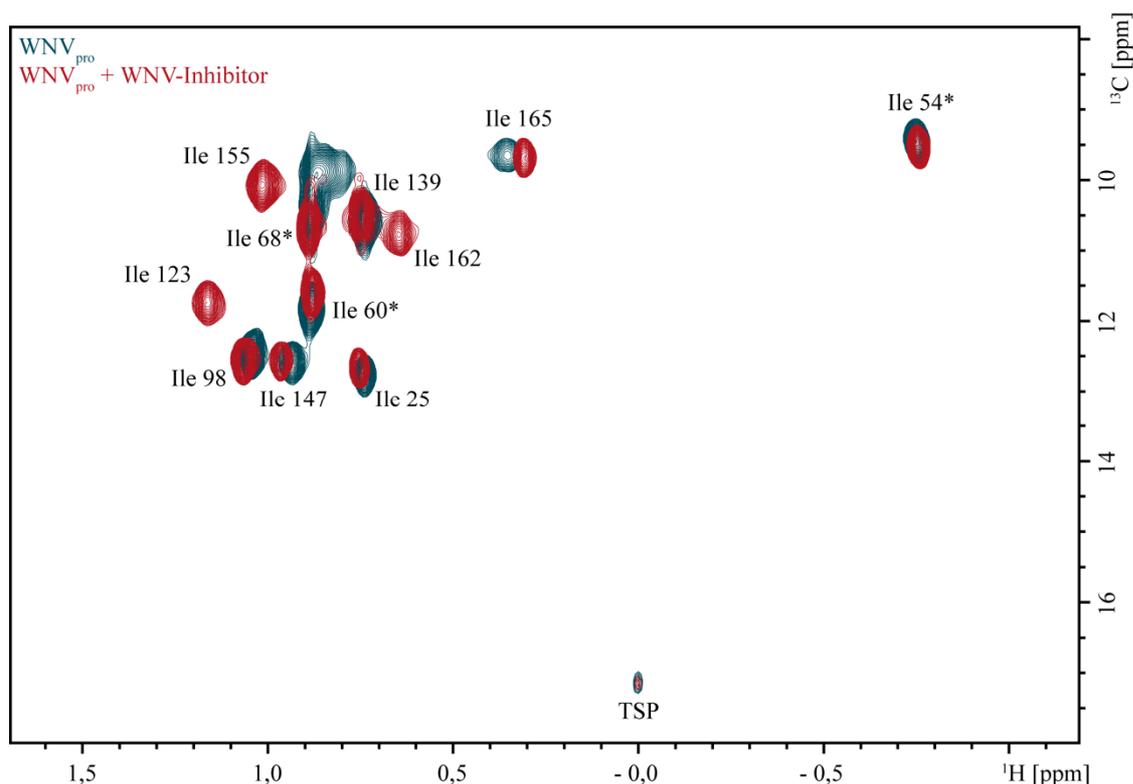


Abbildung 3.45 | ^1H , ^{13}C -Methyl-TROSY-Spektren von $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease mit und ohne WNV-Inhibitor. Die Spektren wurde mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen und zeigen die $\delta 1$ -Methylgruppen der Isoleucine einer 300 μM $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Protease (1) in 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25 $^\circ\text{C}$) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz gemessen bei 298 K. In blau ist das Spektrum ohne WNV-Inhibitor und in rot das Spektrum mit 1 mM WNV-Inhibitor dargestellt. Die Methyl-TROSY-Spektren wurden mit 16 Scans einer spektralen Breite von 8 ppm x 20 ppm, der Mitte des Spektrums bei 0,5 ppm in der ^1H -Dimension, bzw. 12 ppm in der ^{13}C -Dimension, 768 x 120 Datenpunkten sowie einer Wasserunterdrückung aufgenommen. Zusätzlich ist die Zuordnung der Isoleucinseitenketten angegeben, die Signale der Isoleucine die sich im NS2B-Teil befinden wurden mit einem Stern markiert, alle anderen befinden sich im NS3-Teil der WNV-Protease.

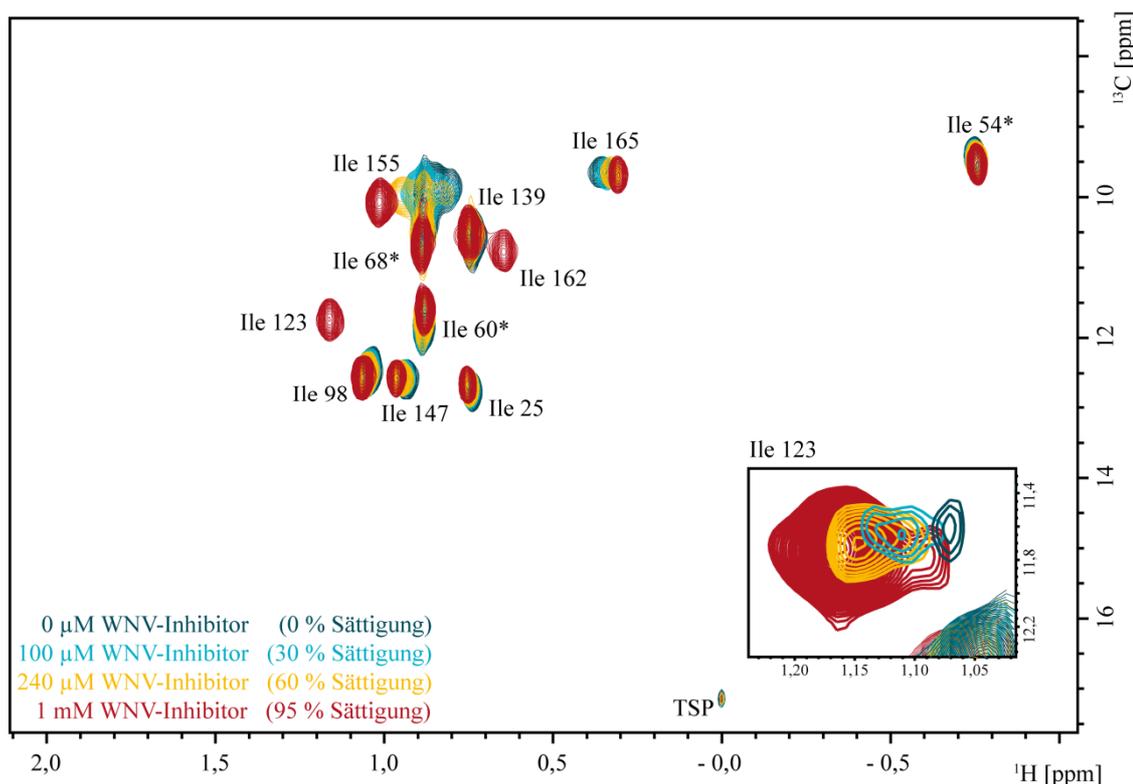


Abbildung 3.46 | Titration von $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease mit dem WNV-Inhibitor. Die NMR-Probe enthielt 300 μM $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Protease (1) in 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25 °C) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz. Gezeigt sind Methyl-TROSY-NMR-Spektren mit steigender WNV-Inhibitor-Konzentration aufgenommen bei 298 K. Zusätzlich eingefügt ist der Ausschnitt des Spektrums von Signal Ile 123 geschnitten in einer tieferen Ebene. Die Spektren wurden mit 16 Scans einer spektralen Breite von 8 ppm x 20 ppm, der Mitte des Spektrums bei 0,5 ppm in der ^1H -Dimension, bzw. 12 ppm in der ^{13}C -Dimension, 768 x 120 Datenpunkten sowie einer Wasserunterdrückung aufgenommen. Zusätzlich ist die Zuordnung der Isoleucinseitenketten angegeben, die Signale der Isoleucine die sich im NS2B-Teil befinden wurden mit einem Stern markiert, alle anderen befinden sich im NS3-Teil der WNV-Protease.

3.4.3 Methyl-TROSY-Experimente zur Untersuchung der Bindung von Aprotinin an die West-Nil-Virus Protease

Die WNV-Protease wird auch durch den Protease Inhibitor Aprotinin mit einem K_i -Wert von 26 nM inhibiert (Shiryaev, Ratnikov et al. 2006). Da in dieser Arbeit auch die Veränderung der Dynamik der WNV-Protease durch Bindung dieses Inhibitors untersucht werden sollte, wurden auch hier durch Titration eine Zuordnung der Signale sowie die Bestimmung des K_D -wertes vorgenommen. Hierfür wurden 100 μM der $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Protease (1) in 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25 °C) und 100 μM TSP- d_4 als internen Standard mit schrittweise 50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM , 1 mM und 1,5 mM Aprotinin versetzt. Die Titrationslösung enthielt die gleiche Menge an Protein wie die NMR-Probe, damit wurde gewährleistet, dass der Proteingehalt in jedem Spektrum vergleichbar blieb. In Abbildung 3.47 ist der Verlauf der Titration dargestellt. Für die Übersichtlichkeit wurden nicht alle Spektren abgebildet. Da in den Spektren zusätzlich Signale von Aprotinin zu beobachten waren, wurde ein Referenzspektrum mit 2,5 mM Aprotinin in 25 mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25 °C) und 100 μM TSP- d_4 aufgenommen (siehe Abbildung 6.37) um diese von den Signalen der δ^1 -Methylgruppen der Isoleucine der WNV-Protease unterscheiden zu können. Bei dieser Titration konnte im Gegensatz zu der Titration mit dem WNV-Inhibitor schneller und langsamer Austausch beobachtet werden. Ein schneller Austausch konnte bei den Signalen von Ile 60*, Ile 68*, Ile 98, Ile 139 und Ile 147 beobachtet werden. Die Signale von Ile 54*, Ile 25, Ile 155 und Ile 165 zeigten langsamen Austausch. Am deutlichsten ist dieser bei Ile 25 zu beobachten.

Für die Bestimmung des K_D -Wertes wurden bei den Signalen im schnellen Austausch die durchschnittlichen euklidischen Verschiebung (Gl. 2.10) berechnet und bei den Signalen im langsamen Austausch die Intensitäten der Signale im gebundenen Zustand extrahiert. Aus den Verschiebungen sowie Intensitäten und der Aprotinin Konzentration wurde eine Bindungsisotherme erstellt. Die Daten beider Austauschraten wurden anschließend an Gl. 2.11 angepasst und ein K_D -Wert von $3,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$ ermittelt. Die Bindungsisothermen sind in Abbildung 3.48 zu sehen.

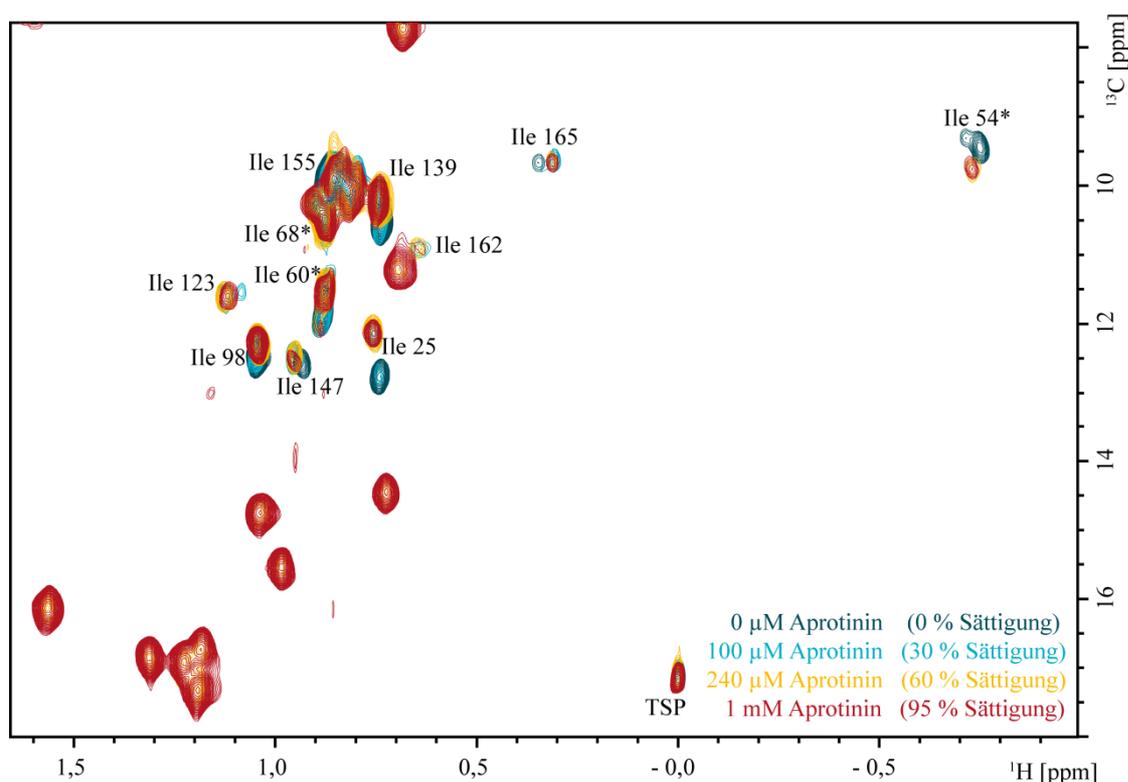


Abbildung 3.47 | Titration von $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta^1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease mit Aprotinin. Die NMR-Probe enthielt 100 μM der $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta^1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Protease (1) in 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25 °C) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz. Gezeigt sind Methyl-TROSY-NMR-Spektren mit steigender Aprotinin-Konzentration aufgenommen bei 298 K. Die Aufnahmeparameter sind unter 2.6.10 angegeben. Zusätzlich ist die Zuordnung der Isoleucinseitenketten angegeben, die Signale der Isoleucine die sich im NS2B-Teil befinden, wurden mit einem Stern markiert, alle anderen befinden sich im NS3-Teil der WNV-Protease. Nicht beschriftete Signale kommen vom Aprotinin.

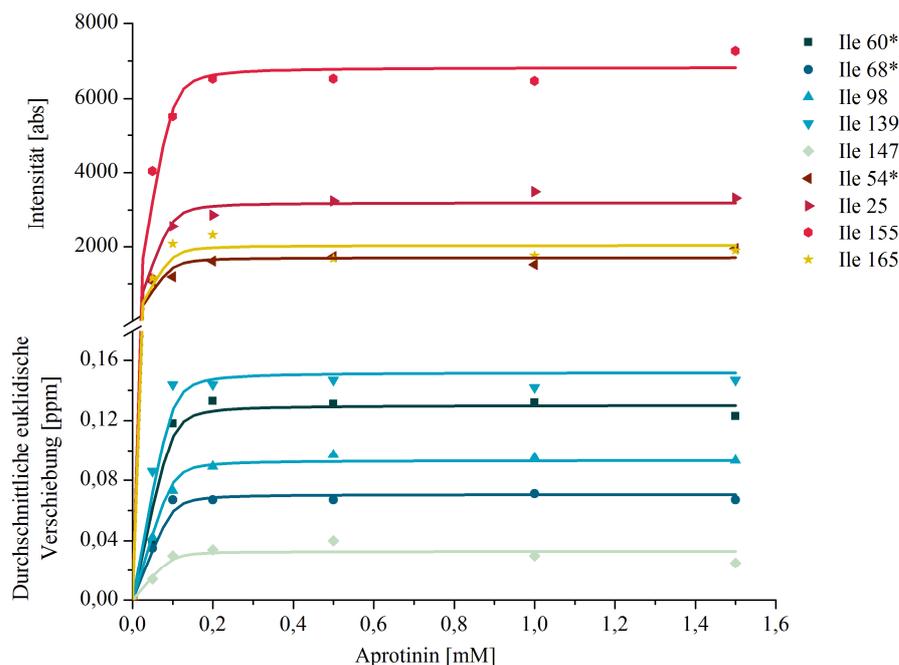


Abbildung 3.48 | Bindungsisotherme der Bindung von Aprotinin an $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierte WNV-Protease. Die durchschnittlichen euklidischen Verschiebungen für Signale im schnellen Austausch sowie die Signalintensitäten der Signale des gebundenen Zustandes im langsamen Austausch wurden aus den Methyl-TROSY-NMR-Spektren der Titration von Aprotinin zur WNV-Protease extrahiert (siehe Abbildung 3.47). Die Daten beider Austauschraten wurden anschließend in einem globalen Fit an ein Modell für eine Bindungsstelle angepasst und daraus ein K_D -Wert von $3,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$ ermittelt. Die Signale der Isoleucine die sich im NS2B-Teil befinden wurden mit einem Stern markiert, alle anderen befinden sich im NS3-Teil der WNV-Protease.

3.4.4 Methyl-TROSY CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit der West-Nil-Virus Protease

Mit der $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Protease sollten anschließend CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente durchgeführt und diese damit auf Bewegungen im Bereich von Milli- bis Mikrosekunden untersucht werden. Wie auch bei den Messungen mit der GTB (siehe 3.3.7) wurden zuerst verschiedene Mischzeiten getestet. Hierfür wurden CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit $300 \mu\text{M}$ der $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Protease (1) in $20 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25°C), $100 \mu\text{M}$ TSP- d_4 als internen Standard und mit 1 mM des WNV-Inhibitors durchgeführt. Es wurden Spektren bei 283 K und 298 K aufgenommen und Mischzeiten von 20 ms und 40 ms getestet. Auch hier wurden die Signalintensitäten der Spektren mit einer CPMG-Frequenz von 50 Hz mit den Signalintensitäten des Referenzspektrums verglichen. In Abbildung 3.49 sind die prozentualen Signalintensitäten der Messungen dargestellt. Bei 283 K lagen die prozentualen Signalintensitäten der Messung mit einer Mischzeit von 20 ms bei etwa 70% und die mit einer Mischzeit von 40 ms bei 60% . Beide also über dem Optimum von 50% . Wurde die Temperatur jedoch auf 298 K erhöht, schwankten die prozentualen Signalintensitäten der einzelnen Signale stark. Hier lagen die prozentualen Signalintensitäten mit einer Mischzeit von 20 ms zwischen 40% und 78% und die mit einer Mischzeit von 40 ms zwischen 18% und 65% . Aus diesen

Ergebnissen ist zu erkennen, dass optimal für unterschiedliche Signale unterschiedliche Mischzeiten verwendet werden sollten. Für diese Experimente wurde jedoch eine Mischzeit von 20 ms gewählt, da hier gerade bei höheren Temperaturen deutlich mehr Signale um das Optimum von 50 % lagen.

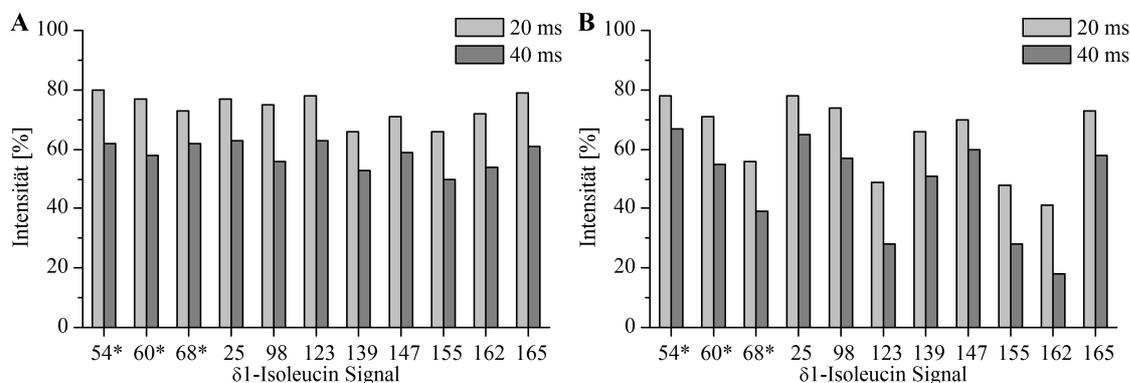


Abbildung 3.49 | Testen unterschiedlicher Mischzeiten bei (A) 283 K und (B) 298 K für CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit der WNV-Protease. Es wurden die Signalintensitäten der CPMG-Relaxations-Dispersions Methyl-TROSY-Spektren mit einer CPMG-Frequenz von 50 Hz gegenüber den Referenzspektren einer 300 μM $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Protease (1) in 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25 $^\circ\text{C}$), 100 μM TSP- d_4 als internen Standard und mit 1 mM des WNV-Inhibitors bei (A) 283 K und (B) 298 K sowie Mischzeiten von 20 ms und 40 ms verglichen. Gemessen wurden die Spektren an einem 500 MHz NMR-Spektrometer, alle weiteren Messparameter sind unter 2.6.10 und 3.4.4 angegeben. Die Signale der Isoleucine die sich im NS2B-Teil befinden wurden mit einem Stern markiert, alle anderen befinden sich im NS3-Teil der WNV-Protease.

Es wurden anschließend für alle drei Proben (ohne Inhibitor, mit WNV-Inhibitor und mit Aprotinin) CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit ν_{CPMG} -Frequenzen von 50 bis 500 Hz und einer Mischzeit von 20 ms aufgenommen. Gemessen wurden die Spektren zuerst bei einer Feldstärke von 500 MHz bei 283 K, 298 K und 310 K. Die Probe ohne Inhibitor wurde zusätzlich bei 288 K gemessen, da diese bei geringer Temperatur an Signalintensität verlor. Da bereits bei diesen Messungen Dispersionskurven zu beobachten waren, wurden die Messungen zusätzlich bei einer Feldstärke von 700 MHz durchgeführt. Hier wurden die Spektren bei 288 K, 298 K und 310 K aufgenommen. Die Messungen bei 500 MHz wurden in doppelter Bestimmung und die bei 700 MHz in einfacher Bestimmung durchgeführt. Die Aufnahmeparameter, sowie die Probenzusammensetzungen sind unter 2.6.10 sowie in Tabelle 2.17 zu finden. In Abbildung 3.50 (A) ist eine Überlagerung der Referenzspektren der WNV-Protease ohne Inhibitor bei 288 K und 310 K zu sehen. Die Signale von Ile 123 und Ile 162 waren bei keiner Temperatur zu erkennen. Bei niedrigeren Temperaturen verloren alle Signale an Intensität bzw. wurden breiter. Dies ist besonders gut am Signal von Ile 165 zu erkennen. Durch Zugabe des WNV-Inhibitors bzw. durch Zugabe von Aprotinin änderten sich die Spektren. Die Überlagerung dieser Spektren bei 288 K und 310 K sind in Abbildung 3.50 (B) und (C) gezeigt. Hier sind die Signale von Ile 123 und Ile 162 deutlich sichtbar. Jedoch war die Signalintensität bei niedrigeren Temperaturen in diesen Spektren deutlich größer. Besonders auffällig ist dies an den Signalen Ile 123 und Ile 162.

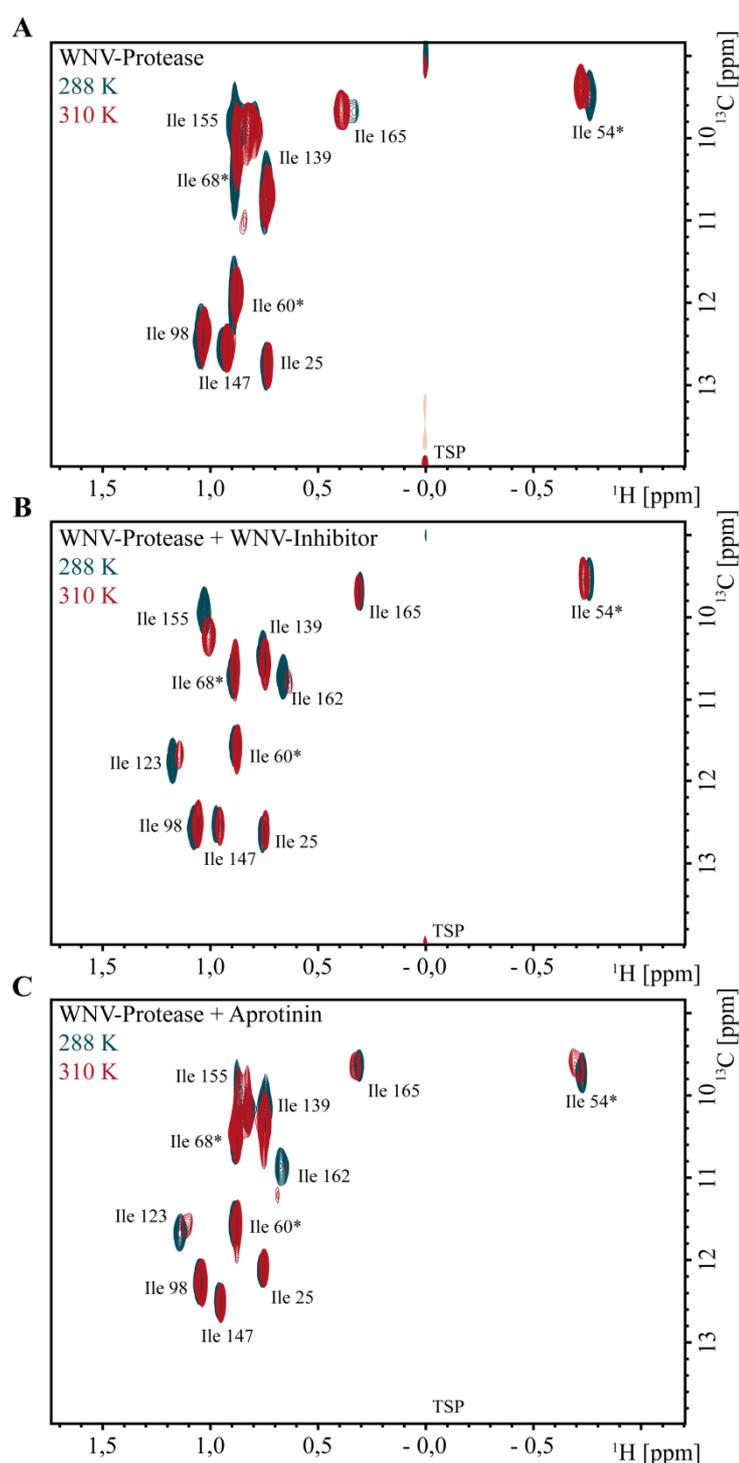


Abbildung 3.50 | Methyl-TROSY-NMR-Spektren von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease (A), mit WNV-Inhibitor (B) und mit Aprotinin (C) bei 288 K (blau) und 310 K (rot). Die NMR-Probe enthielt $300\ \mu\text{M}$ der $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten WNV-Protease in $25\ \text{mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O ($\text{pH } 7$ bei $25\ ^\circ\text{C}$) mit $100\ \mu\text{M}$ TSP- d_4 als interne Referenz (A) sowie mit $2\ \text{mM}$ WNV-Inhibitor (B) und $1,5\ \text{mM}$ Aprotinin (C). Gemessen wurden die Spektren an einem $700\ \text{MHz}$ NMR-Spektrometer. Die Aufnahmeparameter sind unter 2.6.10 angegeben. Zusätzlich ist die Zuordnung der Isoleucinseitenketten angegeben, die Signale der Isoleucine, die sich im NS2B-Teil befinden, wurden mit einem Stern markiert, alle anderen befinden sich im NS3-Teil der WNV-Protease.

Wie bereits bei der GTB (siehe Abschnitt 3.3.7) wurden erste Abschätzungen der Daten mit der Differenz der $R_2^{\text{eff}}(\nu_{\text{CPMG}})$ -Werte mit den ν_{CPMG} -Frequenzen von 50 und 500 Hz gemacht. In Abbildung 3.51 ist ein Vergleich der Messungen bei 500 MHz und 700 MHz dargestellt. Wie erwartet, sind die R_2^{eff} -Werte bei 700 MHz größer als bei 500 MHz. Auch ist deutlich zu erkennen, dass bei einigen Signalen Austausch im Milli- bis Mikrosekundenbereich stattfand, besonders Ile 60*, Ile 68*, Ile 98 und Ile 139. Ile 155 zeigt bei den Messungen bei 700 MHz einen deutlich höheren R_2^{eff} -Wert als bei den Messungen bei 500 MHz. Da jedoch das Signal bei dieser NMR-Probe ohne Inhibitor sehr breit war und nicht sicher gesagt werden konnte, ob sich nur ein Signal darunter befindet, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich um einen Messfehler handelt. Alle weiteren Signale zeigen nur sehr geringe R_2^{eff} -Werte und die jeweiligen Isoleucinseitenketten bewegen sich vermutlich außerhalb des Milli- bis Mikrosekundenbereiches.

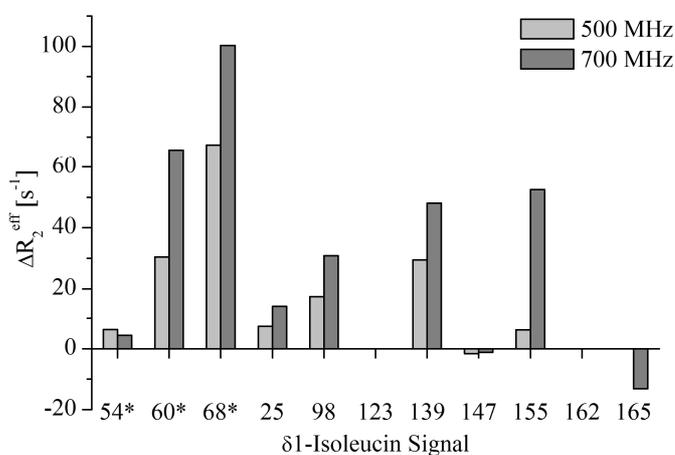


Abbildung 3.51 | Vergleich der CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease aufgenommen bei 500 MHz und 700 MHz. Dargestellt sind die $\Delta R_2^{\text{eff}} = R_2^{\text{eff}}(\nu_{\text{CPMG}} 50 \text{ Hz}) - R_2^{\text{eff}}(\nu_{\text{CPMG}} 500 \text{ Hz})$ Werte der Isoleucin-Signale der Methyl-TROSY CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease bei 288 K. Die Aufnahmeparameter sind unter 2.6.10 angegeben. Die Signale der Isoleucine die sich im NS2B-Teil befinden wurden mit einem Stern markiert, alle anderen befinden sich im NS3-Teil der WNV-Protease.

Wurden nun die beiden Proteaseinhibitoren, WNV-Inhibitor sowie Aprotinin, hinzugegeben, fand eine deutliche Veränderung der Dynamik im System statt. In Abbildung 3.52 ist dies ebenfalls mit den Differenzen der $R_2^{\text{eff}}(\nu_{\text{CPMG}})$ -Werte mit den ν_{CPMG} -Frequenzen von 50 und 500 Hz dargestellt. Bei Zugabe von Aprotinin sanken die R_2^{eff} -Werte der Signale, die ohne Inhibitor Dispersion zeigten deutlich bis auf unter 20 s^{-1} ab. Interessanterweise konnte bei Zugabe des WNV-Inhibitors bei 288 K bei keinem der Signale eine Dispersion beobachtet werden. Für weitere Auswertungen wurden anschließend alle $R_2^{\text{eff}}(\nu_{\text{CPMG}})$ -Werte berechnet, die Mittelwerte sowie Standardabweichungen bestimmt und mittels GUARDD (Kleckner and Foster 2011) gefittet. In Abbildung 3.53 sind die Dispersionsprofile von Ile 60*, Ile 68*, Ile 98 und Ile 139 dargestellt, da nur diese deutlich Dispersionen zeigten. Die Dispersionsprofile aller weiteren Messungen sind im Anhang (6.6.4) aufgeführt und zeigten keine oder nur sehr geringe Dispersionen. Bei den Messungen ohne Inhibitor nahm die Dispersion bei den hier gezeigten

Isoleucin-Signalen ab, je höher die Temperatur wurde. Bei Zugabe der Inhibitoren kann auch hier deutlich gesehen werden, dass sich die Bewegung im Protein deutlich veränderte und keine Dispersion bzw. nur geringe Dispersion zu sehen ist. Daher war es nur möglich, für die Messungen ohne Inhibitor Parameter, wie zum Beispiel die Austauschraten (k_{ex}) und Populationen (P_A) zu bestimmen. Erste Anpassungen der Daten sowie eine anschließende in GUARDDD integrierte Monte-Carlo Simulation zeigten, dass die Werte gemessen bei 310 K der Signale Ile 60*, Ile 98 und Ile 139 keine eindeutigen Ergebnisse lieferten. Dies lag vermutlich an der fehlenden Dispersion, da bei den Werten des Signals Ile 68* dies nicht der Fall war und dort eine leichte Dispersion vorhanden war. Für die Signale Ile 60*, Ile 98 und Ile 139 wurden die Daten erneut ohne die Werte bei 310 K gefittet. In Tabelle 3.10 sind die erhaltenen Austauschraten (k_{ex}) sowie Populationen (P_A) angegeben.

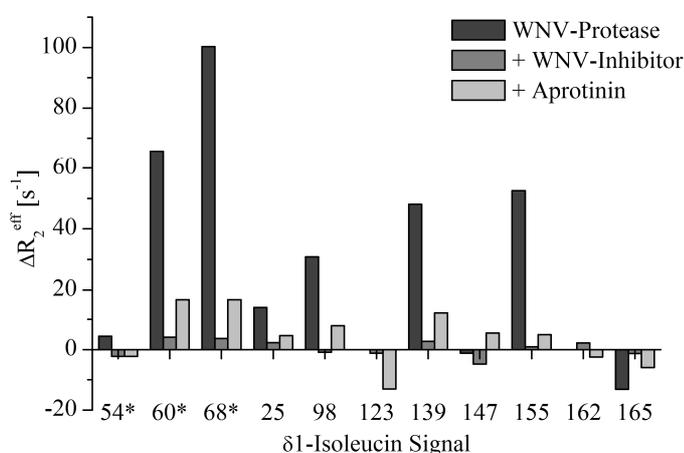


Abbildung 3.52 | Vergleich der CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente von $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease ohne und mit WNV-Inhibitor bzw. Aprotinin. Dargestellt sind die $\Delta R_2^{\text{eff}} = R_2^{\text{eff}}(v_{\text{CPMG}} 50 \text{ Hz}) - R_2^{\text{eff}}(v_{\text{CPMG}} 500 \text{ Hz})$ Werte der Isoleucinsignale der Methyl-TROSY CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease bei 288 K ohne (dunkelgrau) und mit 2 mM WNV-Inhibitor (grau) bzw. 1,5 mM Aprotinin (hellgrau). Die Aufnahmeparameter sind unter 2.6.10 angegeben. Die Signale der Isoleucine die sich im NS2B-Teil befinden wurden mit einem Stern markiert, alle anderen befinden sich im NS3-Teil der WNV-Protease.

Für die Anpassung der Daten wurde ein Zweizustandsmodell mit einem Austausch zwischen den Zuständen A und B angenommen. Die Austauschrate zwischen diesen beiden Zuständen ist bei den vier auswertbaren Signalen vergleichbar und weist auf eine einheitliche Dynamik im gesamten Protein hin. Die Austauschrate liegt bei etwa 500 s^{-1} bei Temperaturen zwischen $10 \text{ }^\circ\text{C}$ und $15 \text{ }^\circ\text{C}$. Steigt die Temperatur bis auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ an, erhöht sich auch die Austauschrate auf 2386 s^{-1} . Dies lässt auf Bewegungen im Millisekundenbereich schließen. Die Verteilung zwischen den Zuständen A und B ist jedoch nicht so einheitlich. Die Signale Ile 60* und Ile 68* der NS2B-Domäne befinden sich bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ zu 69 % bzw. 75 % in Zustand A, bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ zu ca. 80 % bis hin zu 89 % bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für Ile 68*. Hingegen die Signale Ile 98 und Ile 139 der NS3-Domäne befinden sich bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ zu 61 % bzw. 50 % in Zustand A, bei $15 \text{ }^\circ\text{C}$ zu etwa 76 % und fallen anschließend bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ wieder auf 67 % bzw. 50 % ab.

Tabelle 3.10 | Austauschraten und Populationen. Angegeben sind die Ergebnisse der gefitteten Daten der CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease. Die gemessenen Daten sind in Abbildung 3.53 zu sehen und die Messparameter sowie Probenzusammensetzung unter 2.6.10 zu finden. Angegeben sind jeweils die Austauschraten (k_{ex} in s^{-1}) und Populationen des Zustandes A (P_{A} in %) eines Zweizustandsmodelles für die $\delta 1$ -Methylgruppen von Ile 60*, Ile 68*, Ile 98 und Ile 139.

Temperatur [°C]	Ile 60*		Ile 68*		Ile 98		Ile 139	
	P_{A} [%]	k_{ex} [s^{-1}]						
37			89 ± 11	2386 ± 845				
25	81 ± 11	1465 ± 380	80 ± 6	846 ± 248	67 ± 14	1754 ± 748	50 ± 10	1921 ± 252
15	74 ± 6	462 ± 111	71 ± 3	442 ± 111	75 ± 9	500 ± 163	77 ± 4	641 ± 114
10	69 ± 7	478 ± 251	75 ± 4	412 ± 131	61 ± 12	714 ± 411	50 ± 8	481 ± 136

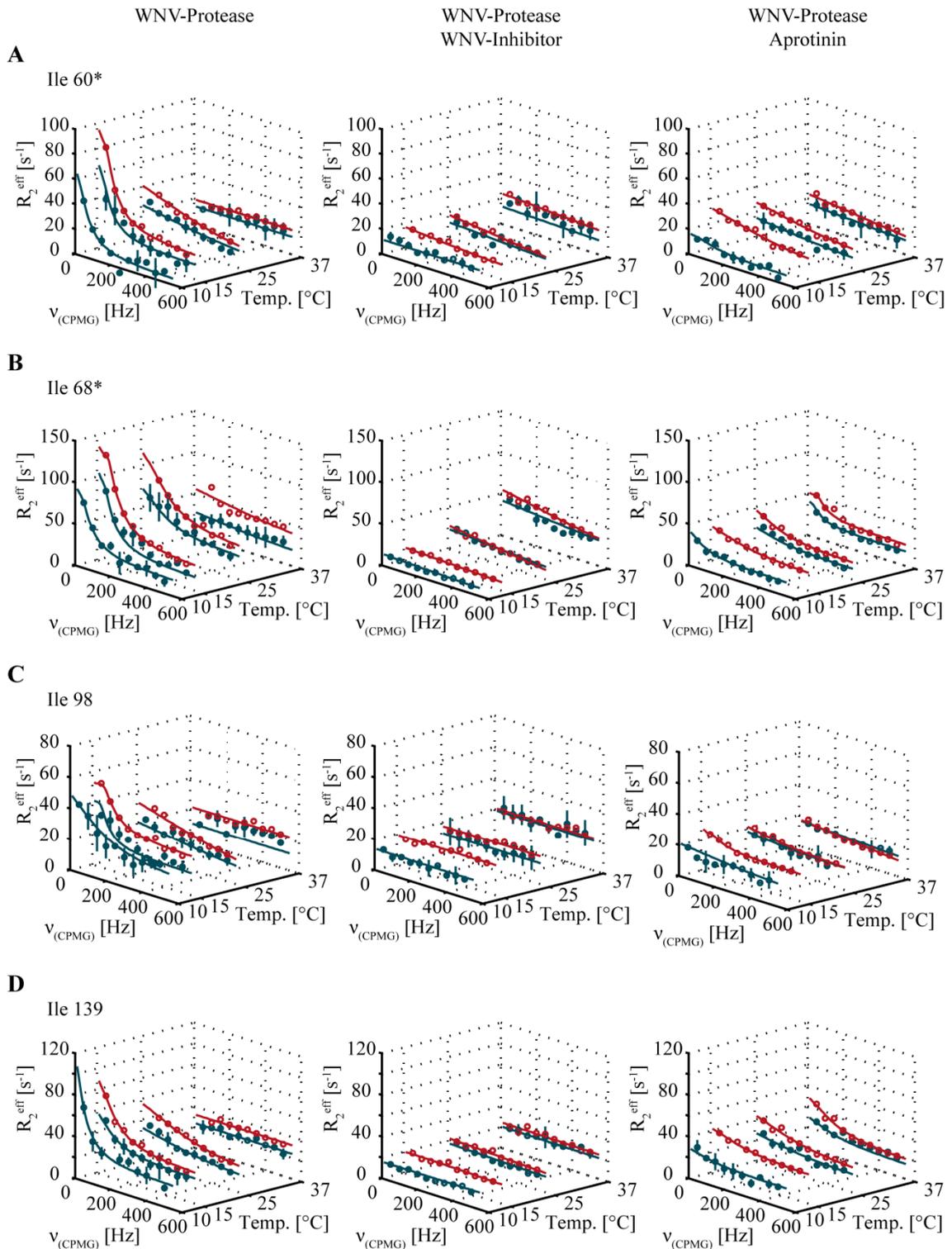


Abbildung 3.53 | Veränderung der Relaxations-Dispersionsprofile der WNV-Protease in Anwesenheit von WNV-Inhibitor und Aprotinin. Es wurden Methyl-TROSY CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease bei 500 MHz (blau) und 700 MHz (rot), v_{CPMG} -Frequenzen von 50 bis 500 Hz bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Gezeigt sind die Dispersionsprofile von Ile 60* (A), Ile 68* (B), Ile 98 (C) und Ile 139 (D) ohne (links), mit WNV-Inhibitor (mitte) und mit Aprotinin (rechts). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der doppelbestimmten Messwerte an und die Linien stellen den Verlauf dieser Messwerte da und wurden mit GUARDDD (Kleckner and Foster 2011) gefittet.

4 Diskussion

Glycosyltransferasen sind verantwortlich für die Biosynthese von Oligosacchariden, Polysacchariden und Glycokonjugaten. Da diese eine essentielle Rolle in vielen zellulären Prozessen spielen, ist es von großer Bedeutung die Funktionsweise der Glycosyltransferasen zu verstehen. Bisher ist nur der katalytische Mechanismus der invertierenden Glycosyltransferasen geklärt, wohingegen der Mechanismus der konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen immer noch unbekannt ist. Jedoch konnten bereits wichtige Informationen, die Hinweise auf die Funktionsweise von konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen geben, erhalten werden. Aus Kristallstrukturen konnten zum Beispiel flexible Bereiche identifiziert werden, die bei Substratbindung von einer offenen in eine geschlossenen Konformation übergehen. Um ein besseres Verständnis der Funktionsweise der konfigurationserhaltenen Glycosyltransferasen zu bekommen, wurden in dieser Arbeit die humanen Blutgruppen Glycosyltransferasen, hauptsächlich die humane Blutgruppe B Galactosyltransferase, genauer untersucht. Es wurden Bindungsstudien von Substraten, Substratanaloga und eines Glycosyltransferase Inhibitors durchgeführt sowie erstmals Daten zur Dynamik mittels NMR-Spektroskopie erhoben.

Ein weiterer Abschnitt widmet sich der West-Nil-Virus Protease. Das WNV wird in die Familie der *Flaviviridae* eingegliedert und kann bei immungeschwächten Menschen schwere Infektionen mit neurologischen Schäden zur Folge haben. Die WNV-Protease stellt dabei ein attraktives Ziel für die Entwicklung von Inhibitoren dar, da sie verantwortlich für die Spaltung des Polyproteins ist. Die Protease besteht aus zwei Domänen, die essentiell für die katalytische Aktivität sind. Kristallstrukturen sowie NMR-spektroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass die Protease in einer offenen, katalytisch nicht aktiven und einer geschlossenen, katalytisch aktiven Konformation vorliegen kann. Eine mögliche Inhibition basiert nun auf der Stabilisierung der offenen Konformation durch Bindung eines Inhibitors. In dieser Arbeit sollten nun mit Hilfe der NMR-Spektroskopie die Dynamik der WNV-Protease genauer untersucht werden sowie die Veränderung dieser in Anwesenheit zweier bekannter Inhibitoren. Dadurch soll eine Grundlage für die Entwicklung weiterer Inhibitoren geschaffen werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse beider Untersuchungen diskutiert.

4.1 Präparation unmarkierter humaner Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen

Für die Untersuchungen zur Bindung von Substraten, Substratanaloga sowie eines Glycosyltransferase Inhibitors wurden SPR-, ITC- und STD-NMR-Experimente durchgeführt. Für diese Experimente mussten die Blutgruppen Glycosyltransferasen in ausreichender Menge hergestellt werden. Es wurden insgesamt sieben Chargen unmarkierter GTB und je eine Charge unmarkierter GTA und unmarkierter AAGlyB in einem Liter Vollmedium hergestellt. Die Reinigung der Proteine fand anschließend mit einem SP-Sepharose-Kationenaustauscher und einer anschließenden UDP-Hexanolamin-Sepharose-Affinitätschromatographie statt. Der Reinigungserfolg wurde jeweils mit einer SDS-PAGE sowie der Bestimmung des A_{260}/A_{280}

Quotienten nachgewiesen. In den Gelen konnte bei allen Chargen nur eine Bande bei etwa 34 kDa unter reduzierenden Bedingungen detektiert werden, dies entsprach der monomeren GTB. Es konnten daher grobe Verunreinigungen mit anderen Proteinen ausgeschlossen werden. Auch die A_{260}/A_{280} Quotient lagen spätestens nach dem Austausch des Puffers unter 0,6, sodass von nukleinsäurefreien Proben ausgegangen werden konnte. Die Ausbeuten der GTB-Proben lagen bei 23 mg bis 68 mg pro Liter Kultur und die spezifischen Aktivitäten gegenüber UDP-u- ^{14}C -Gal zwischen 8 und 18 U/mg. Damit lagen sie im Bereich der normalen GTB-Aktivitäten. Die Unterschiede können sowohl auf Fehler in der Proteinbestimmung als auch auf Fehler im Aktivitätstest zurückgeführt werden. Bei der Proteinbestimmung kann nicht zwischen aktiven und nicht aktiven Molekülen unterschieden werden, wodurch ein Fehler in der Berechnung der spezifischen Aktivität entstand. Auch ist der Aktivitätstest aufgrund hoher Verdünnungen, geringe Volumina und der Flüssigszintillationszählung mit einem relativ hohen Fehler belastet. Die Ausbeuten der GTA- und AAGlyB-Proben lagen bei 72 bzw. 41 mg pro Liter Kultur und damit im Bereich der Ausbeuten der GTB-Proben. Die Aktivität der GTA gegenüber UDP-u- ^{14}C -GalNAc war mit 3,3 U/mg sehr gering. Bei der AAGlyB handelt es sich um ein dualspezifisches Enzym, welches sowohl UDP-u- ^{14}C -Gal als auch UDP-u- ^{14}C -GalNAc mit ähnlicher Effizienz umsetzen kann (Pesnot, Jorgensen et al. 2010). Daher wurden die Aktivitäten gegenüber beiden Donorsubstraten gemessen. Diese lagen bei 1,9 U/mg gegenüber UDP-u- ^{14}C -Gal und bei 0,7 U/mg gegenüber UDP-u- ^{14}C -GalNAc und damit deutlich unter den spezifischen Aktivitäten gemessen für die GTA und GTB. Die entscheidende Rolle der Dualspezifität von AAGlyB spielt die dritte der vier kritischen Aminosäuren. Das in AAGlyB enthaltene Glycin ist wesentlich kleiner als das Methionin in GTB wodurch ein größerer Raum für die Bindung des Donorsubstrats geschaffen wird. Neben UDP-Gal kann nun ebenfalls UDP-GalNAc binden und die Gal- bzw. die GalNAc-Einheit auf das H-Antigen übertragen werden.

4.2 Charakterisierung der Bindung von Substraten und Substratanaloga an die humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen

Obwohl über die Jahre viele Daten über die Struktur von Glycosyltransferasen bekannt wurden, sind viele mechanistische Aspekte immer noch nicht vollständig geklärt. Dies gilt vor allem für die Klasse der konfigurationserhaltenden Glycosyltransferasen. Für die Aufklärung des enzymatischen Mechanismus sind bindungsrelevante Parameter wie Bindungskonstanten und thermodynamische Daten von großer Bedeutung. In dieser Arbeit dienen die humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen als Model für konfigurationserhaltende Glycosyltransferasen. Die hier durchgeführten Untersuchungen bauten auf den Arbeiten von N. Sindhuwinata auf (Sindhuwinata 2012). In diesen Arbeiten wurde die Bindung verschiedener Donorsubstrate an die GTB mit ITC-, SPR- und STD-NMR-Experimenten untersucht. Auch wurden ITC-Experimente zum kooperativen Effekt von Donor- und Akzeptorbindung durchgeführt. Hierzu liegen auch Daten aus ESI-MS-Experimenten für die GTA sowie GTB vor (Shoemaker, Soya et al. 2008; Soya, Shoemaker et al. 2009).

Für die Untersuchungen fanden sowohl SPR- als auch ITC-Experimente mit unterschiedlichen Substraten und Substratanaloga statt. Neben dem natürlichen Donorsubstrat UDP-Gal der GTB wurden auch UDP-Glc, UDP, UMP und Uridin gemessen. UDP diente hierbei als internen Standard, um die Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente nachzuweisen. Für Untersuchungen der Kooperativität zwischen Donor- und Akzeptorsubstrat musste darauf geachtet werden, dass während der Messungen keine Katalyse stattfindet. Daher wurde als Donorsubstrat UDP-Glc verwendet, welches mit einer sehr viel geringeren Transferrate umgesetzt wird als UDP-Gal. Eine weitere Möglichkeit die Kooperativität ohne Umsetzung des Donorsubstrats zu untersuchen, ist die Verwendung von 3DD. Dieses bindet vergleichbar wie das H-Dis an die GTB, es fehlt jedoch die OH-Gruppe, auf die der Galactoserest normalerweise übertragen wird. Ein weiteres Akzeptorsubstratanalogon ist das 3AD, welches anstelle der OH-Gruppe des H-Dis eine Aminogruppe trägt. Die Bindung an die GTB unterscheidet sich aber vom 3DD (Nguyen, Seto et al. 2003).

Die SPR-Untersuchungen mit GTA, GTB und AAGlyB wurden sowohl mit Mn^{2+} als auch mit Mg^{2+} als mögliche Ionen durchgeführt. Es ist zwar bekannt, dass Glycosyltransferasen ein bivalentes Kation verwenden, um welches es sich aber in vivo handelt, ist jedoch noch nicht geklärt. Bei vielen wird vermutet, dass Mn^{2+} als bivalentes Kation dient (Witsell, Casey et al. 1990; Ramakrishnan, Boeggeman et al. 2004). Auch bei Untersuchungen der GTB wird meist Mn^{2+} verwendet. Im Vergleich zu Mg^{2+} weisen Experimente mit Mn^{2+} sehr viel stärkere Bindungskonstanten auf (Sindhuwinata, Munoz et al. 2010). Des Weiteren ist bekannt, dass die Aktivität in Anwesenheit von Mn^{2+} deutlich gegenüber der in Anwesenheit von Mg^{2+} erhöht ist (Zhang, Wang et al. 2001; Blume, Angulo et al. 2006). Die stärkere Bindung von UDP-GalNAc in Anwesenheit von Mn^{2+} konnte auch für die GTA gezeigt werden (Schwyzer and Hill 1977). Da die Reinigung der humanen Blutgruppen Glycosyltransferasen mit Mn^{2+} -haltigen Puffern erfolgte, war es wichtig, dieses anschließend für die Experimente mit Mg^{2+} komplett zu entfernen. Auch für folgende NMR-Experimente musste das Mn^{2+} komplett entfernt werden, da dieses paramagnetische Eigenschaften hat und daher zu einer starken Linienverbreiterung der Signale führt. Experimente zeigten, dass eine bloße Dialyse nicht ausreichte dieses zu entfernen (Sindhuwinata 2007), sondern eine Komplexierung durch EDTA und anschließendem Austausch des Puffers durchgeführt werden musste.

Die Bindungsaffinitäten von UDP-Gal, UDP-Glc, UDP, UMP, Uridin und 3DD wurden mit SPR-Spektroskopie untersucht. Hierbei wurde sowohl die Bindung in Anwesenheit von Mn^{2+} als auch in Anwesenheit von Mg^{2+} bestimmt. Bindungskonstanten für die GTB dieser Substrate in Anwesenheit von Mg^{2+} wurden bereits mit STD-NMR-Experimenten bestimmt (Sindhuwinata 2012). Diese Experimente lieferten jedoch nur einen Näherungswert der Bindungsaffinitäten, da die Auswertung anhand unterschiedlicher Protonen gemacht werden konnte und dies zu unterschiedlichen K_D -Werten führte. Auch wurden Bindungskonstanten für UDP, UDP-Gal und UDP-Glc bereits mit ITC- (Sindhuwinata 2012) und massenspektrometrischen Experimenten (Soya, Shoemaker et al. 2009) gemessen. Neben den Bindungskonstanten der GTB wurden auch die Bindungskonstanten für GTA und AAGlyB bestimmt. Zusätzlich wurde untersucht, ob es einen Unterschied macht, ob auf der Referenzzelle NA immobilisiert ist oder ob diese leer bleibt.

Für die Messungen wurden die Proteine auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. Vorangegangene SPR-Experimente zeigten, dass Belegungsdichten im Bereich von 2000-4000 RU optimal waren. Die hier verwendeten Belegungsdichten von etwa 4000 RU erwiesen sich als passend. Die zu messenden Liganden wurden im Laufpuffer (50 mM MOPS, pH 6,7 bei 25 °C, 100 mM NaCl und 5 mM MnCl_2 bzw. MgCl_2) für 3 min bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ über die Flusszellen gegeben und die entsprechenden Antworten gemessen. Die maximalen theoretischen RU lagen für diese Liganden zwischen 42 und 70 RU. Da es für SPR-Experimente essentiell ist, eine geeignete Referenz zu verwenden, wurden als Referenz eine leere Zelle, die nur aktiviert und deaktiviert wurde und eine mit NA belegte Zelle verglichen. Die Messungen wurden mit GTB und den oben genannten Substraten durchgeführt. Die Sensorgramme zeigten bei beiden Messungen Rechteckkurven, was auf eine schnelle Assoziations- und Dissoziationsrate hinwies und eine anschließende Regeneration der Zellen unnötig machte. Aus den Gleichgewichtsantworten wurden unter Verwendung der Langmuir-Gleichung die K_D -Werte sowie die RU_{max} bestimmt. Die RU_{max} -Werte lagen alle unter den theoretischen RU_{max} -Werten, wodurch eine unspezifische Bindung bzw. eine zweite Bindungsstelle ausgeschlossen werden konnte. Die Antworten von UDP-Gal, UDP-Glc, UDP und UMP waren in den Messungen gegen NA als Referenz zwischen doppelt bis vierfach so groß wie in den Messungen gegenüber der leeren Referenzzelle. Dies lag daran, dass die unspezifische Bindung dieser Substrate bei der leeren Referenzzelle größer war als bei der Referenzzelle mit NA. Die Bindung von Molekülen mit negativen Ladungen an der Oberfläche werden durch NA geringer gebunden. Daher ist bei den Messungen mit Uridin und 3DD auch kein großer Unterschied zwischen den Messungen mit den unterschiedlichen Referenzzellen festzustellen. Da die leere Zelle als Referenz besser die unspezifischen Bindungen der Liganden an die mit Protein belegte Zelle widerspiegelte, wurde diese als Referenz verwendet.

Die Messungen wurden anschließend mit einer leeren Referenzzelle und mit GTA, GTB sowie AAGlyB immobilisiert auf den weiteren Flusszellen wiederholt. Auch für die Messungen mit GTA und AAGlyB zeigten die Sensorgramme Rechteckkurven und die K_D -Werte konnten wie zuvor bestimmt werden. Auch hier konnte aufgrund der RU_{max} -Werte eine unspezifische Bindung bzw. ein zweite Bindungsstelle ausgeschlossen werden. Wie vermutet, hatte das verwendete Metallion einen Einfluss auf die Bindungsaffinitäten. Diese waren bei den Messungen mit Mn^{2+} deutlich größer als bei den Messungen mit Mg^{2+} . Wie auch in vorangegangenen Arbeiten für die GTB gezeigt werden konnte, ist auch hier die Affinität für UDP am größten und liegt in Anwesenheit von Mn^{2+} bei $55 \pm 4 \mu\text{M}$ (Boix, Zhang et al. 2002; Blume, Angulo et al. 2006; Grimm 2010). Die Zusätzliche Gal- bzw. Glc-Einheit bei UDP-Gal und UDP-Glc führte nicht zu einer Verbesserung, sondern zu einer leichten Verschlechterung der Affinität und stimmte somit mit vorherigen Experimenten überein (Blume, Angulo et al. 2006). Die Bindungskonstanten lagen für UDP-Glc bei $85 \pm 5 \mu\text{M}$ und für UDP-Gal bei $102 \pm 6 \mu\text{M}$ und waren somit etwa doppelt so groß wie die für UDP. Die Bindungskonstante von UMP lag mit $107 \pm 7 \mu\text{M}$ ebenfalls über der von UDP, aber im Bereich der aktivierten Zucker. Uridin zeigte hier die schlechteste Bindung und lag mit $2,7 \pm 0,3 \text{ mM}$ im millimolaren Bereich. Die Reihenfolge der Bindungsaffinitäten stimmte mit den durch kompetitive STD-NMR-Experimente K_D -Werte überein (Blume, Angulo et al. 2006). Bei den Messungen mit GTA und

AAGlyB lagen die Bindungskonstanten für UDP und UMP im gleichen Bereich wie für die GTB. Deutlich geringer waren jedoch die Bindungskonstanten für UDP-Gal und UDP-Glc. Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da bei der GTA und AAGlyB die dritte der vier kritischen Aminosäuren deutlich kleiner ist als das Methionin der GTB. Durch die vergrößerte Bindungstasche ist mehr Platz für den Zuckerrest und dieser wirkt sich nicht negativ auf die Bindungsaffinität des Donorsubstrats aus, welche hauptsächlich durch UDP getrieben wird. Abschließend kann gesagt werden, dass die Messungen unter diesen Bedingungen zu guten Ergebnissen geführt haben, reproduzierbar und die Fehler sehr klein waren. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die ermittelten Werte ein gutes Bild über die Bindungsaffinitäten der Donorsubstrate liefern. Durch den Versuchsaufbau war es möglich mit geringen Proteinmengen, die Affinitäten verschiedener Substrate an die GTA, GTB und AAGlyB gleichzeitig zu bestimmen. Auch die Messungen mit unterschiedlichen Puffern (hier Mn^{2+} und Mg^{2+}) erwiesen sich als gut durchführbar, da es ohne Probleme möglich war, durch einfaches Spülen die Puffer auszutauschen. Die Bindungen sind jedoch nicht vergleichbar mit denen in freier Lösung, da hier die Proteine auf einer Oberfläche immobilisiert wurden und es zusätzlich zu unspezifischen Wechselwirkungen mit der Chipoberfläche kommen konnte.

Eine weitere Möglichkeit Bindungsaffinitäten zu messen ist die ITC. Hier ist der Vorteil, dass zusätzlich auch Informationen über die Bindungsenthalpie und -entropie gewonnen werden können. Im Gegensatz zur SPR-Spektroskopie wird hier die Bindung in Lösung gemessen. Jedoch ist die Menge an benötigtem Protein deutlich höher und Messungen von Bindungen im millimolaren Bereich aufgrund von zu hohen Proteinkonzentrationen nicht möglich.

Untersuchungen zur Bindung von UDP, UDP-Gal, UDP-Glc, H-Dis sowie zur Kooperativität von UDP und H-Dis wurden bereits von N. Sindhuwinata durchgeführt (Sindhuwinata 2012). UDP-Gal konnte bei den Untersuchungen des kooperativen Effektes nicht verwendet werden, da dieses hydrolysiert wird. In dieser Arbeit sollten nun weitere Untersuchungen zur Kooperativität durchgeführt werden. Zum einen sollte anstelle von UDP das Donorsubstratanalogon UDP-Glc zusammen mit dem H-Dis untersucht werden. Dieses zeigt gegenüber der GTB nur 1 % der Aktivität vom natürlichen Donorsubstrat UDP-Gal. Zusätzlich wurden anstelle von H-Dis das Akzeptorsubstratanalogon 3DD verwendet und die Kooperativität gegenüber UDP-Gal und UDP-Glc gemessen. Außerdem wurde auch das α -L-Fuc-(1,2)- β -D-3-amino-3-deoxy-Gal-O-octyl (3AD) gemessen. Hierbei handelt es sich auch um ein Akzeptorsubstratanalogon, das jedoch anders an GTB bindet als das 3DD (Nguyen, Seto et al. 2003).

Da für die Messungen ein anderes ITC-Gerät verwendet wurde als in den Messungen zuvor (hier iTC_{200} anstelle eines VP-ITC), mussten die Messbedingungen erneut überprüft werden. Der Unterschied zwischen diesen beiden Geräten war vor allem das geringere Zellvolumen des iTC_{200} -Gerätes und damit der geringere Proteinverbrauch als bei den Messungen mit einem VP-ITC-Gerät. Die Messungen wurden bei 25 °C in 50 mM MOPS-Puffer (pH 6,7) mit 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ durchgeführt. Für die Stabilität wurde dem Protein 1 mM 2-Mercaptoethanol hinzugesetzt. Um konstante Messungen durchführen zu können, war es von großer Bedeutung, dass sich das Protein und die Liganden in demselben Puffer befanden. Nur so konnte gewährleistet werden, dass die gemessenen Wärmemengen von der Bindung der

Liganden an das Protein und nicht durch Puffereffekte durch Verwendung unterschiedlicher Puffer stammten. Für die Messungen wurde GTB in der Probezelle vorgelegt und mit dem entsprechenden Liganden titriert. Bei Studien zur Kooperativität wurde ein Bindungspartner in 10-fachem Überschuss zusätzlich zur GTB in der Probenzelle vorgelegt und mit dem anderen Bindungspartner titriert. Testexperimente mit UDP zeigten, dass eine GTB-Konzentration von etwa 400 μM nötig war, um einen vollständigen Kurvenverlauf messen zu können. Trotz dieser Konzentrationen war es nicht für alle Experimente möglich einen optimalen Kurvenverlauf zu messen. Da jedoch alle Experimente einen sigmoidalen Kurvenverlauf zeigten, konnten bei allen Messungen die Bindungsparameter bestimmt werden. Die Messungen mit UDP, UDP-Glc sowie UDP in Anwesenheit von H-Dis zeigten alle gute Vergleichbarkeit mit den zuvor erhobenen Daten von N. Sindhuwinata. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass der Versuchsaufbau reproduzierbare Daten lieferte. In Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 sind die hier erhobenen Bindungskonstanten sowie thermodynamischen Parameter mit bisher bekannten Daten aus verschiedenen Arbeiten zusammengefasst (Shoemaker, Soya et al. 2008; Soya, Shoemaker et al. 2009; Polk 2010; Sindhuwinata, Munoz et al. 2010; Sindhuwinata 2012; Sindhuwinata, Grimm et al. 2013). In Abbildung 4.1 sind die thermodynamischen Parameter als Balkendiagramm, aus (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) übernommen, dargestellt.

Die thermodynamischen Parameter können nun mit strukturellen Eigenschaften der GTB in Zusammenhang gebracht werden. Aus Kristallstrukturen ist das Vorhandensein drei verschiedener Konformationen bekannt, die offene, die halbgeschlossene und die geschlossene (Alfaro, Zheng et al. 2008). Bei der Bindung des Donorsubstrats bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen und die Phosphatreste koordinieren das bivalente Kation, was zu einer enthalpisch begünstigten Bindung führt. Im Gegensatz dazu führt die Bindung des Donorsubstrats zu einer konformationellen Änderung im Enzym und der interne sowie der C-terminale Loop ordnen sich, wodurch der große ungünstige entropische Beitrag zustande kommt. Bei der Bindung vom Akzeptorsubstrat konnte diese Umstrukturierung der flexiblen Bereiche der GTB nicht beobachtet werden. Dies spiegelt sich auch in den hier gemessenen thermodynamischen Parametern wieder. Die Bindung von UDP-Gal weist mit 14 kJ/mol einen etwa fünffach so großen entropisch ungünstigen Beitrag auf als die Bindung von H-Dis mit 3 kJ/mol. Deutlich zu erkennen ist auch, dass die bessere Bindungsaffinität von H-Dis in Anwesenheit von UDP auf einer stark erhöhten Bindungsenthalpie zu Kosten der Entropie beruht. Dies konnte auch mit temperaturabhängigen ESI-MS-Untersuchungen gezeigt werden (Shoemaker, Soya et al. 2008). Auch konnte die wie bereits zuvor beschriebene stärkere Bindungsaffinität von UDP und UDP-Gal in Anwesenheit des Akzeptorsubstrats H-Dis bzw. 3DD bestätigt werden (Sindhuwinata, Munoz et al. 2010; Sindhuwinata 2012). Die Affinitätssteigerung kommt durch eine deutlich bessere Bindungsenthalpie zustande.

Tabelle 4.1 | Dissoziationskonstanten verschiedener Substrate und Substratanaloga der GTB, gemessen mit ITC, SPR und STD-NMR. Messungen wurden in Anwesenheit von Mn^{2+} oder Mg^{2+} und pH 6,7 oder 7 durchgeführt. Zum Vergleich sind K_D -Werte aufgelistet, die mit MS bei 24 °C und pH 7 bestimmt wurden (Soya, Shoemaker et al. 2009). Die Tabelle wurde aus (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) übernommen.

Substrate	M^{2+}	ITC	SPR	STD-NMR	MS ^{a,b}
Uridin	Mn^{2+}	- ^c	3 ± 0.3 mM	- ^d	- ^c
UMP	Mn^{2+}	- ^c	107 ± 7 μ M	- ^d	- ^c
UDP	Mn^{2+}	15 ± 3 μ M ^{e1}	55 ± 4 μ M	- ^d	5.3 ± 1.1 μ M ^a
UDP (HDis) ^f	Mn^{2+}	1.5 ± 0.4 μ M ^{e1}	- ^c	- ^d	- ^c
UDP-Gal	Mn^{2+}	18 μ M ^{e,g}	103 ± 6 μ M	- ^d	50 ± 18 μ M ^a
UDP-Gal (3DD) ^f	Mn^{2+}	3 μ M ^g	- ^c	- ^d	- ^c
UDP-Glc	Mn^{2+}	23 ± 14 μ M ^{e1}	85 ± 5 μ M	- ^d	83 ± 21 μ M ^a
UDP-Glc (HDis) ^f	Mn^{2+}	12 ± 7 μ M	- ^c	- ^d	- ^c
UDP-Glc (3DD) ^f	Mn^{2+}	5 μ M ^g	- ^c	- ^d	- ^c
HDis	Mn^{2+}	105 μ M ^{e,g}	- ^c	- ^d	59 ± 10 μ M ^b
HDis (UDP) ^f	Mn^{2+}	2 ± 1 μ M ^e	- ^c	- ^d	6.7 ± 1.3 μ M ^b
3DD	Mn^{2+}	- ^c	260 ± 16 μ M	- ^d	- ^c
3AM	Mn^{2+}	66 ± 14 μ M ^h	- ^c	- ^d	- ^c
3AD	Mn^{2+}	24 ± 10 μ M	- ^c	- ^d	- ^c
Uridin	Mg^{2+}	- ^c	1.7 ± 0.1 mM	2.5 ± 0.6 mM ^{g,e}	- ^c
UMP	Mg^{2+}	- ^c	1.0 ± 0.1 mM	2.5 ± 0.6 mM ^{g,e}	- ^c
UDP	Mg^{2+}	- ^c	0.71 ± 0.09 mM	0.43 ± 0.04 mM ^{g,e}	- ^c
				0.91 ± 0.12 mM ^{g,e}	
UDP (HDis) ^f	Mg^{2+}	27 μ M ^{e,g}	- ^c	- ^c	- ^c
UDP-Gal	Mg^{2+}	- ^c	1.6 ± 0.2 mM ^{e1}	0.72 ± 0.05 mM ^{g,e}	- ^c
UDP-Glc	Mg^{2+}	- ^c	1.0 ± 0.1 mM	0.53 ± 0.05 mM ^{g,e}	- ^c
HDis	Mg^{2+}	70 ± 1 μ M ^e	67 ± 1 μ M ^l	93 ± 16 μ M ^{g,e,k}	- ^c
HDis (UDP) ^f	Mg^{2+}	7 μ M ^{e,g}	- ^c	- ^c	- ^c
3DD	Mg^{2+}	- ^c	- ^c	389 μ M ^{g,l}	- ^c

^a Werte aus (Soya, Shoemaker et al. 2009); ^b Werte aus (Shoemaker, Soya et al. 2008); ^c Werte nicht bestimmt; ^d Werte aufgrund paramagnetischer Eigenschaften nicht bestimmt; ^e Werte aus (Sindhuwinata, Munoz et al. 2010; Sindhuwinata 2012; Sindhuwinata, Grimm et al. 2013); ^{e1} wie e, komplettiert mit Daten aus dieser Arbeit; ^f Sättigung der entsprechenden Bindungsstellen der GTB lag bei über 90 %; ^g Einfachbestimmung; ^h Wert aus (Polk 2010); ^k Wert von A. Gohlke, Puffer ohne Mg^{2+} , gemessen bei 300 K; ^l Wert von Dr. E. Munoz.

Der ungünstige entropische Beitrag ist bei der Bindung von UDP in Anwesenheit von H-Dis etwa doppelt so groß wie ohne H-Dis. Bei der Bindung von UDP-Gal in Anwesenheit von 3DD ist dieser Effekt sogar noch stärker ausgeprägt. Der kooperative allosterische Effekt konnte auch für die Bindung von UDP-Glc in Anwesenheit von H-Dis bzw. 3DD beobachtet werden. Obwohl die Bindungsaffinitäten von UDP-Gal und UDP-Glc im gleichen Bereich liegen, unterscheiden sich die thermodynamischen Parameter deutlich voneinander. Bei der Bindung von UDP-Glc ist der ungünstige entropische Beitrag doppelt so groß wie bei UDP-Gal. Die bessere Bindung in Anwesenheit von H-Dis geschieht nur durch geringe Veränderungen in der Enthalpie und Entropie. In Anwesenheit von 3DD findet sogar eine positive Entropieänderung statt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass bei der Bindung von UDP-Glc eine größere Ordnung im Enzym vorhanden ist als bei der Bindung von UDP-Gal. Kommt es anschließend zur Bindung des Akzeptors, hier H-Dis bzw. 3DD, findet bei UDP-Glc im Enzym eine

Charakterisierung der Bindung von Substraten und Substratanaloga an die humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen

geringere Änderung der Entropie und Enthalpie als bei UDP-Gal statt. Bei UDP-Gal führt die Bindung des Akzeptoranalogs 3DD zu einer starken ungünstigen Entropie, die mit einer günstigeren Bindungsenthalpie einhergeht. Es könnte vermutete werden, dass das Enzym diese große Bindungsenthalpie für die Aktivierung der Katalyse nutzt. Dies würde auch erklären, warum die GTB UDP-Glc mit einer deutlich geringeren Aktivität umsetzt.

Tabelle 4.2 | Enthalpie- und Entropiebeiträge verschiedener Substrate und Substratanaloga der GTB gemessen mit ITC. Die Messungen wurden in Anwesenheit von Mn^{2+} oder Mg^{2+} und pH 6,7 durchgeführt. Die Tabelle wurde aus (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) übernommen.

	M^{2+}	ΔH [kJ mol ⁻¹]	$-T\Delta S$ [kJ mol ⁻¹]
UDP	Mn^{2+}	-57 ± 10^b	30 ± 11^b
UDP (HDis)	Mn^{2+}	-85 ± 11^b	51 ± 11^b
	Mg^{2+}	$-90^{a,c}$	$64^{a,c}$
UDP-Gal	Mn^{2+}	$-41^{a,c}$	$14^{a,c}$
UDP-Gal (3DD)	Mn^{2+}	-109^c	77^c
UDP-Glc	Mn^{2+}	-54 ± 14^b	28 ± 13^b
UDP-Glc (HDis)	Mn^{2+}	-62 ± 11	33 ± 10
UDP-Glc (3DD)	Mn^{2+}	-45^c	15^c
HDis	Mn^{2+}	$-25^{a,c}$	$3^{a,c}$
	Mg^{2+}	-32 ± 1^a	8 ± 0.02^a
HDis (UDP)	Mn^{2+}	-65 ± 14^a	33 ± 13^a
	Mg^{2+}	$-75^{a,c}$	$46^{a,c}$
3AM	Mn^{2+}	-45 ± 7^d	21 ± 8^d
3AD	Mn^{2+}	-27 ± 7	1 ± 8

^a Werte aus (Sindhuwinata, Munoz et al. 2010; Sindhuwinata 2012; Sindhuwinata, Grimm et al. 2013); ^b wie a, komplettiert mit Daten aus dieser Arbeit; ^c Einfachbestimmung; ^d Wert aus (Polk 2010).

Der kooperative allosterische Effekt der Donor- und Akzeptorsubstrate der GTB konnte auch bei anderen Glycosyltransferasen aus der Familie 6 beobachtet werden (Boix, Zhang et al. 2002; Thiyagarajan, Pham et al. 2012). Es kann daher vermutet werden, dass diese einen ähnlichen Mechanismus besitzen. Neben den Donorsubstraten und den kooperativen Effekten wurde auch das Akzeptorsubstratanalogon 3AD gemessen. Aus ESI-MS-Untersuchungen ist bekannt, dass das entsprechende Monosaccharid (3AM) an die GTA sowie GTB im mikromolaren Bereich bindet und sich diese durch Zugabe von UDP in den nanomolaren Bereich verschiebt (Soya, Shoemaker et al. 2009). ITC-Messungen mit 3AM (Polk 2010) sowie die aus dieser Arbeit gemessenen Bindungskonstanten bestätigen diesen Befund. Wobei die Bindungsaffinität von 3AD etwas besser ist als die von 3AM. Dies kann auf einen kleineren ungünstigeren entropischen Beitrag zurückgeführt werden.

Die hier erhobenen Daten zeigen, dass die Bindungsaktivität und Katalyse der GTB durch einen sehr komplexen Mechanismus kontrolliert werden und durch strukturelle Daten alleine nicht aufgeklärt werden können. Um weiter Einblicke in die Dynamik des Enzyms zu bekommen, sollten strukturelle Dynamikuntersuchungen durchgeführt werden. Hierzu wurden in dieser Arbeit NMR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt und werden im Folgenden diskutiert.

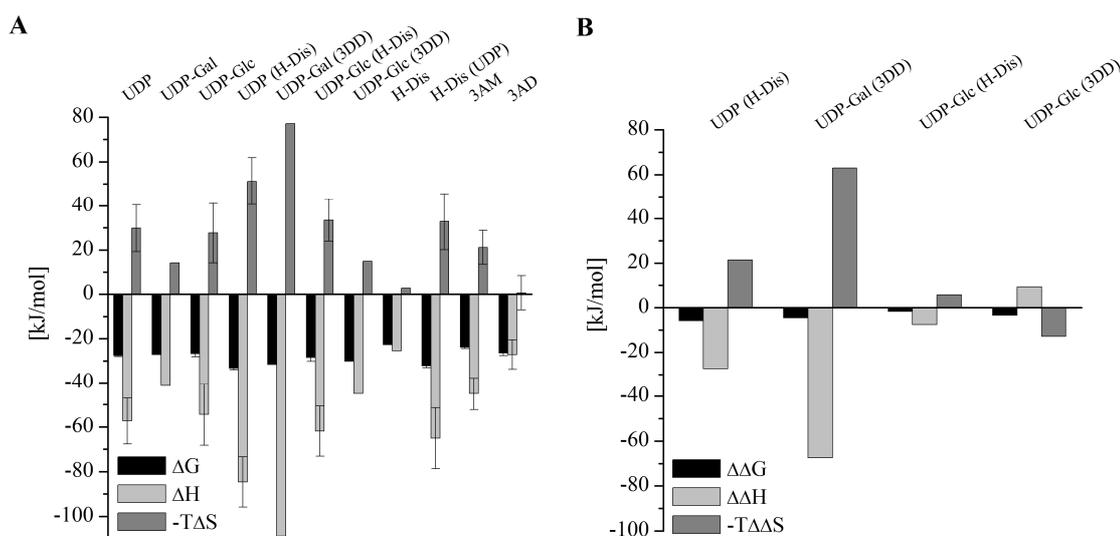


Abbildung 4.1 | Thermodynamischer Fingerabdruck verschiedener Substrate und Substratanaloga der GTB gemessen mit ITC. In (A) sind die thermodynamischen Parameter ΔG , ΔH und $-T\Delta S$ aus Tabelle 4.2 als Balkendiagramm dargestellt. In (B) ist die Änderung der thermodynamischen Parameter ($\Delta\Delta G$, $\Delta\Delta H$ und $-T\Delta\Delta S$ in kJ/mol) der Bindung der Donorsubstrate bei Zugabe sättigender Mengen eines Akzeptorsubstrats dargestellt. Die Abbildungen wurden aus (Sindhuwinata, Grimm et al. 2013) übernommen.

4.3 Bindungsstudien mit einem Inhibitor der humanen Blutgruppe A und B Glycosyltransferasen

Neben der Charakterisierung der Bindung von Substraten und Substratanaloga, können auch Inhibitoren der Glycosyltransferasen hilfreiche Informationen zum Mechanismus der Glycosyltransferasen liefern. Die Veränderung spezieller Glycosylierungsmuster sowie die Fehlfunktionen von Glycosyltransferasen können mit fatalen gesundheitlichen Schäden einhergehen. Aus diesen Gründen ist die Entwicklung von Inhibitoren der Glycosyltransferasen von großer Bedeutung. Der komplexe Reaktionsmechanismus der Glycosyltransferasen mit großen strukturellen Veränderungen bei Substratbindung macht es jedoch schwer, geeignete spezifische Inhibitoren zu entwickeln. Ein kürzlich von Rademacher et al. durchgeführtes Screening konzentrierte sich darauf, Inhibitoren der Akzeptorbindungsstelle zu identifizieren (Rademacher, Landstrom et al. 2010). Dabei zeigte Fragment **382** die besten inhibitorischen Eigenschaften. Mit STD-NMR- und SPR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Fragment **382** mit dem Akzeptorsubstrat H-Dis ($K_M = 88 \mu\text{M}$) mit einem IC_{50} -Wert von $790 \mu\text{M}$ um die Bindungsstelle konkurriert (Rademacher, Landstrom et al. 2010).

Um die Bindung dieses Fragmentes besser charakterisieren zu können, wurden in dieser Arbeit SPR- und STD-NMR-Experimente zur Bindung an GTA, GTB und AAGlyB durchgeführt. Die Untersuchungen fanden sowohl mit Mg^{2+} als auch mit Mn^{2+} statt. Zusätzlich wurde der Einfluss von UDP auf die Bindung des Fragmentes untersucht.

Für die SPR-Messungen wurden die drei Glycosyltransferasen GTA, GTB und AAGlyB mit Belegungsdichten von 4000 RU auf einen CM5-Sensorchip immobilisiert. Fragment **382** wurde

im entsprechenden Laufpuffer gelöst, für 3 min bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ über die Flusszellen gegeben und die entsprechenden Antworten gemessen. Die maximalen theoretischen RU lagen für dieses Fragment bei etwa 30 RU. Gemessen wurde in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25 °C) und 100 mM NaCl. Zusätzlich wurden die Bindungskonstanten in Anwesenheit von 5 mM Mg^{2+} oder Mn^{2+} sowie in Anwesenheit dieser Metallionen und zusätzlich 1 mM UDP gemessen. Durch Spülen des Systems zwischen den Messungen mit EDTA in MOPS-Puffer wurden alle Metallionen aus dem System entfernt. Bei den Sensorgrammen aller Messungen konnte sowohl der Assoziations- als auch die Dissoziationsvorgang beobachtet werden. Der Vorgang war jedoch recht schnell und ein Gleichgewicht stellte sich bereits nach der Hälfte der injizierten Ligandenlösung ein. Aus den Gleichgewichtsantworten wurden unter Verwendung der Langmuir-Gleichung die K_D -Werte sowie die RU_{max} -Werte bestimmt. Die maximalen RU-Antworten überstiegen die theoretisch maximalen 30 RU deutlich. Auch lieferte die Anpassung der Messdaten an ein Modell mit zwei Bindungsstellen einen deutlich kleineren Fehler als an ein Modell mit nur einer Bindungsstelle. Dies lässt darauf schließen, dass Fragment **382** zusätzlich unspezifisch an die Proteine bindet. Jedoch lag die unspezifische Affinität im millimolaren Bereich und konnte mit SPR-Experimenten nicht gemessen werden. Der Vergleich der Bindungskonstanten zeigte eindeutig, dass Fragment **382** eine deutlich stärkere Affinität gegenüber GTB als gegenüber GTA und AAGlyB hatte. Die Bindungskonstanten für die Messungen ohne Metall, mit Mg^{2+} bzw. Mn^{2+} zeigten keine Veränderungen in den Bindungskonstanten. Dies war nicht weiter verwunderlich, da die Bindung der bivalenten Kationen erst durch Bindung der Diphosphatgruppe des Donors im aktiven Zentrum gehalten wird. Auch die Anwesenheit von UDP bei den Messungen mit Mg^{2+} zeigte keine große Veränderung der Bindungskonstanten. Befand sich jedoch Mn^{2+} und UDP im Puffer, fand eine drastische Erhöhung der Bindungskonstanten statt. Daraus kann geschlossen werden, dass der UDP- Mn^{2+} -Komplex deutlich stärker an die Enzyme bindet als der UDP- Mg^{2+} -Komplex und dadurch deutlich schwerer vom Fragment **382** verdrängt werden konnte.

Um die Bindung von Fragment **382** an GTB besser charakterisieren zu können, wurden Bindungsepitope mittels STD-NMR erstellt. Mit Hilfe dieser kann bestimmt werden, welche Struktureinheiten nahe an der Proteinoberfläche liegen und welche eher weiter weg. Da Mn^{2+} paramagnetische Eigenschaften besitzt und in NMR-Spektren zu einer starken Verbreiterung der Signale führt, wurden die Experimente in Anwesenheit von Mg^{2+} durchgeführt. Es wurden die Bindungsepitope von Fragment **382** an GTB, von UDP an GTB sowie von Fragment **382** in Anwesenheit von UDP und von UDP in Anwesenheit von Fragment **382** erstellt. Da es sich jedoch aufgrund langer Messzeiten um Einzelbestimmungen handelte, wurde die Größe der STD-Effekte in drei Gruppen eingeteilt und so die Bindungsepitope untereinander verglichen. Es ist möglich, die Bindungsepitope anhand der relativen STD-Effekte bei einer bestimmten Sättigungszeit zu bestimmen (Mayer and Meyer 2001) oder anhand des Aufbaus des STD-Effektes (Mayer and James 2004), wie in dieser Arbeit verwendet. Dafür wurde für jedes Proton die STD-Aufbaukurve ermittelt und anhand der Steigung dieser Kurven mit einer Sättigungszeit von Null die Bindungsepitope bestimmt. Bei dieser Methode bleiben die Fehler, die durch Übertragung der Sättigung innerhalb des Liganden entstehen gering. Dabei ist auch wichtig,

dass gerade der Anfang der Kurve gut definiert ist. Jedoch zeigen gerade die Signale bei geringen Sättigungszeiten aufgrund des erst geringen Sättigungstransfers nur geringe Intensitäten.

Aus dem Bindungsepitop von Fragment **382** ist zu sehen, dass der Phenylrest eine geringfügig größere Sättigung aufwies als der Piperazinring. Desweiteren änderte sich das Bindungsepitop von Fragment **382** in Anwesenheit von UDP nur geringfügig. Auch das Bindungsepitop von UDP änderte sich durch Zugabe von Fragment **382** nur geringfügig. Aus diesen Ergebnissen konnte jedoch nicht auf eine Verdrängung von UDP bzw. des bivalenten Kations durch Fragment **382** geschlossen werden. Erst durch das Betrachten der STD-Aufbaukurven und den absoluten STD-Effekten konnte von einer gegenseitigen Verdrängung ausgegangen werden. Die absoluten STD-Effekte nahmen in beiden Fällen deutlich ab, was darauf zurückgeführt werden konnte, dass jeweils die andere Verbindung die Bindungsstelle besetzte. Damit konnte gezeigt werden, dass Fragment **382** und UDP einen kompetitiven Einfluss aufeinander haben.

Durchgeführte kompetitive Aktivitätstests zeigten ebenfalls, dass Fragment **382** spezifisch GTB mit einem K_i -Wert von $800 \mu\text{M}$ inhibiert (Jorgensen, Grimm et al. 2012). Getestet wurden neben GTB auch GTA, AAGlyB sowie drei weitere Glycosyltransferasen. Um die Bindung von Fragment **382** besser charakterisieren zu können, wurden Kristallstrukturen von GTB und AAGlyB in Anwesenheit von Fragment **382** hergestellt (Jorgensen, Grimm et al. 2012). Mit diesen Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, dass die Kristallstruktur GTB-**382** eine offene Konformation annimmt, wie sie für die ungebundene GTB berichtet wurden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Fragment **382** mit der Aminogruppe des Piperazinrings die Metallbindungsstelle belegt und durch das DXD-Motiv koordiniert wird. Der Rest des Fragmentes überlagerte mit der Bindungsstelle der β -Phosphatgruppe und ragte zusätzlich in die Akzeptorbindungsstelle. Es handelt sich also um einen Bissubstratinhibitor und die Verdrängung von UDP konnte dadurch deutlich gemacht werden. Auch in der Kristallstruktur AAGlyB-**382** bindet das Fragment in der gleichen Art. Jedoch lag das Enzym in einer halbgeschlossenen Konformation vor, wie es bei der Bindung von UDP der Fall ist. In der Kristallstruktur konnte neben der Elektronendichte von Fragment **382** auch Elektronendichte des Manganions sowie von UDP gemessen werden. Da diese sich aber mit der von Fragment **382** überlagern, ist es unwahrscheinlich, dass beide Verbindungen gleichzeitig binden. Dies erklärt auch die halbgeschlossene Konformation. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit den gemessenen Bindungskonstanten überein, bei denen die Affinität in Anwesenheit von UDP und Mn^{2+} bei der AAGlyB deutlich schwächer wird als bei der GTB. Mit den Kristallstrukturen konnte Argumentiert werden, dass vor allem die dritte der vier kritischen Aminosäuren 266 für die Spezifität des Inhibitors verantwortlich ist. Die starke Bindung an GTB wurde mit einer passenden Bindungstasche erklärt, die sich bei AAGlyB durch Gly in Position 235 und 266 vergrößert, was zu einer schwächeren Bindung führte. Die Bindung und Aktivität von Fragment **382** an die GTA ist nur geringfügig schlechter als bei der GTB. GTA besitzt an Position 235 ebenfalls ein Gly und an Position 266 anstelle eines Met ein Leu, wodurch die Bindungstasche ebenfalls vergrößert wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Fragment **382** als spezifischer Inhibitor der Blutgruppen Glycosyltransferasen dient und sowohl die Akzeptor, als auch die

Donorbindungsstelle blockiert. Fragment **382** bindet bevorzugt an GTB. Die Bindungstasche spielt eine große Rolle bei der Selektivität des Inhibitors, vor allem der Aminosäurerest 266, der auch für die Diskriminierung zwischen UDP-Gal und UDP-GalNAc verantwortlich ist. Fragment **382** ist demnach nicht nur ein vielversprechender Vorläufer für die weitere Entwicklung von Inhibitoren, sondern kann auch zum Verständnis des Reaktionsmechanismus beitragen.

4.4 Präparation isotopenmarkierter GTB

Die zuvor diskutierten Daten zeigen erneut, wie komplex der Reaktionsmechanismus der Glycosyltransferasen und die damit verbundenen konformationellen Veränderungen in der Struktur sind. Eine Möglichkeit, Proteindynamik auf atomarer Ebene zu untersuchen, ist die NMR-Spektroskopie. Hierbei können dynamische Prozesse im Bereich von Pikosekunden bis hin zu Sekunden untersucht werden (Mittermaier and Kay 2009). Auch ist es möglich, die Bindungsprozesse der Substrate von der Proteinseite aus zu betrachten und dadurch weitere Informationen über die Katalyse zu erhalten (Shuker, Hajduk et al. 1996; Williamson 2013). Für solche Untersuchungen ist eine Isotopenmarkierung der Proteine sowie die Zuordnung der Signale erforderlich.

Die Isotopenmarkierung der GTB sowie erste NMR-spektroskopische Untersuchungen wurden bereits von N. Sindhuwinata getestet und durchgeführt (Sindhuwinata 2012). Es konnte gezeigt werden, dass es möglich war, isotopenmarkierte GTB herzustellen, wenn auch mit geringeren Ausbeuten als bei der unmarkierten GTB. Durch eine Deuterierung der Proteine konnte die Auflösung sowie Sensitivität verbessert werden. Es machte keinen Unterschied ob Bis-Tris- oder Phosphatpuffer verwendet wurde. Da mit der Methode nach Marley et al. keine vollständige Deuterierung erreicht werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere Methode der Proteinpräparation getestet. Dafür wurden zwei $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -markierte Proben hergestellt. Eine wie in den Arbeiten zuvor nach dem Protokoll von Marley et al. (Marley, Lu et al. 2001) und eine weitere nach dem Protokoll von Tugarinov et al. (Tugarinov, Kanelis et al. 2006). Das Protokoll von Marley et al. sieht vor, dass die Zellen zunächst in Vollmedium angezogen werden, durch Waschen in Minimalmedium überführt und anschließend induziert werden. Dadurch soll gewährleistet werden, dass eine gewisse Zellmasse für die Induktion vorhanden ist. Jedoch sind auch nach dem Waschen noch unmarkierte Substanzen in den Zellen, die für die Proteinsynthese verwendet werden können, wodurch die Deuterierung der Proteine nicht zu 100 % erfolgen kann. Bei dem Protokoll nach Tugarinov et al. werden die Zellen nach einer kurzen Anwuchsphase in Vollmedium ebenfalls durch Waschen in Minimalmedium überführt, dort wachsen gelassen und mit der Zeit jeweils frisches Minimalmedium zugesetzt. So sollte gewährleistet werden, dass zum Zeitpunkt der Induktion keine unmarkierten Substanzen in der Zelle vorhanden sind und die Zellen durch Zugabe von frischem Minimalmedium genug Nährstoffe zum Wachsen haben. Die Ausbeuten der im Minimalmedium synthetisierten Proteinproben lagen deutlich unter der im Vollmedium synthetisierten Proteinproben. Dabei lag die Ausbeute bei der nach Marley et al. synthetisierten Proteinprobe bei 34 mg pro Liter Kultur und die nach Tugarinov et al. bei nur 18 mg pro Liter.

Die reduzierte Ausbeute könnte daran gelegen haben, dass die Zellen im Minimalmedium schlechter gewachsen sind als im Vollmedium. Jedoch zeigten alle weiteren nach Tugarinov et al. hergestellten Proteinpräparationen eine vergleichbare Ausbeute zwischen 24 und 35 mg pro Liter Kultur. Die Qualitätskontrollen zeigten, dass beide Präparationen gut gereinigt wurden und die Aktivitäten beider Proben vergleichbar waren. Sie lagen bei 10 bzw. 12 U/mg und damit im Bereich aktiver GTB. Der Deuterierungsgrad konnte anhand von Protonenspektren verglichen werden und war bei der nach Tugarinov et al. hergestellten Proteinprobe deutlich höher. Da der Grad der Deuterierung ein essentieller Punkt bei der Aufnahme von NMR-Spektren mit GTB ist, insbesondere für die Aufnahme von Tripelresonanzspektren sowie Methyl-TROSY-Spektren, wurde im Folgenden nur noch die Methode nach Tugarinov et al. verwendet.

Die selektive Markierung der δ^1 -Methylgruppen der Isoleucine für die Aufnahme von Methyl-TROSY-Spektren verlief erfolgreich. Auch die Proteinausbeuten sowie Aktivitäten waren vergleichbar mit vorherigen Proteinpräparationen. Die Deuterierung konnte im Vergleich zu den Proben davor sogar noch deutlich verbessert werden. Woran das lag, kann nicht genau gesagt werden. Der einzige Unterschied war das deutlich geringere Volumen bei der Proteinsynthese. Die erfolgreiche selektive Markierung wurde mit Methyl-TROSY Experimenten überprüft (Ollershaw, Tugarinov et al. 2003). In den Spektren waren zehn intensive Signale für jedes der zehn Isoleucine der GTB sowie ein schwaches Signal zu erkennen. Wie schon weiter oben diskutiert, ist die Zuordnung der Signale für weitere Untersuchungen von großer Bedeutung. Eine Möglichkeit der Zuordnung ist die Korrelation der Methylgruppen mit den Amidprotonen im Proteinerückgrat (Tugarinov and Kay 2003). Dafür müssten alle Kohlenstoffatome der Isoleucinseitenkette mit ^{13}C markiert sowie das Rückgrat mit ^{15}N markiert werden. Damit könnte die Magnetisierung von der Methylgruppe auf die Amidgruppe übertragen werden und die Korrelation der beiden Signale in einem 3D-Spektrum detektiert werden. Allerdings ist dafür die Zuordnung der Amidgruppe erforderlich, was bei der GTB jedoch nicht der Fall war. Eine weitere Methode ist die selektive Mutagenese der Isoleucine. Hierbei wird eine Mutation auf DNA-Ebene eingefügt, wodurch in der Proteinsynthese anstelle eines Isoleucins eine andere Aminosäure eingefügt wird. Von den zehn Isoleucinen in der GTB sind zwei besonders interessant. Das Isoleucin an Position 123 steht im Kontakt mit dem Donorsubstrat und das Isoleucin an Position 192 befindet sich am Rand des internen Loops. Anhand dieser beiden sollte die Dynamik im Protein weiter untersucht werden. Bei der Mutation von Aminosäuren ist es wichtig, darauf zu achten, dass durch die Mutation die Veränderungen im Rest des Proteins möglichst klein gehalten werden. Andernfalls kann es passieren, dass die Mutante nicht synthetisiert bzw. falsch gefaltet wird, was eine Verschiebung der Signale zur Folge hat und eine eindeutige Zuordnung nicht mehr möglich ist. Aus diesem Grund wurden die Isoleucin durch Valine ersetzt. Diese besitzen lediglich eine Methylgruppe weniger. Jedoch konnte trotz der nur geringen Änderung die Mutante I123V nicht erfolgreich hergestellt werden. Es wurde vermutet, da das Isoleucin an Position 123 wichtig für die Bindung von UDP ist, da die Mutante nicht an die Affinitätschromatographie band. Es wurde daher die Reinigung nach der Ionenaustauschchromatographie beendet und die Probe konzentriert und ein Methyl-TROSY-Spektrum aufgenommen. Da die Mutante überexprimiert wurde und die Methylgruppen selektiv markiert waren, könnten bereits in dem nicht vollständig gereinigten Produkt die Signale der

I123V Mutante sichtbar sein. Dies war allerdings nicht der Fall, was neben der verringerten Affinität gegenüber UDP auch auf eine deutlich verringerte Syntheserate schließen ließ. Im Gegensatz dazu war es möglich die I192V Mutante zu synthetisieren und zu reinigen. Jedoch war auch hier die Ausbeute mit 5 mg pro Liter Kultur sehr gering, reichte aber für die Aufnahme eines Methyl-TROSY-Spektrums aus und es konnte die Zuordnung des Signals von Ile 192 erfolgen.

Es kann zusammengefasst werden, dass der Deuterierungsgrad der isotoopenmarkierten GTB-Proben durch Verwendung des Protokolls nach Tugarinov et al. (Tugarinov, Kanelis et al. 2006) deutlich gesteigert werden konnte und es keinen Verlust in der Ausbeute der Proteinmenge gab. Auch die selektive Markierung der δ^1 -Methylgruppen der Isoleucine verlief erfolgreich und es konnte die Zuordnung des Signals des Isoleucins 192 durchgeführt werden. Anhand dieser Proben konnten nun Untersuchungen zur Struktur und Dynamik der GTB durchgeführt werden.

4.5 Struktur- und Dynamikuntersuchungen der GTB

Für Struktur- und Dynamikuntersuchungen von Proteinen mit NMR-Spektroskopie ist eine Zuordnung der Signale in dem zugehörigen HSQC-Spektrum unerlässlich. Hierfür wurden von N. Sindhuwinata bereits erste Tripelresonanzexperimente durchgeführt (Sindhuwinata 2012). In den Spektren konnten jedoch nur sehr wenige Kerne miteinander korreliert werden und eine Zuordnung war nicht möglich. Es sollte nun versucht werden, durch Erhöhung des Grads der Deuterierung und der Proteinkonzentration die Qualität der Spektren zu verbessern. Durch die Verwendung des neuen Protokolls für die Proteinsynthese konnte der Grad der Deuterierung deutlich verbessert und die Konzentration der $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N -markierten GTB-Probe von 250 μM auf 1 mM erhöht werden. Mit dieser Probe wurden Tripelresonanzexperimente bei einer Feldstärke von 950 bzw. 600 MHz aufgenommen. Das als Grundlage verwendete ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum wurde ebenfalls bei einer Feldstärke von 950 MHz aufgenommen und war mit 294 Signalen von 351 erwarteten vergleichbar mit dem ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum von N. Sindhuwinata welches 308 Signale zeigte. Die fehlenden Signale könnten vom fehlenden sowie unvollständigen Austausch der Amidprotonen sowie durch ungünstige Relaxationseigenschaften aufgrund von konformationellen Bewegungen im Mikrosekunden- bis Millisekundenbereich kommen. Das Spektrum wurde bei 950 MHz aufgenommen um eine möglichst hohe Auflösung zu bekommen. Jedoch gab es auch bei dieser Feldstärke Regionen in denen eine starke Signalüberlagerung zu erkennen war und nicht komplett aufgelöst werden konnten. Unter anderem war das die Region, in der die Signale der Amide der Asparagin- und Glutaminseitenketten liegen. Diese waren auch in den Tripelresonanzexperimenten deutlich zu sehen und erschwerten die Auswertung erheblich. Die Signale waren deutlich intensiver und eine komplette Phasenkorrektur war nicht möglich, was eine starke Überlagerung mit den Amidsignalen des Proteinrückgrates zur Folge hatte. Die Qualität der aufgenommenen Tripelresonanzspektren konnten im Vergleich zu den Spektren von N. Sindhuwinata deutlich verbesserte werden. Dennoch gab es viele Signalüberlagerungen sowie viele fehlende Signale, wodurch keine vollständige Signalzuordnung möglich war. Es konnten jedoch einige Korrelationen identifiziert werden. Hierbei handelte es sich um Korrelationen zwischen zwei,

drei, vier und sechs Aminosäureresten. Mit Hilfe des HNCACB-Spektrums ist es möglich, aufgrund spezifischer Verschiebungsmuster spezielle Aminosäurereste zu identifizieren (Sattler, Schleucher et al. 1999). Mit Hilfe dieses Spektrums konnte allerdings nur die spezifische Zuordnung der sechs korrelierenden Aminosäuren erfolgen, alle weiteren konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Bei den sechs korrelierenden Aminosäureresten handelt sich um die Positionen 161 bis 166 (Arg-Val-Thr-Leu-Gly-Thr). Die Lage dieser sechs Aminosäurereste ist unerwartet und in Abbildung 4.2 dargestellt. Da diese sechs korrelierenden Aminosäuren die einzigen sind, bei denen eine Zuordnung möglich war, hätte angenommen werden können, dass sie sich in einer stabilen Sekundärstruktur, wie einem β -Faltblatt, einer α -Helix oder in der Mitte des Dimers liegen. Jedoch befinden sie sich dem Lösungsmittel zugewandt am Rande des Proteins kurz vor dem internen Loop. Obwohl eine vollständige Signalzuordnung nicht das Ziel dieser Arbeit war, sondern auch eine partielle Zuordnung gereicht hätte, liefern die hier zugeordneten Aminosäurereste wahrscheinlich nur geringe Informationen über Dynamik- und Bindungsvorgänge des Enzyms.

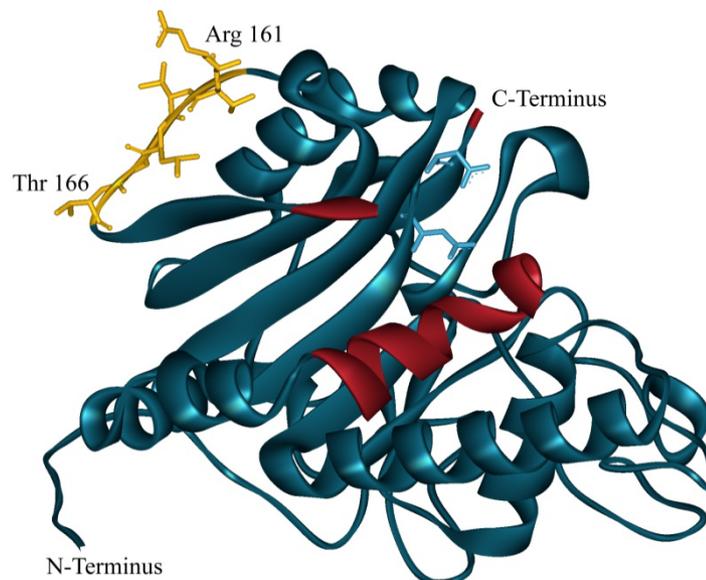


Abbildung 4.2 | Durch NMR-Spektroskopie zugeordnete Aminosäurereste der GTB. Dargestellt ist die löslichen katalytische Domäne von GTB in Abwesenheit von Substraten (PDB ID: 2RIT). Der interne Loop und der C-Terminus ist in rot, das DXD-Motiv in hellblau und die zugeordneten Aminosäurereste in Gelb dargestellt. Aufgrund von fehlender Elektronendichte fehlen die Aminosäurereste 177-180 des internen Loops und die Aminosäurereste 346-354 des C-Terminus (Alfaro, Zheng et al. 2008).

Da wie bereits erwähnt der fehlende bzw. langsame Austausch der Amidprotonen dazu geführt haben könnte, dass nicht alle Signale in den NMR-Spektren sichtbar waren, wurde dieser mit $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren untersucht. Direkt nach Austausch in D_2O -haltigen Puffer waren nur noch etwa acht Amidprotonensignale zu sehen. Vermutlich stammten diese von Amidgruppen, die geschützt im Kern der GTB lagen und daher nur schwer dem Lösungsmittel zugänglich waren. Jedoch konnten bereits nach einem Tag keine Amidprotonensignale mehr detektiert werden, diese Informationen sind vor allem für die Messungen von Methyl-TROSY-

Spektren von großer Bedeutung, da hierfür eine größtmögliche Deuterierung vorliegen sollte. Aus der anschließenden Titration mit H₂O-haltigem Puffer konnte gezeigt werden, dass die Protonen der GTB größtenteils schnell ausgetauscht haben, es jedoch auch Bereiche gab, in denen ein etwas langsamerer Austausch vorhanden war. Da jedoch keine Zuordnung der Signale vorlag, konnten daraus keine weiteren Informationen gezogen werden.

Auch bei der Untersuchung der Bindung von UDP an GTB mit ¹H,¹⁵N-TROSY-HSQC-Spektren konnte aufgrund der fehlenden Zuordnung keine Aussagen über spezielle Aminosäureseitenketten gemacht werden. Die Signale verhielten sich jedoch sehr unterschiedlich. Es kamen bei Erhöhung der UDP-Konzentration Signale hinzu bzw. es verschwanden Signale. Auch konnte wie bereits in den Arbeiten von F. Flügge der Abbau von UDP zu Uracil beobachtet werden (Flügge 2014). Da die Linienbreite der UDP-Signale deutlich größer war als die der Uracil-Signale und die Affinität von UDP zu GTB deutlich größer ist als die von Uracil, konnte davon ausgegangen werden, dass hauptsächlich UDP an GTB gebunden hat. Zusätzlich konnte in weiteren Experimenten der Abbau von UDP nicht weiter beobachtet werden, woraus geschlossen werden konnte, dass es vermutlich an der Proteinpräparation lag. Wichtig für die Auswertung war jedoch, dass UDP nicht in den angegebenen Konzentrationen vorlag und daher nur eine Auswertung auf quantitativer Ebene durchgeführt werden sollte. Etwa 22 % der Signale zeigten eine deutliche Veränderung der chemischen Verschiebung durch Erhöhung der UDP-Konzentration. Ohne eine Zuordnung der Signale ist es nicht möglich zu sagen um welche Bereiche im Protein es sich handelt. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass sich diese nahe der UDP-Bindungsstelle befinden, bzw. in den flexiblen Bereichen, die sich bei Substratbindung einer konformationellen Änderung unterziehen. Unterschieden werden konnten Signale, bei denen sich bereits ab der ersten UDP-Konzentration die chemische Verschiebung änderte und Signale, die erst bei höheren UDP-Konzentrationen eine Veränderung der chemischen Verschiebung erfuhren. Zusätzlich konnten zwei Signale identifiziert werden, die sich im langsamen Austausch befanden. Dies zeigt zu welchen komplexen strukturellen Veränderungen im Protein die Bindung von UDP führt.

Gerade diese Experimente zeigen erneut, wie wichtig eine zumindest partielle Zuordnung der Signale ist, um gezielte Informationen über bestimmte Bereiche des Proteins und den Mechanismus zu erhalten. Aufgrund der Größe und den Relaxationseigenschaften der GTB war die Zuordnung mit Hilfen von Tripelresonanzexperimenten nicht erfolgreich. Daher sollte ein Markierungsschema, bei dem die Methylgruppen bestimmter Aminosäurereste protoniert sowie ¹³C markiert, bei einem ansonsten uniform ²H,¹⁵N-markierten Protein vorliegen, angewandt werden (Rosen, Gardner et al. 1996; Kay 2005; Tugarinov, Kanelis et al. 2006). Aufgrund der deutlich geringeren Anzahl an Signalen und der erhöhten Sensitivität der Methylgruppen im Gegensatz zu den Amidn, ist diese Methode besonders für große Proteine, wie die GTB, von Vorteil. In dieser Arbeit wurden die δ 1-Methylgruppen der Isoleucinseitenketten selektiv markiert. Die GTB besitzt zehn Isoleucine, die über das Protein verteilt sind und daher einen guten Überblick über das gesamte Protein liefern können. Wie bereits unter 4.4 diskutiert, verlief die selektive Markierung sowie die Aufnahme der Methyl-TROSY-NMR-Experimente erfolgreich. Durch Mutagenese konnte das Signal für die Methylgruppe des Isoleucins an

Position 192 erfolgreich zugeordnet werden. Dieses befindet sich am Rand des internen Loops und ist daher von großem Interesse für strukturelle und dynamische Untersuchungen. Durch Titration der $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierten GTB-Probe mit UDP und H-Dis konnte zusätzlich das Signal des Isoleucins an Position 123 identifiziert werden. Bei Zugabe von UDP verschoben sich nur zwei Signale deutlich, eins davon war das Ile 192. Wie in Abbildung 4.3 zu sehen, ist das Ile123 bei der Bindung von UDP beteiligt, weshalb das zweite Signal Ile 123 zugeordnet wurde.

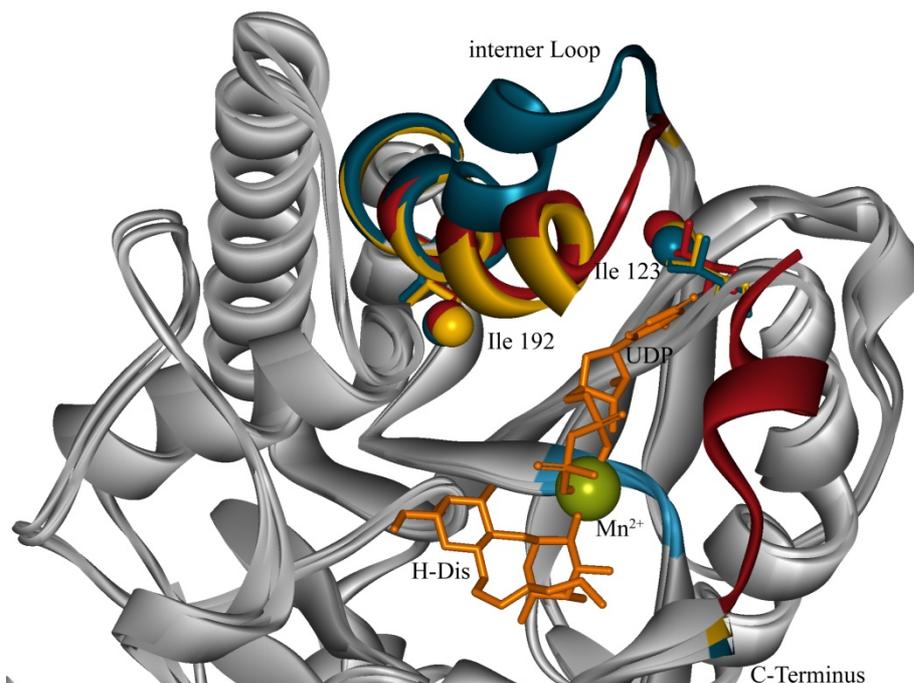


Abbildung 4.3 | Überlagerung der offenen (blau), halbgeschlossenen (gelb) und geschlossenen (rot) Konformation von ABBB. Gezeigt ist die Überlagerung einer offenen (PDB ID: 2RIZ) Konformation ohne Substrate, einer halbgeschlossenen (PDB ID: 2RJ0) mit UDP und einer geschlossenen (PDB ID: 2RJ1) Konformation mit UDP (orange), H-Dis (orange) und Mn^{2+} (grün) des chimeren Enzyms ABBB (Alfaro, Zheng et al. 2008). Die $\delta 1$ -Methylgruppen von Ile 123 und Ile 192 sind als Kugel abgebildet und das DXD-Motiv ist in hellblau dargestellt.

Durch Erhöhung der UDP-Konzentration fand eine kontinuierliche Verschiebung der beiden Signale statt, was auf einen schnellen Austausch zwischen der offenen und der halbgeschlossenen Form hindeutet. Auch bei der anschließenden Zugabe von H-Dis verschoben sich beide Signale kontinuierlich, jedoch hier hauptsächlich in der ^{13}C -Dimension. Anhand dieser chemischen Verschiebungsänderungen konnte der K_D -Wert beider Vorgänge berechnet werden. Diese lagen für UDP bei $76 \pm 16 \mu\text{M}$ und für H-Dis in Anwesenheit von UDP bei $4,3 \pm 5,2 \mu\text{M}$. Der K_D -Wert für UDP liegt um einen Faktor von 6,9 unterhalb des K_D -Wertes von $710 \pm 90 \mu\text{M}$, der mit Hilfe von SPR-Experimenten bestimmt wurde. Für den K_D -Wert von H-Dis in Anwesenheit von UDP liegt ein K_D -Wert von $7 \mu\text{M}$ als Vergleichswert aus ITC-Messungen vor (Sindhuwinata 2012) und ist damit vergleichbar mit dem hier bestimmten K_D -Wert. Obwohl sich gerade die Werte für UDP deutlich unterscheiden, kann trotzdem davon ausgegangen werden, dass die hier gemessenen NMR-Spektren die Bindung von UDP gut wiedergeben und die Unterschiede in den K_D -Werten durch die unterschiedlichen Techniken entstehen. Auch

kann aus diesen Experimenten eine untere Abschätzung der Austauschraten zwischen den jeweiligen Zuständen gemacht werden. Da es sich um einen schnellen Austausch zwischen dem offenen und halbgeschlossenen sowie zwischen dem halbgeschlossenen und geschlossenen Zustand handelt, ist die Austauschrate (k_{ex}) deutlich größer als die Differenz der chemischen Verschiebungen ($|\Delta\nu|$) (Mittermaier and Kay 2009). Die Differenz der chemischen Verschiebungen zwischen offenem und halbgeschlossenem Zustand liegen sowohl bei der ^1H -chemischen Verschiebung als auch bei der ^{13}C -chemischen Verschiebung für Ile 123 und Ile 192 im Mittel bei etwa 36 s^{-1} . Bei Zugabe von H-Dis zu GTB in Anwesenheit von UDP und damit einer Veränderung von der halbgeschlossenen in die geschlossene Konformation, verschieben sich die Signale nur sehr gering in der ^1H -Dimension, aber um 21 s^{-1} beim Ile 123 und um 40 s^{-1} beim Ile 192 in der ^{13}C -Dimension. Die Austauschraten sollten also deutlich oberhalb dieser Werte und damit im Millisekundenbereich oder schneller liegen.

Um Bewegungen im Mikro- bis Millisekundenbereich zu untersuchen wurden CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente durchgeführt. Hierfür mussten zuerst die experimentellen Bedingungen festgelegt werden. Ein wichtiger Parameter bei den Messungen ist die Länge der Mischzeit. Je länger die Mischzeit, desto mehr Zeit hat das Protein zu relaxieren und desto kleiner werden die Signale. Für die GTB wurde eine Mischzeit von 20 ms verwendet. Diese liegt im unteren Bereich von Proteinen. Bereits daraus kann geschlossen werden, dass die GTB eine schnelle Dynamik besitzt. Es ist auch anzumerken, dass sich die Bewegungen mit der Temperatur und der Lage der Isoleucine im Protein unterscheiden. Daher sollten, falls möglich, für unterschiedliche Signale und Temperaturen unterschiedliche Mischzeiten gewählt werden. Dies ist jedoch sehr zeitintensiv und daher meist nicht durchführbar. Die Messungen wurden für alle Signale und alle Temperaturen mit derselben Mischzeit durchgeführt. Bei den CPMG-Relaxations-Dispersions Messungen ohne Substrat konnte bei keinem der Signale Dispersion beobachtet werden. Erst durch Zugabe von UDP war bei dem Signal des Ile 192 Dispersion zu beobachten, welche durch anschließende Zugabe von H-Dis wieder verschwand. Auch Ile 123 zeigte bei Zugabe von UDP eine geringe Dispersion, die aufgrund der großen Fehler jedoch nicht weiter interpretiert wurde. Da sich Ile 192 am Rande des internen Loops befindet, ist es nicht verwunderlich, dass sich dieses anders verhält als die anderen Isoleucine. Durch Zugabe von UDP und H-Dis erfährt dieses eine deutliche Veränderung in der Dynamik. Ist kein Substrat vorhanden, kann angenommen werden, dass sich der interne Loop in einer offenen unstrukturierten Konformation befindet. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein schneller Austausch zwischen offenem und geschlossenem Zustand stattfindet. Dieser liegt, falls vorhanden, jedoch in einem Zeitbereich der mit CPMG-Relaxations-Dispersions Messungen nicht mehr wahrgenommen werden kann. Befindet sich nun UDP in der Substratbindungsstelle, wird die Bewegung des internen Loops verlangsamt und sie rutscht in das Zeitfenster, das mit CPMG-Relaxations-Dispersions Experimenten gemessen werden kann. Allerdings war dies nur bei niedrigeren Temperaturen zu beobachten, woraus geschlossen werden kann, dass sich die Bewegung des internen Loops vermutlich im schnellen Mikrosekundenbereich befindet. Bei Temperaturen von $25\text{ }^\circ\text{C}$ war keine Dispersion mehr zu beobachten. Diese Ergebnisse könnten auch ein Hinweis auf die halbgeschlossenen Konformation sein, wie sie in Kristallstrukturen nachgewiesen wurde (Alfaro, Zheng et al.

2008). Die Dispersion bei den geringeren Temperaturen weist auch darauf hin, dass sich die halbgeschlossene Konformation im Austausch mit einer anderen Konformation befindet. Es liegt nahe, dass es sich hierbei um die offene Konformation handelt und erst durch Bindung von H-Dis sich die geschlossene Konformation ausbildet in der sich sowohl der interne Loop als auch die C-terminale Schleife über das aktive Zentrum legen. Es ist jedoch nochmal anzumerken, dass es sich hier um die δ 1-Methylgruppe eines Isoleucins handelt, welches am Rand des internen Loops liegt und dadurch eventuell nicht die Bewegungen des internen Loops widerspiegelt. Im restlichen Protein konnten keine Veränderungen in der Dynamik bei Substratbindung beobachtet werden, daher wird angenommen, dass schnellere Bewegungen vorliegen, als mit CPMG-Relaxations-Dispersions Experimenten gemessen werden können.

Eine Möglichkeit schnellere Bewegungen im niedrigen Mikrosekunden Bereich zu messen sind sogenannte *rotating frame* Relaxations-Dispersions-Messungen (Kleckner and Foster 2011; Vallurupalli, Bouvignies et al. 2011). Bei diesen Experimenten werden anstelle von spin-echo Pulsen, wie sie bei CPMG-Frequenzen genutzt werden, spin-lock Pulse eingesetzt. Dadurch können höhere Frequenzen erreicht werden, mit denen schnellere Austauschraten nachgewiesen werden können. Die verwendeten GTB-Proben mit spezifisch markierten Methylgruppen eigneten sich sehr gut für die hier durchgeführten Struktur- und Dynamikuntersuchungen und sollten ebenfalls für weitere Experimente eingesetzt werden. Auch die Verwendung von weiteren selektiv markierten Methylgruppen in zum Beispiel Alanin, Leucin, Valin oder Methionin können vielversprechende Informationen und einen größeren Gesamtüberblick über die Dynamik der GTB liefern. Jedoch ist auch hier die Zuordnung der Signale unerlässlich. Sie kann durch Mutagenese erfolgen, dies ist jedoch sehr zeitaufwändig und es könnte sich zusätzlich durch Veränderung eines Aminosäurerestes die chemischen Verschiebungen in den NMR-Spektren ändern, wodurch eine Zuordnung erschwert wird.

Eine weitere Möglichkeit der Zuordnung ist die Verwendung von paramagnetischen Metallionen. Hierfür sind lediglich die dreidimensionale Struktur, zum Beispiel aus Röntgenstrukturanalysen, und eine Bindungsstelle für ein paramagnetisches Metallion nötig. Da beides bei der GTB vorhanden ist, sollte in dieser Arbeit die Verwendung von paramagnetischen Metallionen getestet werden. Neben strukturellen Untersuchungen können mit Hilfe von paramagnetischer NMR-Spektroskopie auch Informationen über Substratbindung sowie über Austauschprozesse erhalten werden (Otting 2010). Für die hier durchgeführten Experimente, wurde die Bindung von verschiedenen Lanthanoiden getestet. Hierfür wurden zuerst Aktivitätstests durchgeführt. Jedoch zeigte die GTB bei keinem der verwendeten Lanthanoide Aktivität. Dadurch konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Lanthanoide nicht an in der Metallbindungsstelle binden, sondern lediglich, dass die Übertragung der Galactoseeinheit nicht stattgefunden hat. Dies könnte an dem größeren Ionenradius der Lanthanoide gegenüber Mn^{2+} bzw. Mg^{2+} liegen (Su and Otting 2010). Deshalb wurde mit SPR-Experimenten die Bindung von UDP an GTB in Anwesenheit der Lanthanoide untersucht. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass UDP ohne Metallion die GTB nicht bindet und daher auch keine Antworten in den SPR-Messungen detektierbar waren. Die Messungen mit den Lanthanoiden unterschieden sich deutlich von denen mit Mg^{2+} bzw. Mn^{2+} . Es konnten keine Rechteckkurven beobachtet werden und die Basislinie stieg kontinuierlich an. Auch

wurden bei den Messungen mit Yb^{3+} negative Antworten gemessen. Jedoch konnten bei allen verwendeten Lanthanoiden eine Bindung von UDP an GTB beobachtet werden, woraus geschlussfolgert werden konnte, dass eine Bindung von UDP an GTB mit den Lanthanoiden möglich ist. Erste NMR-Experimente mit Gadolinium sowie Lanthan als Referenz zeigten, dass es möglich ist, anhand der PREs eine abstandsabhängige Zuordnung zu machen. Allerdings sind die Unterschiede der Abstände zwischen einigen δ 1-Methylgruppen der Isoleucine und dem Manganion, die aus der Kristallstruktur berechnet wurden, sehr gering. Die Zuordnung der Signale sollte daher nur als eine vorläufige Zuordnung betrachtet werden. Eine Möglichkeit, die Zuordnung zu bestätigen, ist die Messung von PCSs. Diese beeinflussen die Signale nicht nur abstandsabhängig durch den PRE-Effekt, sondern auch aufgrund der räumlichen Orientierung zum Paramagneten. Jedoch wurde aus den NMR-Spektren ersichtlich, dass sowohl das hier getestete Dysprosium als auch das Ytterbium in unterschiedlichen Konformationen die GTB binden. Daher war es nicht möglich, PCSs zu bestimmen und die Zuordnung zu bestätigen. Aus diesem Grund sind Struktur- und Dynamikuntersuchungen mit Hilfe von Lanthanoiden mit der GTB nicht zu empfehlen. Falls weitere Untersuchungen gemacht werden sollten, ist eine Verwendung von speziellen Tags die Lanthanoide fest in einer Konformation binden von Vorteil (Bertini, Luchinat et al. 2005; Su, McAndrew et al. 2008; Su and Otting 2010; Koehler and Meiler 2011).

4.6 Charakterisierung der strukturellen Dynamik der West-Nil-Virus Protease

Neben den NMR-spektroskopischen Untersuchungen der GTB, sollte in dieser Arbeit auch die Dynamik der WNV-Protease genauer untersucht werden. Die WNV-Protease ist verantwortlich für die proteolytische Spaltung des viralen Polyproteins und stellt damit ein attraktives Ziel für die Entwicklung von Inhibitoren dar. Kristallstrukturen zeigten, dass die C-terminale Domäne von NS2B in An- und Abwesenheit eines Inhibitors unterschiedliche Konformationen annimmt (Aleshin, Shiryaev et al. 2007). Zum einem nimmt sie ohne Inhibitor eine offene Konformation an, bei der sich die C-terminalen Domäne von NS2B weit weg vom aktiven Zentrum befindet und mit Inhibitor nimmt sie eine geschlossene Konformation an, bei der sich die C-terminale Domäne von NS2B um NS3 herum legt und so das aktive Zentrum bildet. NMR-Experimente zeigten aber auch, dass ohne die Anwesenheit eines Inhibitors die geschlossene Konformation vorliegt und diese durch Bindung eines Inhibitors lediglich verstärkt wird (Su, Ozawa et al. 2009). Da die C-terminale Domäne von NS2B essentiell für die katalytische Aktivität der Protease ist (Chappell, Stoermer et al. 2008; Radichev, Shiryaev et al. 2008), wird vermutet, dass die geschlossene Konformation Voraussetzung für eine vollständige katalytische Aktivität ist (Su, Ozawa et al. 2009). Eine Inhibition der Protease kann daher nicht nur durch kompetitive Bindung eines Inhibitors im aktiven Zentrum erfolgen, sondern auch durch Inhibierung der Konformationsänderung der C-terminalen Domäne von NS2B und der daraus resultierenden Bildung des aktiven Zentrums. In dieser Arbeit sollte nun die Dynamik der WNV-Protease ohne Inhibitor und in Anwesenheit zwei bekannter Inhibitoren untersucht werden, um eine Grundlage für die Entwicklung weiterer Inhibitoren zu schaffen.

Es wurden, wie bei der GTB, die δ^1 -Methylgruppen der Isoleucine selektiv markiert. Die Synthese sowie Markierung verlief erfolgreich. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch Herabsetzen der Temperatur nach der Induktion von 37 °C auf 17 °C die Bildung von *inclusion bodies* verringert und dadurch die Ausbeute erhöht wurden. In den Protonenspektren waren noch Amidprotonen des Proteinrückgrats sichtbar, das heißt, dass bei der WNV-Protease der Austausch deutlich langsamer stattfand als bei der GTB. Jedoch konnte auch hier ein sehr guter Deuterierungsgrad erreicht werden und die Aufnahme von Methyl-TROSY-NMR-Spektren war möglich. In den Spektren ohne Inhibitor waren jedoch nur zehn der erwarteten elf Ile-Signale sichtbar. Dabei war das Signal von Ile 123 sehr breit und kaum detektierbar, das Signal von Ile 162 war überhaupt nicht detektierbar und das Signal Ile 155 war zwar sehr intensiv, aber auch sehr breit. Diese drei Isoleucine befinden sich an der Kontaktfläche zwischen NS3 und der C-terminalen Domäne von NS2B im geschlossenen Zustand. Da die WNV-Protease auch ohne Inhibitor hauptsächlich in der geschlossenen Konformation vorliegt bzw. sich im Austausch mit der offenen Konformation befindet, könnten die Linienverbreiterungen der drei Isoleucine darauf zurückgeführt werden. Wie bereits erwähnt, wird durch Anwesenheit des WNV-Inhibitors die Bildung der geschlossenen Konformation verstärkt. In den Spektren mit dem WNV-Inhibitor waren alle elf Isoleucinsignale deutlich zu erkennen. Der K_D -Wert vom WNV-Inhibitor an die WNV-Protease liegt bei 40 μM (Ekonomiuk, Su et al. 2009) und der Inhibitor befindet sich im schnellen Austausch zwischen gebundenem und freiem Zustand, da die Titration der WNV-Protease mit dem Inhibitor zu einer kontinuierliche Verschiebung der Signale führte. Da sich alle Signale verschieben, führt die Bindung des WNV-Inhibitors, neben einer stärkeren Bindung der C-terminalen Domäne von NS2B an NS3 auch zu strukturellen Veränderungen im gesamten Protein.

Ein weiterer Inhibitor, der in dieser Arbeit untersucht wurde, ist Aprotinin. Auch als pankreatischer Trypsin-Inhibitor bekannt (BPTI, *engl.* bovine pancreatic trypsin inhibitor), bindet Aprotinin an flavivirale Proteasen (Li, Lim et al. 2005). Im Gegensatz zum WNV-Inhibitor konnte bei einigen Signalen auch ein langsamerer Austausch zwischen gebundenen und freien Zustand beobachtet werden. Der hier bestimmte K_D -Wert liegt bei $3,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$ und ist damit geringfügig kleiner, als der K_D -Wert vom WNV-Inhibitor.

Mit CPMG-Relaxations-Dispersions Experimenten wurde anschließend die WNV-Protease auf Bewegungen im Bereich von Milli- bis Mikrosekunden untersucht. Hierfür wurde sowohl Messungen mit der WNV-Protease ohne Anwesenheit eines Inhibitors, sowie in Anwesenheit des WNV-Inhibitors bzw. Aprotinin durchgeführt. Dadurch war es möglich, Veränderungen in der Dynamik durch Bindung eines Inhibitors zu erkennen. Es wurden bereits Dynamikmessungen mit der WNV-Protease durchgeführt (Su, Ozawa et al. 2009). Hierbei wurden die Relaxationsraten R_2 (^{15}N) der Rückgratamide ohne und mit WNV-Inhibitor gemessen. Es konnte jedoch kein großer Unterschied zwischen der offenen und der geschlossenen Konformation beobachtet werden. Lediglich Raten der C-terminale Domäne von NS2B zeigten in Anwesenheit des Inhibitors die größten Werte, woraus geschlossen wurde, dass die Bindung des Inhibitors den chemischen Austausch nicht vollständig verhindert.

Für die CPMG-Relaxations-Dispersions Messungen musste auch hier erst die optimale Mischzeit bestimmt werden. Da bei den Spektren ohne Inhibitor nicht alle Signale zu sehen

waren, wurden die verschiedenen Mischzeiten in Anwesenheit des WNV-Inhibitors getestet. Auch hier wurde eine Mischzeit von 20 ms gewählt, da längere Mischzeiten bei höheren Temperaturen zu einer zu starken Relaxation der Signale führten. Die Experimente wurden bei Temperaturen zwischen 283 und 310 K sowie bei den Feldstärken 500 und 700 MHz durchgeführt. Beim Vergleich der beiden Feldstärken konnte festgestellt werden, dass die R_2^{eff} -Werte bei 700 MHz größer waren als bei 500 MHz. Auch konnten bei einigen Signalen der WNV-Protease ohne Inhibitor Austausch im Milli- bis Mikrosekundenbereich beobachtet werden. Dies war besonders deutlich bei Ile 60* und 68*, die sich beide in der NS2B Domäne befinden. Dabei liegt das Ile 68* direkt im Scharnier des flexiblen Bereiches, der sich im Austausch zwischen offener und geschlossener Konformation befindet. Etwas geringere, aber noch messbare R_2^{eff} -Werte weisen die Signale von Ile 98 und 139 auf. In Abbildung 4.4 sind die ΔR_2^{eff} -Werte ($R_2^{\text{eff}}(v_{50 \text{ Hz}}) - R_2^{\text{eff}}(v_{500 \text{ Hz}})$) der Isoleucinsignale in der Kristallstruktur anhand ihrer Größe farblich dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Isoleucine der N-terminalen Domäne von NS2B sowie die daran angrenzenden Isoleucine von NS3 sich im Milli- bis Mikrosekundenbereich bewegen. Auffällig ist außerdem, dass die Isoleucine, die bei geschlossener Konformation im Kontakt mit der C-terminalen Domäne von NS2B stehen, keine Dispersionen zeigten bzw. die Signale aufgrund von Linienverbreiterung nicht sichtbar waren. Da auch ohne Inhibitor hauptsächlich die geschlossene Konformation vorliegt, wird auch hier davon ausgegangen, dass die Signale den geschlossenen Zustand darstellen. Aus den CPMG-Relaxations-Dispersionen Experimenten konnten bei den Signalen, die eine Dispersion zeigten, die Austauschraten sowie die Populationen bestimmt werden. Hierbei handelt es sich vermutlich um den Austausch zwischen geschlossener und offener Konformation. Die Relaxations-Dispersionen Profile zeigten auch, dass bei höheren Temperaturen die Dynamik der Proteine zunahm und kein Austausch mehr mit diesen Experimenten gemessen werden konnte. Daher konnten die Austauschraten sowie Populationen nur bis zu einer Temperatur von 25 °C bestimmt werden. Einzige Ausnahme war das Ile 68*. Hier konnte eine Population von $89 \pm 11 \%$ bei 37 °C sowie einer Austauschrate im mittleren Mikrosekundenbereich bestimmt werden. Wird die Temperatur bis auf 10 °C herabgesenkt, verlangsamt sich der Austausch bis in den niedrigen Millisekundenbereich und auch die Wahrscheinlichkeit für den offenen Zustand wird größer. Obwohl sich das Ile 60* im Gegensatz zum Ile 68* nicht in der C-terminalen Domäne von NS2B befindet, sondern im N-terminalen Bereich, sind die Austauschraten und Populationen vergleichbar mit denen vom Ile 68*. Auch die Austauschraten der beiden Signale Ile 98 und Ile 139 liegen im gleichen Bereich. Einzig unterscheiden sich hier die Populationen, die sich zwischen 50 und 77 % befinden und auch nicht von der Temperatur abhängig sind. Hier könnte vermutet werden, dass die Daten aufgrund fehlender Dispersion bei 37 °C und einer nur geringen Dispersion bei 25 °C stark fehlerbehaftet sind.

Sobald ein Protease Inhibitor anwesend war, veränderte sich die Dynamik im System drastisch. Sowohl bei dem WNV-Inhibitor als auch bei Aprotinin konnten keine bzw. nur sehr geringe Dispersionen beobachtet werden. Die Ergebnisse stimmen mit denen von Su et al. überein, das eine Bindung der Inhibitoren die geschlossene Konformation stabilisiert und kein bzw. nur ein sehr geringer Austausch zwischen der offenen und geschlossenen Konformation stattfinden kann (Su, Ozawa et al. 2009). Auch zeigen die Dispersionsprofile, dass bei der Bindung von

Aprotinin, im Gegensatz zu der Bindung des WNV-Inhibitors, noch geringe Dispersionen zu beobachten sind. Es könnte also vermutet werden, dass die Bindung des WNV-Inhibitors die geschlossene Konformation besser stabilisiert, als die Bindung von Aprotinin. Dabei ist die Bindungsaffinität von Aprotinin stärker als die vom WNV-Inhibitor. Dies zeigt, wie wichtig Untersuchungen zur Dynamik bei der Entwicklung von Inhibitoren sind.

Die hier durchgeführten Experimente legen eine gute Grundlage für die genauere Charakterisierung von Inhibitoren der WNV-Protease. Auch könnten diese Experimente für die Entwicklung von Inhibitoren, die eine Konformationsänderung in den geschlossenen Zustand unterbinden, von großem Interesse sein.

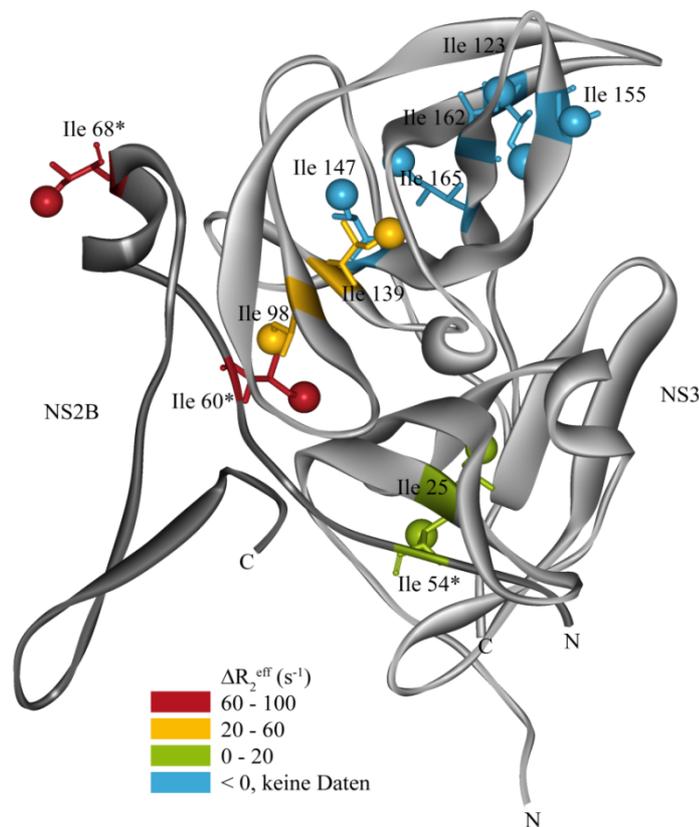


Abbildung 4.4 | Ergebnisse der CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente der WNV-Protease ohne Inhibitor. Gezeigt ist die Kristallstruktur der WNV-Protease in offener Konformation (PDB ID: 2GGV) (Aleshin, Shiryayev et al. 2007). In dunkelgrau ist die NS2B- und in hellgrau die NS3-Domäne dargestellt. Zusätzlich sind die Isoleucine mit den δ^1 -Methylgruppen als Kugel gezeigt sowie die Position angegeben. Farblich markiert ist die Abstufung der ΔR_2^{eff} -Werte ($R_2^{\text{eff}}(v_{50 \text{ Hz}}) - R_2^{\text{eff}}(v_{500 \text{ Hz}})$) gemessen bei 288 K mit einer Feldstärke von 700 MHz.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden zwei Systeme genauer untersucht. Zum einen die humane Blutgruppe B Galactosyltransferase und zum anderen die West-Nil-Virus Protease. Bei der GTB konnten neue Erkenntnisse über Bindungsvorgänge von Substraten, Substratanaloga sowie Glycosyltransferase Inhibitoren gewonnen werden. Zusätzlich konnten erste Studien zur Dynamik im System durchgeführt werden und somit eine Grundlage für weitere Untersuchungen der Dynamik und Aufklärung des noch unbekanntem Katalysemechanismus geschaffen werden. Bei der WNV-Protease wurde die Dynamikänderung bei Bindung von Inhibitoren genauer beleuchtet und bereitet damit einen Weg für eine bessere Charakterisierung sowie die Entwicklung von neuen Inhibitoren.

ITC-Experimente lieferten neue thermodynamische Daten über die Bindung von Donor- und Akzeptorsubstraten sowie Substratanaloga an die GTB. Vervollständigt wurden die Bindungsparameter mit SPR-Experimenten. Es konnte bestätigt werden, dass bei der Bindung an die GTB ein kooperativer Effekt zwischen Donor- und Akzeptorsubstrat vorliegt. Auch konnten neue Erkenntnisse über die Substratspezifität gewonnen werden. Obwohl die Bindung des natürlichen Substrats UDP-Gal und des Substratanaloga UDP-Glc eine vergleichbare Affinität aufweisen, konnte hier gezeigt werden, dass deutliche Unterschiede in den entropischen sowie enthalpischen Beiträgen vorhanden sind. Diese Unterschiede könnten sich in den Bewegungen des internen Loops sowie des flexiblen C-Terminus, die sich bei Bindung der Substrate schließen, widerspiegeln. Daher ist es von großem Interesse, neben den bereits vorhandenen Kristallstrukturen, weitere dynamische Parameter zu erheben. Hierbei bietet die NMR-Spektroskopie die Möglichkeit Bewegungen im Bereich von Pikosekunden bis Sekunden zu untersuchen (Kempf and Loria 2003; Mittermaier and Kay 2006; Kleckner and Foster 2011). Jedoch könnten auch andere Methoden, wie unter anderem die Fluoreszenzspektroskopie (Michalet, Weiss et al. 2006; Myong, Stevens et al. 2006), aber auch spezielle Methoden der Kristallographie (Bourgeois and Royant 2005) verwendet werden.

Neben Untersuchungen der Substrate und Substratanaloga, können auch Inhibitoren hilfreiche Informationen zum Mechanismus der Glycosyltransferasen liefern. In dieser Arbeit wurde ein Inhibitor, der aus einem Screening gegen die Akzeptorbindungsstelle der GTB identifiziert wurde, genauer charakterisiert. SPR- sowie STD-NMR-Experimente zeigten, dass der Inhibitor neben der Akzeptorbindungsstelle auch die Donorbindungsstelle blockiert und spezifisch gegen die Blutgruppen Glycosyltransferasen wirkt. Auch konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor bevorzugt die GTB bindet. Dabei spielt die Bindungstasche eine große Rolle bei der Selektivität des Inhibitors, insbesondere der Aminosäurerest an Position 266, der auch für die Diskriminierung zwischen UDP-Gal und UDP-GalNAc bei GTB und GTA verantwortlich ist. Der hier untersuchte Inhibitor ist demnach ein vielversprechender Vorläufer für die Entwicklung weiterer spezifischer Inhibitoren, die zusätzlich auch zu einem besseren Verständnis des Reaktionsmechanismus führen könnten.

Aufgrund von vorliegenden kinetischen Daten, konnte angenommen werden, dass der für die Konformationsänderungen relevante Zeitbereich der GTB bei Mikrosekunden bis Millisekunden liegt. Daher sollten Relaxations-Dispersions-Messungen durchgeführt werden,

die speziell diesen Bereich von dynamischen Prozessen erfassen (Kempf and Loria 2003; Palmer, Grey et al. 2005; Loria, Berlow et al. 2008; Kleckner and Foster 2011). Für die Messungen sollte eine Signalzuordnung mit Hilfe von Tripelresonanzspektren erfolgen. Dafür wurde durch Verwendung eines neuen Protokolls für die Proteinbiosynthese, der Grad der Deuterierung der GTB, im Vergleich zu vorherigen im Institut durchgeführten Experimenten, deutlich verbessert. Auch wurden höhere Konzentrationen der NMR-Probe eingesetzt. Jedoch konnte auch mit dieser Optimierung, lediglich eine Zuordnung von sechs Aminosäureresten erfolgen. Da diese sich weit entfernt vom aktiven Zentrum und nicht in den flexiblen Bereichen der GTB befinden, wird diese Zuordnung keine weiteren Informationen zur Dynamik liefern. Titrationsexperimente mit UDP zeigten, welche komplexen Veränderungen die Bindung von UDP in GTB hervorruft. Allerdings konnten bei den sechs zugeordneten Aminosäureresten keine Verschiebung der Signale beobachtet werden. Um weitere Informationen über die Dynamik zu erhalten, wurden hier erstmals die δ^1 -Methylgruppen der Isoleucine selektiv $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$, in einem ansonsten deuterierten Protein, markiert. Diese Methode eignet sich besonders für große Proteine, da die Anzahl der Signale deutlich reduziert wird und somit das Problem der Signalüberlagerung minimiert wird und zusätzlich die Sensitivität aufgrund der drei Protonen in den Methylgruppen deutlich erhöht ist. Mit CPMG-Relaxations-Dispersions Messungen konnte gezeigt werden, dass sich die Dynamik des internen Loops bei Substratbindung einer deutlichen Veränderung unterzieht. Die Bindung von UDP verlangsamt die Loopbewegung und gibt dadurch einen Hinweis auf das Vorhandensein unterschiedlicher Konformationen. Im restlichen Protein konnten jedoch keine Veränderungen der Dynamik durch Substratbindung beobachtet werden. Es wurde vermutet, dass die Bewegungsvorgänge hier deutlich schneller sind, als sie mit CPMG-Relaxations-Dispersions Experimenten messbar sind. Für weitere Untersuchungen sollten Bewegungen im niedrigen Mikrosekundenbereich gemessen werden. Hierfür eignen sich zum Beispiel *rotating frame* Relaxations-Dispersions-Messungen (Kleckner and Foster 2011; Vallurupalli, Bouvignies et al. 2011). Zusätzlich geben Messungen der Relaxationsraten Auskunft über Bewegungen im Piko- bis Nanosekundenbereich. Da sich für die CPMG-Relaxations-Dispersions Messungen die selektiv markierten Methylgruppen der Isoleucine sehr gut geeignet haben, sollten auch diese Experimente damit durchgeführt werden. Um einen größeren Bereich der GTB abzudecken, sollten zusätzlich weitere Methylgruppen, wie zum Beispiel die der Alanin-, Leucin-, Valin- sowie Methioninseitenketten untersucht werden. Da die Markierung der δ^1 -Methylgruppen der Isoleucine und auch die Messungen der CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente bei der GTB erfolgreich waren, wurde auch die Dynamik der WNV-Protease auf diese Weise untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die C-terminale Domäne von NS2B in Lösung mit einer Austauschrate im mittleren Mikrosekundenbereich zwischen einer offenen und einer geschlossenen Konformation bewegt und diese durch senken der Temperatur, verlangsamt wurde. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von Su et al., die gezeigt haben, dass auch ohne Inhibitor hauptsächlich die geschlossene Konformation vorliegt. Die Bindung von Inhibitoren stabilisierte die geschlossene Konformation und es konnte kein Austausch im Mikro- bis Millisekundenbereich zwischen offener und geschlossener Konformation mehr beobachtet werden. Die hier durchgeführten Experimente legen eine gute Grundlage für die genauere Charakterisierung von Inhibitoren.

Auch sind die Informationen, die durch Dynamikmessungen erhalten wurden, sehr hilfreich für die Entwicklung neuer Inhibitoren, die eine Konformationsänderung von den offenen in den geschlossenen Zustand unterbinden.

Aus den beiden hier untersuchten System wird erkenntlich, wie wichtig es ist, nicht nur Informationen über Struktur und Bindungsaffinitäten zu erheben, sondern auch thermodynamische Parameter sowie Informationen zur Dynamik. Dadurch ist es möglich, neue Erkenntnisse, wie bei der GTB über die Funktionsweise des katalytischen Mechanismus zu erhalten oder bei der WNV-Protease weitere Informationen über mögliche Inhibitionsarten, die sich nicht nur auf kompetitive Inhibierung des aktiven Zentrums und auf die Verdrängung des Substrats beziehen, sondern auf einer Stabilisierung der inaktiven Konformation beruhen. In dieser Arbeit konnten wesentliche neue Grundlagen gelegt werden, die neue Wege für weitere Untersuchungen bereiten.

5 Literaturverzeichnis

- Abragam, A. (1961). The Principles of Nuclear Magnetism. Oxford, Clarendon Press.
- Alderwick, L. J., G. S. Lloyd, H. Ghadbane, J. W. May, A. Bhatt, L. Eggeling, K. Futterer and G. S. Besra (2011). "The C-terminal domain of the Arabinosyltransferase *Mycobacterium tuberculosis* EmbC is a lectin-like carbohydrate binding module." PLoS Pathog **7**(2): e1001299.
- Aleshin, A. E., S. A. Shiryaev, A. Y. Strongin and R. C. Liddington (2007). "Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the Flaviviridae fold." Protein Sci **16**(5): 795-806.
- Alfaro, J. A., R. B. Zheng, M. Persson, J. A. Letts, R. Polakowski, Y. Bai, S. N. Borisova, N. O. Seto, T. L. Lowary, M. M. Palcic and S. V. Evans (2008). "ABO(H) blood group A and B glycosyltransferases recognize substrate via specific conformational changes." J Biol Chem **283**(15): 10097-108.
- Andre, I., I. Tvaroska and J. P. Carver (2003). "On the reaction pathways and determination of transition-state structures for retaining alpha-galactosyltransferases." Carbohydr Res **338**(9): 865-77.
- Angulo, J., P. M. Enriquez-Navas and P. M. Nieto (2010). "Ligand-receptor binding affinities from saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy: the binding isotherm of STD initial growth rates." Chemistry **16**(26): 7803-12.
- Angulo, J., B. Langpap, A. Blume, T. Biet, B. Meyer, N. R. Krishna, H. Peters, M. M. Palcic and T. Peters (2006). "Blood group B galactosyltransferase: insights into substrate binding from NMR experiments." J Am Chem Soc **128**(41): 13529-38.
- Ardevol, A. and C. Rovira (2011). "The molecular mechanism of enzymatic glycosyl transfer with retention of configuration: evidence for a short-lived oxocarbenium-like species." Angew Chem Int Ed Engl **50**(46): 10897-901.
- Ayala, I., O. Hamelin, C. Amero, O. Pessey, M. J. Plevin, P. Gans and J. Boisbouvier (2012). "An optimized isotopic labelling strategy of isoleucine-gamma2 methyl groups for solution NMR studies of high molecular weight proteins." Chem Commun (Camb) **48**(10): 1434-6.
- Ayala, I., R. Sounier, N. Use, P. Gans and J. Boisbouvier (2009). "An efficient protocol for the complete incorporation of methyl-protonated alanine in perdeuterated protein." J Biomol NMR **43**(2): 111-9.
- Barbieri, R., I. Bertini, Y. M. Lee, C. Luchinat and A. H. Velders (2002). "Structure-independent cross-validation between residual dipolar couplings originating from internal and external orienting media." J Biomol NMR **22**(4): 365-8.
- Berger, S. and S. Braun (2004). 200 and More NMR Experiments: A Practical Course, Wiley-VCH.
- Bertini, I., M. B. Janik, Y. M. Lee, C. Luchinat and A. Rosato (2002). "Magnetic susceptibility tensor anisotropies for a lanthanide ion series in a fixed protein matrix." J Am Chem Soc **123**(18): 4181-8.
- Bertini, I., C. Luchinat, G. Parigi and R. Pierattelli (2005). "NMR spectroscopy of paramagnetic metalloproteins." Chembiochem **6**(9): 1536-49.
- Beyer, T. A., J. E. Sadler, J. I. Rearick, J. C. Paulson and R. L. Hill (1981). "Glycosyltransferases and their use in assessing oligosaccharide structure and structure-function relationships." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **52**: 23-175.
- Bieri, M., A. H. Kwan, M. Mobli, G. F. King, J. P. Mackay and P. R. Gooley (2011). "Macromolecular NMR spectroscopy for the nonspectroscopist: beyond macromolecular solution structure determination." FEBS J.

- Bjelic, S. and I. Jelesarov (2008). "A survey of the year 2007 literature on applications of isothermal titration calorimetry." *J Mol Recognit* **21**(5): 289-312.
- Blume, A., J. Angulo, T. Biet, H. Peters, A. J. Benie, M. Palcic and T. Peters (2006). "Fragment-based screening of the donor substrate specificity of human blood group B galactosyltransferase using saturation transfer difference NMR." *J Biol Chem* **281**(43): 32728-40.
- Bobovska, A., I. Tvaroska and J. Kona (2014). "A theoretical study on the catalytic mechanism of the retaining alpha-1,2-mannosyltransferase Kre2p/Mnt1p: the impact of different metal ions on catalysis." *Org Biomol Chem* **12**(24): 4201-10.
- Bobovska, A., I. Tvaroska and J. Kona (2015). "Theoretical study of enzymatic catalysis explains why the trapped covalent intermediate in the E303C mutant of glycosyltransferase GTB was not detected in the wild-type enzyme." *Glycobiology* **25**(1): 3-7.
- Boehr, D. D., H. J. Dyson and P. E. Wright (2006). "An NMR perspective on enzyme dynamics." *Chem Rev* **106**(8): 3055-79.
- Boisbouvier, J., P. Gans, M. Blackledge, B. brutscher and D. Marion (1999). "Long-revange structural information in NMR studies of paramagnetic molecules from electron spin - nuclear spin cross-correlated relaxation." *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 7700-7701.
- Boix, E., Y. Zhang, G. J. Swaminathan, K. Brew and K. R. Acharya (2002). "Structural basis of ordered binding of donor and acceptor substrates to the retaining glycosyltransferase, alpha-1,3-galactosyltransferase." *J Biol Chem* **277**(31): 28310-8.
- Bollati, M., K. Alvarez, R. Assenberg, C. Baronti, B. Canard, S. Cook, B. Coutard, E. Decroly, X. de Lamballerie, E. A. Gould, G. Grard, J. M. Grimes, R. Hilgenfeld, A. M. Jansson, H. Malet, E. J. Mancini, E. Mastrangelo, A. Mattevi, M. Milani, G. Moureau, J. Neyts, R. J. Owens, J. Ren, B. Selisko, S. Speroni, H. Steuber, D. I. Stuart, T. Unge and M. Bolognesi (2010). "Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design." *Antiviral Res* **87**(2): 125-48.
- Bourgeois, D. and A. Royant (2005). "Advances in kinetic protein crystallography." *Curr Opin Struct Biol* **15**(5): 538-47.
- Bourne, Y. and B. Henrissat (2001). "Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules." *Curr Opin Struct Biol* **11**(5): 593-600.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Breton, C., L. Snajdrova, C. Jeanneau, J. Koca and A. Imberty (2006). "Structures and mechanisms of glycosyltransferases." *Glycobiology* **16**(2): 29R-37R.
- Brinton, M. A. (2002). "The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere." *Annu Rev Microbiol* **56**: 371-402.
- Brinton, M. A., A. V. Fernandez and J. H. Dispoto (1986). "The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure." *Virology* **153**(1): 113-21.
- Brown, J. R., B. E. Crawford and J. D. Esko (2007). "Glycan antagonists and inhibitors: a fount for drug discovery." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**(6): 481-515.
- Campbell, J. A., G. J. Davies, V. Bulone and B. Henrissat (1997). "A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities." *Biochem J* **326** (Pt 3): 929-39.
- Cantarel, B. L., P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard and B. Henrissat (2009). "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics." *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue): D233-8.
- Carver, J. P. and R. E. Richards (1972). "General 2-site solution for chemical exchange produced dependence of T2 upon Carr-Purcell pulse separation." *J. Magn. Reson.* **6**: 89-96.

- Castle, E., T. Nowak, U. Leidner and G. Wengler (1985). "Sequence analysis of the viral core protein and the membrane-associated proteins V1 and NV2 of the flavivirus West Nile virus and of the genome sequence for these proteins." *Virology* **145**(2): 227-36.
- Chambers, T. J., C. S. Hahn, R. Galler and C. M. Rice (1990). "Flavivirus genome organization, expression, and replication." *Annu Rev Microbiol* **44**: 649-88.
- Chancey, C., A. Grinev, E. Volkova and M. Rios (2015). "The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus." *Biomed Res Int* **2015**: 376230.
- Chappell, K. J., M. J. Stoermer, D. P. Fairlie and P. R. Young (2007). "Generation and characterization of proteolytically active and highly stable truncated and full-length recombinant West Nile virus NS3." *Protein Expr Purif* **53**(1): 87-96.
- Chappell, K. J., M. J. Stoermer, D. P. Fairlie and P. R. Young (2008). "Mutagenesis of the West Nile virus NS2B cofactor domain reveals two regions essential for protease activity." *J Gen Virol* **89**(Pt 4): 1010-4.
- Charnock, S. J. and G. J. Davies (1999). "Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms." *Biochemistry* **38**(20): 6380-5.
- Chiu, C. P., A. G. Watts, L. L. Lairson, M. Gilbert, D. Lim, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers and N. C. Strynadka (2004). "Structural analysis of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni* in complex with a substrate analog." *Nat Struct Mol Biol* **11**(2): 163-70.
- Chu, J. J. and M. L. Ng (2003). "Characterization of a 105-kDa plasma membrane associated glycoprotein that is involved in West Nile virus binding and infection." *Virology* **312**(2): 458-69.
- Claridge, T. D. (2000). *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamont.
- Clore, G. M., C. Tang and J. Iwahara (2007). "Elucidating transient macromolecular interactions using paramagnetic relaxation enhancement." *Curr Opin Struct Biol* **17**(5): 603-16.
- Colley, K. J. (1997). "Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers." *Glycobiology* **7**(1): 1-13.
- Compain, P. and O. R. Martin (2001). "Carbohydrate mimetics-based glycosyltransferase inhibitors." *Bioorg Med Chem* **9**(12): 3077-92.
- Coutinho, P. M., E. Deleury, G. J. Davies and B. Henrissat (2003). "An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases." *J Mol Biol* **328**(2): 307-17.
- Daligault, F., S. Rahuel-Clermont, S. Gulberti, M. T. Cung, G. Branlant, P. Netter, J. Magdalou and V. Lattard (2009). "Thermodynamic insights into the structural basis governing the donor substrate recognition by human beta1,4-galactosyltransferase 7." *Biochem J* **418**(3): 605-14.
- Davies, G. J. (2001). "Sweet secrets of synthesis." *Nat Struct Biol* **8**(2): 98-100.
- Davies, G. J., L. Mackenzie, A. Varrot, M. Dauter, A. M. Brzozowski, M. Schulein and S. G. Withers (1998). "Snapshots along an enzymatic reaction coordinate: analysis of a retaining beta-glycoside hydrolase." *Biochemistry* **37**(34): 11707-13.
- de Graffenried, C. L. and C. R. Bertozzi (2004). "The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus." *Curr Opin Cell Biol* **16**(4): 356-63.
- Diamond, M. S., B. Shrestha, E. Mehlhop, E. Sitati and M. Engle (2003). "Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus." *Viral Immunol* **16**(3): 259-78.
- Doniach, S. and P. Eastman (1999). "Protein dynamics simulations from nanoseconds to microseconds." *Curr Opin Struct Biol* **9**(2): 157-63.
- Dwek, R. A. (1996). "Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars." *Chem Rev* **96**(2): 683-720.
- Dyson, H. J. and P. E. Wright (2005). "Elucidation of the protein folding landscape by NMR." *Methods Enzymol* **394**: 299-321.

- Ekonomiuk, D., X. C. Su, K. Ozawa, C. Bodenreider, S. P. Lim, Z. Yin, T. H. Keller, D. Beer, V. Patel, G. Otting, A. Caflisch and D. Huang (2009). "Discovery of a non-peptidic inhibitor of west nile virus NS3 protease by high-throughput docking." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(1): e356.
- Erbel, P., N. Schiering, A. D'Arcy, M. Rénatus, M. Kroemer, S. P. Lim, Z. Yin, T. H. Keller, S. G. Vasudevan and U. Hommel (2006). "Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus." *Nat Struct Mol Biol* **13**(4): 372-3.
- Farjon, J., J. Boisbouvier, P. Schanda, A. Pardi, J. P. Simorre and B. Brutscher (2009). "Longitudinal-relaxation-enhanced NMR experiments for the study of nucleic acids in solution." *J Am Chem Soc* **131**(24): 8571-7.
- Farrow, N. A., O. Zhang, J. D. Forman-Kay and L. E. Kay (1994). "A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of ¹⁵N longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium." *J Biomol NMR* **4**(5): 727-34.
- Fernandez, C. and G. Wider (2003). "TROSY in NMR studies of the structure and function of large biological macromolecules." *Curr Opin Struct Biol* **13**(5): 570-80.
- Fielding, L. (2007). "NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants." *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **51**: 219-242.
- Flügge, F. (2014). "Hot spot" tryptophan residues as reporters of protein dynamics of human blood group glycosyltransferases. *Institut für Chemie, Universität zu Lübeck. Master.*
- Fuster, M. M. and J. D. Esko (2005). "The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets." *Nat Rev Cancer* **5**(7): 526-42.
- Gagnon, S. M. L., A. R. Johal, S. Borisova, T. L. Lowary and S. V. Evans (2015). Structures of human ABO(H) blood group glycosyltransferases in complex with substrate analogs reveal five donor conformations,
- Gardner, K. H. and L. E. Kay (1998). "The use of ²H, ¹³C, ¹⁵N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**: 357-406.
- Gastinel, L. N., C. Bignon, A. K. Misra, O. Hindsgaul, J. H. Shaper and D. H. Joziassé (2001). "Bovine alpha1,3-galactosyltransferase catalytic domain structure and its relationship with ABO histo-blood group and glycosphingolipid glycosyltransferases." *EMBO J* **20**(4): 638-49.
- Gelis, I., A. M. Bonvin, D. Keramisanou, M. Koukaki, G. Gouridis, S. Karamanou, A. Economou and C. G. Kalodimos (2007). "Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR." *Cell* **131**(4): 756-69.
- Ghose, R. and J. H. Prestegard (1997). "Electron spin-nuclear spin cross-correlation effects on multiplet splittings in paramagnetic proteins." *J Magn Reson* **128**(2): 138-43.
- Gibson, R. P., J. P. Turkenburg, S. J. Charnock, R. Lloyd and G. J. Davies (2002). "Insights into trehalose synthesis provided by the structure of the retaining glucosyltransferase OtsA." *Chem Biol* **9**(12): 1337-46.
- Goedl, C., R. Griessler, A. Schwarz and B. Nidetzky (2006). "Structure-function relationships for Schizophyllum commune trehalose phosphorylase and their implications for the catalytic mechanism of family GT-4 glycosyltransferases." *Biochem J* **397**(3): 491-500.
- Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, A. P. Donchenko and V. M. Blinov (1989). "Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes." *Nucleic Acids Res* **17**(12): 4713-30.
- Grimm, L. L. (2010). Zur Interaktion kleiner Moleküle mit humanen Blutgruppen ABO Glycosyltransferasen. *Institut für Chemie, Universität zu Lübeck. Master.*
- Gueron, M. (1975). "Nuclear relaxation in macromolecules by paramagnetic ions: a novel mechanism." *J. Magn. Reson.* **19**(1): 58-66.
- Hamilton, S. R. and T. U. Gerngross (2007). "Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast." *Curr Opin Biotechnol* **18**(5): 387-92.

- Hammamy, M. Z., C. Haase, M. Hammami, R. Hilgenfeld and T. Steinmetzer (2013). "Development and characterization of new peptidomimetic inhibitors of the West Nile virus NS2B-NS3 protease." *ChemMedChem* **8**(2): 231-41.
- Hassinen, A., A. Rivinoja, A. Kauppila and S. Kellokumpu (2010). "Golgi N-glycosyltransferases form both homo- and heterodimeric enzyme complexes in live cells." *J Biol Chem* **285**(23): 17771-7.
- Hayes, E. B. and D. J. Gubler (2006). "West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States." *Annu Rev Med* **57**: 181-94.
- Henzler-Wildman, K. and D. Kern (2007). "Dynamic personalities of proteins." *Nature* **450**(7172): 964-72.
- Hosoguchi, K., T. Maeda, J. Furukawa, Y. Shinohara, H. Hinou, M. Sekiguchi, H. Togame, H. Takemoto, H. Kondo and S. Nishimura (2010). "An efficient approach to the discovery of potent inhibitors against glycosyltransferases." *J Med Chem* **53**(15): 5607-19.
- Hug, I. and M. F. Feldman (2011). "Analogies and homologies in lipopolysaccharide and glycoprotein biosynthesis in bacteria." *Glycobiology* **21**(2): 138-51.
- Igura, M., N. Maita, J. Kamishikiryo, M. Yamada, T. Obita, K. Maenaka and D. Kohda (2008). "Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase." *EMBO J* **27**(1): 234-43.
- Ikura, M., L. E. Kay and A. Bax (1990). "A novel approach for sequential assignment of ¹H, ¹³C, and ¹⁵N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin." *Biochemistry* **29**(19): 4659-67.
- Indyk, L. and H. F. Fisher (1998). "Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry." *Methods Enzymol* **295**: 350-64.
- Ishima, R. and D. A. Torchia (2006). "Accuracy of optimized chemical-exchange parameters derived by fitting CPMG R2 dispersion profiles when R2(0a) not = R2(0b)." *J Biomol NMR* **34**(4): 209-19.
- Izumi, M., H. Yuasa and H. Hashimoto (2009). "Bisubstrate analogues as glycosyltransferase inhibitors." *Curr Top Med Chem* **9**(1): 87-105.
- Jarymowycz, V. A. and M. J. Stone (2006). "Fast time scale dynamics of protein backbones: NMR relaxation methods, applications, and functional consequences." *Chem Rev* **106**(5): 1624-71.
- Johnsson, B., S. Lofas and G. Lindquist (1991). "Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors." *Anal Biochem* **198**(2): 268-77.
- Jorgensen, R., L. L. Grimm, N. Sindhuwinata, T. Peters and M. M. Palcic (2012). "A Glycosyltransferase Inhibitor from a Molecular Fragment Library Simultaneously Interferes with Metal Ion and Substrate Binding." *Angew Chem Int Ed Engl*.
- Kamath, V. P., N. O. Seto, C. A. Compston, O. Hindsgaul and M. M. Palcic (1999). "Synthesis of the acceptor analog alphaFuc(1-->2)alphaGal-O(CH2)7 CH3: a probe for the kinetic mechanism of recombinant human blood group B glycosyltransferase." *Glycoconj J* **16**(10): 599-606.
- Kamerzell, T. J. and C. R. Middaugh (2008). "The complex inter-relationships between protein flexibility and stability." *J Pharm Sci* **97**(9): 3494-517.
- Kay, L. E. (2005). "NMR studies of protein structure and dynamics." *J Magn Reson* **173**(2): 193-207.
- Kay, L. E. (2011). "Solution NMR spectroscopy of supra-molecular systems, why bother? A methyl-TROSY view." *J Magn Reson* **210**(2): 159-70.
- Keeler, J. (2010). *Understanding NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons.
- Kempf, J. G. and J. P. Loria (2003). "Protein dynamics from solution NMR: theory and applications." *Cell Biochem Biophys* **37**(3): 187-211.
- Khromykh, A. A., P. L. Sedlak and E. G. Westaway (1999). "trans-Complementation analysis of the flavivirus Kunjin ns5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication." *J Virol* **73**(11): 9247-55.

- Khromykh, A. A. and E. G. Westaway (1996). "RNA binding properties of core protein of the flavivirus Kunjin." *Arch Virol* **141**(3-4): 685-99.
- Kleckner, I. R. and M. P. Foster (2011). "GUARDD: user-friendly MATLAB software for rigorous analysis of CPMG RD NMR data." *J Biomol NMR*.
- Kleckner, I. R. and M. P. Foster (2011). "An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics." *Biochim Biophys Acta* **1814**(8): 942-68.
- Kobata, A., E. F. Grollman and V. Ginsburg (1968). "An enzymatic basis for blood type B in humans." *Biochem Biophys Res Commun* **32**(2): 272-7.
- Kobata, A., E. F. Grollman and V. Ginsburg (1968). "An enzymic basis for blood type A in humans." *Arch Biochem Biophys* **124**(1): 609-12.
- Koehler, J. and J. Meiler (2011). "Expanding the utility of NMR restraints with paramagnetic compounds: background and practical aspects." *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **59**(4): 360-89.
- Korzhev, D. M., K. Kloiber, V. Kanelis, V. Tugarinov and L. E. Kay (2004). "Probing slow dynamics in high molecular weight proteins by methyl-TROSY NMR spectroscopy: application to a 723-residue enzyme." *J Am Chem Soc* **126**(12): 3964-73.
- Korzhev, D. M., K. Kloiber and L. E. Kay (2004). "Multiple-quantum relaxation dispersion NMR spectroscopy probing millisecond time-scale dynamics in proteins: theory and application." *J Am Chem Soc* **126**(23): 7320-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lairson, L. L., C. P. Chiu, H. D. Ly, S. He, W. W. Wakarchuk, N. C. Strynadka and S. G. Withers (2004). "Intermediate trapping on a mutant retaining alpha-galactosyltransferase identifies an unexpected aspartate residue." *J Biol Chem* **279**(27): 28339-44.
- Lairson, L. L., B. Henrissat, G. J. Davies and S. G. Withers (2008). "Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms." *Annu Rev Biochem* **77**: 521-55.
- Landsteiner, K. (1901). "Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes." *Wien. Klin. Wochenschr.* **14**: 1132-1134.
- Lee, H. J., C. H. Barry, S. N. Borisova, N. O. Seto, R. B. Zheng, A. Blancher, S. V. Evans and M. M. Palcic (2005). "Structural basis for the inactivity of human blood group O2 glycosyltransferase." *J Biol Chem* **280**(1): 525-9.
- Lee, S. S., S. Y. Hong, J. C. Errey, A. Izumi, G. J. Davies and B. G. Davis (2011). "Mechanistic evidence for a front-side, S_Ni-type reaction in a retaining glycosyltransferase." *Nat Chem Biol* **7**(9): 631-8.
- Lescop, E., T. Kern and B. Brutscher (2010). "Guidelines for the use of band-selective radiofrequency pulses in hetero-nuclear NMR: example of longitudinal-relaxation-enhanced BEST-type 1H-15N correlation experiments." *J Magn Reson* **203**(1): 190-8.
- Lescop, E., P. Schanda and B. Brutscher (2007). "A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment." *J Magn Reson* **187**(1): 163-9.
- Letts, J. A., N. L. Rose, Y. R. Fang, C. H. Barry, S. N. Borisova, N. O. Seto, M. M. Palcic and S. V. Evans (2006). "Differential recognition of the type I and II H antigen acceptors by the human ABO(H) blood group A and B glycosyltransferases." *J Biol Chem* **281**(6): 3625-32.
- Leung, J. Y., G. P. Pijlman, N. Kondratieva, J. Hyde, J. M. Mackenzie and A. A. Khromykh (2008). "Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly." *J Virol* **82**(10): 4731-41.
- Li, J., S. P. Lim, D. Beer, V. Patel, D. Wen, C. Tumanut, D. C. Tully, J. A. Williams, J. Jiricek, J. P. Priestle, J. L. Harris and S. G. Vasudevan (2005). "Functional profiling of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries." *J Biol Chem* **280**(31): 28766-74.
- Lim, S. P. and P. Y. Shi (2013). "West Nile virus drug discovery." *Viruses* **5**(12): 2977-3006.

- Lindenbach, B. D. and C. M. Rice (1997). "trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication." *J Virol* **71**(12): 9608-17.
- Lindorff-Larsen, K., R. B. Best, M. A. Depristo, C. M. Dobson and M. Vendruscolo (2005). "Simultaneous determination of protein structure and dynamics." *Nature* **433**(7022): 128-32.
- Lindorff-Larsen, K., R. B. Best and M. Vendruscolo (2005). "Interpreting dynamically-averaged scalar couplings in proteins." *J Biomol NMR* **32**(4): 273-80.
- Liu, J. and A. Mushegian (2003). "Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases." *Protein Sci* **12**(7): 1418-31.
- Lobsanov, Y. D., P. A. Romero, B. Sleno, B. Yu, P. Yip, A. Herscovics and P. L. Howell (2004). "Structure of Kre2p/Mnt1p: a yeast alpha1,2-mannosyltransferase involved in mannoprotein biosynthesis." *J Biol Chem* **279**(17): 17921-31.
- Loria, J. P., R. B. Berlow and E. D. Watt (2008). "Characterization of enzyme motions by solution NMR relaxation dispersion." *Acc Chem Res* **41**(2): 214-21.
- Loria, J. P., M. Rance and A. G. Palmer, 3rd (1999). "A TROSY CPMG sequence for characterizing chemical exchange in large proteins." *J Biomol NMR* **15**(2): 151-5.
- Lovering, A. L., L. H. de Castro, D. Lim and N. C. Strynadka (2007). "Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis." *Science* **315**(5817): 1402-5.
- Lowary, T. L. and O. Hindsgaul (1993). "Recognition of synthetic deoxy and deoxyfluoro analogs of the acceptor alpha-L-Fuc p-(1-->2)-beta-D-Gal p-OR by the blood-group A and B gene-specified glycosyltransferases." *Carbohydr Res* **249**(1): 163-95.
- Mackenzie, J. M., M. K. Jones and P. R. Young (1996). "Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication." *Virology* **220**(1): 232-40.
- Madhu, P. K., R. Grandori, K. Hohenthanner, P. K. Mandal and N. Muller (2001). "Geometry dependent two-dimensional heteronuclear multiplet effects in paramagnetic proteins." *J Biomol NMR* **20**(1): 31-7.
- Marcus, S. L., R. Polakowski, N. O. Seto, E. Leinala, S. Borisova, A. Blancher, F. Roubinet, S. V. Evans and M. M. Palcic (2003). "A single point mutation reverses the donor specificity of human blood group B-synthesizing galactosyltransferase." *J Biol Chem* **278**(14): 12403-5.
- Markley, J. L., A. Bax, Y. Arata, C. W. Hilbers, R. Kaptein, B. D. Sykes, P. E. Wright and K. Wuthrich (1998). "Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids." *J Mol Biol* **280**(5): 933-52.
- Markoff, L., B. Falgout and A. Chang (1997). "A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein." *Virology* **233**(1): 105-17.
- Marley, J., M. Lu and C. Bracken (2001). "A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins." *J Biomol NMR* **20**(1): 71-5.
- Mayer, M. and T. L. James (2004). "NMR-based characterization of phenothiazines as a RNA binding scaffold." *J Am Chem Soc* **126**(13): 4453-60.
- Mayer, M. and B. Meyer (1999). "Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy." *Angew Chem Int Ed Engl* **38**: 1784-1788.
- Mayer, M. and B. Meyer (2001). "Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor." *J Am Chem Soc* **123**(25): 6108-17.
- Meyer, B. and T. Peters (2003). "NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors." *Angew Chem Int Ed Engl* **42**(8): 864-90.
- Michalet, X., S. Weiss and M. Jager (2006). "Single-molecule fluorescence studies of protein folding and conformational dynamics." *Chem Rev* **106**(5): 1785-813.
- Milland, J. and M. S. Sandrin (2006). "ABO blood group and related antigens, natural antibodies and transplantation." *Tissue Antigens* **68**(6): 459-66.

- Mittermaier, A. and L. E. Kay (2006). "New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics." *Science* **312**(5771): 224-8.
- Mittermaier, A. K. and L. E. Kay (2009). "Observing biological dynamics at atomic resolution using NMR." *Trends Biochem Sci* **34**(12): 601-11.
- Mobli, M. and J. C. Hoch (2014). "Nonuniform sampling and non-Fourier signal processing methods in multidimensional NMR." *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **83**: 21-41.
- Monegal, A. and A. Planas (2006). "Chemical rescue of alpha3-galactosyltransferase. Implications in the mechanism of retaining glycosyltransferases." *J Am Chem Soc* **128**(50): 16030-1.
- Morera, S., L. Lariviere, J. Kurzeck, U. Aschke-Sonnenborn, P. S. Freemont, J. Janin and W. Ruger (2001). "High resolution crystal structures of T4 phage beta-glucosyltransferase: induced fit and effect of substrate and metal binding." *J Mol Biol* **311**(3): 569-77.
- Morgan, W. T. and W. M. Watkins (1959). "Some aspects of the biochemistry of the human blood-group substances." *Br Med Bull* **15**(2): 109-13.
- Morgan, W. T. and W. M. Watkins (1969). "Genetic and biochemical aspects of human blood-group A-, B-, H-, Le-a- and Le-b-specificity." *Br Med Bull* **25**(1): 30-4.
- Mueller, N. H., C. Yon, V. K. Ganesh and R. Padmanabhan (2007). "Characterization of the West Nile virus protease substrate specificity and inhibitors." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(3): 606-14.
- Myong, S., B. C. Stevens and T. Ha (2006). "Bridging conformational dynamics and function using single-molecule spectroscopy." *Structure* **14**(4): 633-43.
- Nall, T. A., K. J. Chappell, M. J. Stoermer, N. X. Fang, J. D. Tyndall, P. R. Young and D. P. Fairlie (2004). "Enzymatic characterization and homology model of a catalytically active recombinant West Nile virus NS3 protease." *J Biol Chem* **279**(47): 48535-42.
- Namanja, A. T., X. J. Wang, B. Xu, A. Y. Mercedes-Camacho, B. D. Wilson, K. A. Wilson, F. A. Etzkorn and J. W. Peng (2010). "Toward flexibility-activity relationships by NMR spectroscopy: dynamics of Pin1 ligands." *J Am Chem Soc* **132**(16): 5607-9.
- Neudecker, P., P. Lundstrom and L. E. Kay (2009). "Relaxation dispersion NMR spectroscopy as a tool for detailed studies of protein folding." *Biophys J* **96**(6): 2045-54.
- Nguyen, H. P., N. O. Seto, Y. Cai, E. K. Leinala, S. N. Borisova, M. M. Palcic and S. V. Evans (2003). "The influence of an intramolecular hydrogen bond in differential recognition of inhibitory acceptor analogs by human ABO(H) blood group A and B glycosyltransferases." *J Biol Chem* **278**(49): 49191-5.
- Nowak, T., P. M. Farber and G. Wengler (1989). "Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis." *Virology* **169**(2): 365-76.
- Ohtsubo, K. and J. D. Marth (2006). "Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease." *Cell* **126**(5): 855-67.
- Ollershaw, J., V. Tugarinov and L. E. Kay (2003). "Methyl TROSY: explanation and experimental verification." *Magn Reson Chem* **41**(10): 843-852.
- Otting, G. (2010). "Protein NMR using paramagnetic ions." *Annu Rev Biophys* **39**: 387-405.
- Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley and T. Gray (1995). "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein." *Protein Sci* **4**(11): 2411-23.
- Palcic, M. M., L. D. Heerze, M. Pierce and O. Hindsgaul (1988). "The use of hydrophobic synthetic glycosides as acceptors in glycosyltransferase assays." *Glycoconj J* **5**(1): 49-63.
- Palcic, M. M., N. O. Seto and O. Hindsgaul (2001). "Natural and recombinant A and B gene encoded glycosyltransferases." *Transfus Med* **11**(4): 315-23.
- Palmer, A. G., 3rd, M. J. Grey and C. Wang (2005). "Solution NMR spin relaxation methods for characterizing chemical exchange in high-molecular-weight systems." *Methods Enzymol* **394**: 430-65.

- Patenaude, S. I., N. O. Seto, S. N. Borisova, A. Szpacenko, S. L. Marcus, M. M. Palcic and S. V. Evans (2002). "The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis." *Nat Struct Biol* **9**(9): 685-90.
- Paulson, J. C. and K. J. Colley (1989). "Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation." *J Biol Chem* **264**(30): 17615-8.
- Persson, K., H. D. Ly, M. Dieckelmann, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers and N. C. Strynadka (2001). "Crystal structure of the retaining galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitidis* in complex with donor and acceptor sugar analogs." *Nat Struct Biol* **8**(2): 166-75.
- Pervushin, K. (2000). "Impact of transverse relaxation optimized spectroscopy (TROSY) on NMR as a technique in structural biology." *Q Rev Biophys* **33**(2): 161-97.
- Pervushin, K., R. Riek, G. Wider and K. Wuthrich (1997). "Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12366-71.
- Pervushin, K. V., G. Wider and K. Wuthrich (1998). "Single Transition-to-single Transition Polarization Transfer (ST2-PT) in [15N,1H]-TROSY." *J Biomol NMR* **12**(2): 345-8.
- Pesnot, T., R. Jorgensen, M. M. Palcic and G. K. Wagner (2010). "Structural and mechanistic basis for a new mode of glycosyltransferase inhibition." *Nat Chem Biol* **6**(5): 321-3.
- Phillips, T. A., R. A. VanBogelen and F. C. Neidhardt (1984). "lon gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein." *J Bacteriol* **159**(1): 283-7.
- Pintacuda, G., K. Hohenthanner, G. Otting and N. Muller (2003). "Angular dependence of dipole-dipole-Curie-spin cross-correlation effects in high-spin and low-spin paramagnetic myoglobin." *J Biomol NMR* **27**(2): 115-32.
- Pintacuda, G., M. John, X. C. Su and G. Otting (2007). "NMR structure determination of protein-ligand complexes by lanthanide labeling." *Acc Chem Res* **40**(3): 206-12.
- Pintacuda, G., M. A. Keniry, T. Huber, A. Y. Park, N. E. Dixon and G. Otting (2004). "Fast structure-based assignment of 15N HSQC spectra of selectively 15N-labeled paramagnetic proteins." *J Am Chem Soc* **126**(9): 2963-70.
- Polk, S. (2010). Charakterisierung der Bindung von 3-amino-3-deoxy-Hexopyranosen an die humane Blutgruppengalaktosyltransferase B (GTB). *Institut für Chemie, Universität zu Lübeck*.
- Qasba, P. K., B. Ramakrishnan and E. Boeggeman (2005). "Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases." *Trends Biochem Sci* **30**(1): 53-62.
- Rademacher, C., J. Landstrom, N. Sindhuwinata, M. M. Palcic, G. Widmalm and T. Peters (2010). "NMR-based exploration of the acceptor binding site of human blood group B galactosyltransferase with molecular fragments." *Glycoconj J* **27**(3): 349-58.
- Rademacher, T. W., R. B. Parekh and R. A. Dwek (1988). "Glycobiology." *Annu Rev Biochem* **57**: 785-838.
- Radichev, I., S. A. Shiryayev, A. E. Aleshin, B. I. Ratnikov, J. W. Smith, R. C. Liddington and A. Y. Strongin (2008). "Structure-based mutagenesis identifies important novel determinants of the NS2B cofactor of the West Nile virus two-component NS2B-NS3 proteinase." *J Gen Virol* **89**(Pt 3): 636-41.
- Ramakrishnan, B., E. Boeggeman, V. Ramasamy and P. K. Qasba (2004). "Structure and catalytic cycle of beta-1,4-galactosyltransferase." *Curr Opin Struct Biol* **14**(5): 593-600.
- Ray, D., A. Shah, M. Tilgner, Y. Guo, Y. Zhao, H. Dong, T. S. Deas, Y. Zhou, H. Li and P. Y. Shi (2006). "West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5." *J Virol* **80**(17): 8362-70.
- Riek, R., K. Pervushin and K. Wuthrich (2000). "TROSY and CRINEPT: NMR with large molecular and supramolecular structures in solution." *Trends Biochem Sci* **25**(10): 462-8.

- Robin, G., K. Chappell, M. J. Stoermer, S. H. Hu, P. R. Young, D. P. Fairlie and J. L. Martin (2009). "Structure of West Nile virus NS3 protease: ligand stabilization of the catalytic conformation." *J Mol Biol* **385**(5): 1568-77.
- Rosen, M. K., K. H. Gardner, R. C. Willis, W. E. Parris, T. Pawson and L. E. Kay (1996). "Selective methyl group protonation of perdeuterated proteins." *J Mol Biol* **263**(5): 627-36.
- Sahu, D., G. M. Clore and J. Iwahara (2007). "TROSY-based z-exchange spectroscopy: application to the determination of the activation energy for intermolecular protein translocation between specific sites on different DNA molecules." *J Am Chem Soc* **129**(43): 13232-7.
- Salzmann, M., K. Pervushin, G. Wider, H. Senn and K. Wuthrich (1998). "TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13585-90.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sattler, M., J. Schleucher and C. Griesinger (1999). "Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients." *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **34**: 93-158.
- Schaefer, K., J. Albers, N. Sindhuwinata, T. Peters and B. Meyer (2012). "A new concept for glycosyltransferase inhibitors: nonionic mimics of the nucleotide donor of the human blood group B galactosyltransferase." *Chembiochem* **13**(3): 443-50.
- Schaefer, K., N. Sindhuwinata, T. Hackl, M. P. Kotzler, F. C. Niemeyer, M. M. Palcic, T. Peters and B. Meyer (2013). "A nonionic inhibitor with high specificity for the UDP-Gal donor binding site of human blood group B galactosyltransferase: design, synthesis, and characterization." *J Med Chem* **56**(5): 2150-4.
- Schöne, T. (2014). Identifikation allosterischer Inhibitoren gegen die WNV-Protease auf Basis von STD-NMR-Experimenten. *Institut für Chemie*, Universität zu Lübeck. **Masterarbeit**.
- Schuck, P. (1997). "Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **26**: 541-66.
- Schwytzer, M. and R. L. Hill (1977). "Porcine A blood group-specific N-acetylgalactosaminyltransferase." *J Biol Chem* **252**(7): 2346-55.
- Seto, N. O., C. A. Compston, S. V. Evans, D. R. Bundle, S. A. Narang and M. M. Palcic (1999). "Donor substrate specificity of recombinant human blood group A, B and hybrid A/B glycosyltransferases expressed in Escherichia coli." *Eur J Biochem* **259**(3): 770-5.
- Seto, N. O., C. A. Compston, A. Szpacenko and M. M. Palcic (2000). "Enzymatic synthesis of blood group A and B trisaccharide analogues." *Carbohydr Res* **324**(3): 161-9.
- Seto, N. O., M. M. Palcic, C. A. Compston, H. Li, D. R. Bundle and S. A. Narang (1997). "Sequential interchange of four amino acids from blood group B to blood group A glycosyltransferase boosts catalytic activity and progressively modifies substrate recognition in human recombinant enzymes." *J Biol Chem* **272**(22): 14133-8.
- Seto, N. O., M. M. Palcic, O. Hindsgaul, D. R. Bundle and S. A. Narang (1995). "Expression of a recombinant human glycosyltransferase from a synthetic gene and its utilization for synthesis of the human blood group B trisaccharide." *Eur J Biochem* **234**(1): 323-8.
- Shiryaev, S. A., A. E. Aleshin, B. I. Ratnikov, J. W. Smith, R. C. Liddington and A. Y. Strongin (2007). "Expression and purification of a two-component flaviviral proteinase resistant to autocleavage at the NS2B-NS3 junction region." *Protein Expr Purif* **52**(2): 334-9.
- Shiryaev, S. A., A. V. Chernov, A. E. Aleshin, T. N. Shiryaeva and A. Y. Strongin (2009). "NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus." *J Gen Virol* **90**(Pt 9): 2081-5.
- Shiryaev, S. A., B. I. Ratnikov, A. V. Chekanov, S. Sikora, D. V. Rozanov, A. Godzik, J. Wang, J. W. Smith, Z. Huang, I. Lindberg, M. A. Samuel, M. S. Diamond and A. Y. Strongin

- (2006). "Cleavage targets and the D-arginine-based inhibitors of the West Nile virus NS3 processing proteinase." *Biochem J* **393**(Pt 2): 503-11.
- Shoemaker, G. K., E. N. Kitova, M. M. Palcic and J. S. Klassen (2007). "Equivalency of binding sites in protein-ligand complexes revealed by time-resolved tandem mass spectrometry." *J Am Chem Soc* **129**(28): 8674-5.
- Shoemaker, G. K., N. Soya, M. M. Palcic and J. S. Klassen (2008). "Temperature-dependent cooperativity in donor-acceptor substrate binding to the human blood group glycosyltransferases." *Glycobiology* **18**(8): 587-92.
- Shuker, S. B., P. J. Hajduk, R. P. Meadows and S. W. Fesik (1996). "Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR." *Science* **274**(5292): 1531-4.
- Silberstein, S. and R. Gilmore (1996). "Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase." *FASEB J* **10**(8): 849-58.
- Sindhuwinata, N. (2007). NMR-Studien zum Mechanismus der humanen Blutgruppe B Galactosyltransferase. *Institut für Chemie, Universität zu Lübeck*.
- Sindhuwinata, N. (2012). Zum Katalysemechanismus der humanen Blutgruppe B Galactosyltransferase. *Institut für Chemie, Universität zu Lübeck. Dr. rer. nat.*
- Sindhuwinata, N., L. L. Grimm, S. Weissbach, S. Zinn, E. Munoz, M. M. Palcic and T. Peters (2013). "Thermodynamic signature of substrates and substrate analogs binding to human blood group B galactosyltransferase from isothermal titration calorimetry experiments." *Biopolymers* **99**(10): 784-95.
- Sindhuwinata, N., E. Munoz, F. J. Munoz, M. M. Palcic, H. Peters and T. Peters (2010). "Binding of an acceptor substrate analog enhances the enzymatic activity of human blood group B galactosyltransferase." *Glycobiology* **20**(6): 718-23.
- Sinnott, M. L. (1990). "Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer." *Chem Rev* **90**: 1171-1202.
- Skropeta, D., R. Schworer, T. Haag and R. R. Schmidt (2004). "Asymmetric synthesis and affinity of potent sialyltransferase inhibitors based on transition-state analogues." *Glycoconj J* **21**(5): 205-19.
- Smock, R. G. and L. M. Gierasch (2009). "Sending signals dynamically." *Science* **324**(5924): 198-203.
- Sobhany, M. and M. Negishi (2006). "Characterization of specific donor binding to alpha1,4-N-acetylhexosaminyltransferase EXTL2 using isothermal titration calorimetry." *Methods Enzymol* **416**: 3-12.
- Soya, N., Y. Fang, M. M. Palcic and J. S. Klassen (2011). "Trapping and characterization of covalent intermediates of mutant retaining glycosyltransferases." *Glycobiology* **21**(5): 547-52.
- Soya, N., G. K. Shoemaker, M. M. Palcic and J. S. Klassen (2009). "Comparative study of substrate and product binding to the human ABO(H) blood group glycosyltransferases." *Glycobiology* **19**(11): 1224-34.
- Speight, G., G. Coia, M. D. Parker and E. G. Westaway (1988). "Gene mapping and positive identification of the non-structural proteins NS2A, NS2B, NS3, NS4B and NS5 of the flavivirus Kunjin and their cleavage sites." *J Gen Virol* **69** (Pt 1): 23-34.
- Spiro, R. G. (2002). "Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds." *Glycobiology* **12**(4): 43R-56R.
- Sprangers, R. and L. E. Kay (2007). "Quantitative dynamics and binding studies of the 20S proteasome by NMR." *Nature* **445**(7128): 618-22.
- Stanley, P. and R. D. Cummings (2009). Structures Common to Different Glycans.
- Su, X. C., K. McAndrew, T. Huber and G. Otting (2008). "Lanthanide-binding peptides for NMR measurements of residual dipolar couplings and paramagnetic effects from multiple angles." *J Am Chem Soc* **130**(5): 1681-7.
- Su, X. C. and G. Otting (2010). "Paramagnetic labelling of proteins and oligonucleotides for NMR." *J Biomol NMR* **46**(1): 101-12.

- Su, X. C., K. Ozawa, R. Qi, S. G. Vasudevan, S. P. Lim and G. Otting (2009). "NMR analysis of the dynamic exchange of the NS2B cofactor between open and closed conformations of the West Nile virus NS2B-NS3 protease." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(12): e561.
- Su, X. C., K. Ozawa, H. Yagi, S. P. Lim, D. Wen, D. Ekonomiuk, D. Huang, T. H. Keller, S. Sonntag, A. Cafilisch, S. G. Vasudevan and G. Otting (2009). "NMR study of complexes between low molecular mass inhibitors and the West Nile virus NS2B-NS3 protease." *FEBS J* **276**(15): 4244-55.
- Thiyagarajan, N., T. T. Pham, B. Stinson, A. Sundriyal, P. Tumbale, M. Lizotte-Waniewski, K. Brew and K. R. Acharya (2012). "Structure of a metal-independent bacterial glycosyltransferase that catalyzes the synthesis of histo-blood group A antigen." *Sci Rep* **2**: 940.
- Tolman, J. R., J. M. Flanagan, M. A. Kennedy and J. H. Prestegard (1995). "Nuclear magnetic dipole interactions in field-oriented proteins: information for structure determination in solution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9279-83.
- Tolman, J. R. and K. Ruan (2006). "NMR residual dipolar couplings as probes of biomolecular dynamics." *Chem Rev* **106**(5): 1720-36.
- Torchia, D. A. (2011). "Dynamics of biomolecules from picoseconds to seconds at atomic resolution." *J Magn Reson* **212**(1): 1-10.
- Tugarinov, V., P. M. Hwang, J. E. Ollerenshaw and L. E. Kay (2003). "Cross-correlated relaxation enhanced ^1H [bond] ^{13}C NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes." *J Am Chem Soc* **125**(34): 10420-8.
- Tugarinov, V., V. Kanelis and L. E. Kay (2006). "Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy." *Nat Protoc* **1**(2): 749-54.
- Tugarinov, V. and L. E. Kay (2003). "Ile, Leu, and Val methyl assignments of the 723-residue malate synthase G using a new labeling strategy and novel NMR methods." *J Am Chem Soc* **125**(45): 13868-78.
- Tugarinov, V. and L. E. Kay (2004). "An isotope labeling strategy for methyl TROSY spectroscopy." *J Biomol NMR* **28**(2): 165-72.
- Tvaroska, I. (2004). "Molecular modeling insights into the catalytic mechanism of the retaining galactosyltransferase LgtC." *Carbohydr Res* **339**(5): 1007-14.
- Unligil, U. M. and J. M. Rini (2000). "Glycosyltransferase structure and mechanism." *Curr Opin Struct Biol* **10**(5): 510-7.
- Vallurupalli, P., G. Bouvignies and L. E. Kay (2011). "Increasing the exchange time-scale that can be probed by CPMG relaxation dispersion NMR." *J Phys Chem B* **115**(49): 14891-900.
- Varki, A. (1993). "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct." *Glycobiology* **3**(2): 97-130.
- Varki, A., R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart and M. E. Etzler (2009). *Essentials of Glycobiology*, CSH Press.
- Vega, A. and D. Fiat (1976). "Nuclear relaxation processes of paramagnetic complexes: The slow-motion case." *Molecular Physics* **31**(2): 347-355.
- Von Decastello, A. and A. Sturli (1902). "Ueber die Isoagglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen." *Münch. Med. Wochenschr.* **49**: 1090-1095.
- Vranken, W. F., W. Boucher, T. J. Stevens, R. H. Fogh, A. Pajon, M. Llinas, E. L. Ulrich, J. L. Markley, J. Ionides and E. D. Laue (2005). "The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline." *Proteins* **59**(4): 687-96.
- Wand, A. J. (2001). "Dynamic activation of protein function: a view emerging from NMR spectroscopy." *Nat Struct Biol* **8**(11): 926-31.
- Weadge, J. and M. M. Palcic (2008). Chemistry of Glycosyltransferases. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, John Wiley & Sons, Inc.

- Wengler, G. and E. Castle (1986). "Analysis of structural properties which possibly are characteristic for the 3'-terminal sequence of the genome RNA of flaviviruses." J Gen Virol **67** (Pt 6): 1183-8.
- Wengler, G., G. Czaya, P. M. Farber and J. H. Hegemann (1991). "In vitro synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids." J Gen Virol **72** (Pt 4): 851-8.
- Williamson, M. P. (2013). "Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding." Prog Nucl Magn Reson Spectrosc **73**: 1-16.
- Winzor, D. J. and C. M. Jackson (2006). "Interpretation of the temperature dependence of equilibrium and rate constants." J Mol Recognit **19**(5): 389-407.
- Wiseman, T., S. Williston, J. F. Brandts and L. N. Lin (1989). "Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter." Anal Biochem **179**(1): 131-7.
- Witsell, D. L., C. E. Casey and M. C. Neville (1990). "Divalent cation activation of galactosyltransferase in native mammary Golgi vesicles." J Biol Chem **265**(26): 15731-7.
- Xiang, Y., U. Baxa, Y. Zhang, A. C. Steven, G. L. Lewis, J. L. Van Etten and M. G. Rossmann (2010). "Crystal structure of a virus-encoded putative glycosyltransferase." J Virol **84**(23): 12265-73.
- Yamamoto, F. (2004). "Review: ABO blood group system--ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes." Immunohematology **20**(1): 3-22.
- Yamamoto, F., H. Clausen, T. White, J. Marken and S. Hakomori (1990). "Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system." Nature **345**(6272): 229-33.
- Yamamoto, M., X. H. Lin, Y. Kominato, Y. Hata, R. Noda, N. Saitou and F. Yamamoto (2001). "Murine equivalent of the human histo-blood group ABO gene is a cis-AB gene and encodes a glycosyltransferase with both A and B transferase activity." J Biol Chem **276**(17): 13701-8.
- Yuriev, E., W. Farrugia, A. M. Scott and P. A. Ramsland (2005). "Three-dimensional structures of carbohydrate determinants of Lewis system antigens: implications for effective antibody targeting of cancer." Immunol Cell Biol **83**(6): 709-17.
- Yuzwa, S. A., M. S. Macauley, J. E. Heinonen, X. Shan, R. J. Dennis, Y. He, G. E. Whitworth, K. A. Stubbs, E. J. McEachern, G. J. Davies and D. J. Vocadlo (2008). "A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo." Nat Chem Biol **4**(8): 483-90.
- Zechel, D. L. and S. G. Withers (2000). "Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst." Acc Chem Res **33**(1): 11-8.
- Zhang, Y., J. Corver, P. R. Chipman, W. Zhang, S. V. Pletnev, D. Sedlak, T. S. Baker, J. H. Strauss, R. J. Kuhn and M. G. Rossmann (2003). "Structures of immature flavivirus particles." EMBO J **22**(11): 2604-13.
- Zhang, Y., P. G. Wang and K. Brew (2001). "Specificity and mechanism of metal ion activation in UDP-galactose:beta -galactoside-alpha -1,3-galactosyltransferase." J Biol Chem **276**(15): 11567-74.

6 Anhang

6.1 Materialien

6.1.1 Chemikalien

Tabelle 6.1 | Verwendete Chemikalien.

Substanz	Hersteller
[4-(carbamimidoylsulfanylmethyl)-2,5-dimethylphenyl]-methylsulfanylmethanimidamide (WNV-Inhibitor)	Maybridge
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Biacore
2-Keto-4- ¹³ C-butyrat	CortecNet
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
2-Mercaptoethanol-d ₆ (98 % D)	Euriso-Top
2-Propanol	Merck, Roth
3AD (α-L-Fuc-(1,2)-β-D-3-amino-3-deoxy-Gal-O-methyl)	W. Hellebrandt (Institut für Chemie
3DD (α-L-Fucp-(1,2)-β-D-(3-desoxy)-Galp-(1,O)-(CH ₂) ₇ CH ₃)	Prof. Dr. O. Hindsgaul, Kopenhagen, Dänemark / W. Hellebrandt (Institut für Chemie)
3-Phenyl-5-(piperazin-1-yl)-1,2,4-thiadiazol (Fragment 382)	Maybridge
Ammoniumchlorid (¹⁵ NH ₄ Cl, 99 % ¹⁵ N)	Cambridge Isotope Laboratories
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	ICN Biomedicals, Merck
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich
Ampicillin Natriumsalz	Gerbu
Aprotinin	Sigma Aldrich
Bis-Tris	Fluka
Bis-Tris-d ₁₉ (98 % D)	Cambridge Isotope Laboratories, Euriso-Top
Bovines Serumalbumin, Fraktion V, pH7	Serva
Bradford-Reagenz Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	Merck, Sigma Aldrich
Casaminosäuren, Caseinhydrolysat	Merck
Cholinchlorid	Fluka
Cobaltchlorid-Hexahydrat (CoCl ₂ · 6H ₂ O)	Merck
D-Biotin	Sigma Aldrich
Deuteriumoxid (D ₂ O) 99,85 % D	Euriso-Top, CortecNet
Deuteriumoxid 100 % (D ₂ O) 99,97 % D	Euriso-Top
D-Glucose	Merck
D-Glucose (1,2,3,4,5,6,6 D7)	Euriso-Top
D-Glucose (98 % u- ¹³ C ₆ , 1,2,3,4,5,6,6 D7)	Euriso-Top
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O)	Merck

D-Pantothensäure Hemicalciumsalz	Sigma Aldrich
DTT	Gerbu
Dysprosiumchlorid (DyCl ₃)	Sigma Aldrich
Dysprosiumchlorid-Hexahydrat (DyCl ₃ · 6H ₂ O)	Sigma Aldrich
Eco E. coli OD 2 CDN	Silantes
Eco E. coli OD 2 DN	Silantes
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Roth
Eisenchlorid-Hexahydrat (FeCl ₃ · 6H ₂ O)	Merck
Ethanol, absolut	Roth
Ethanol, vergällt	Büfa Chemikalien
Ethanolaminhydrochlorid	Biacore
Folsäure	Sigma Aldrich
Gadoliniumchlorid (GdCl ₃)	Sigma Aldrich
Gadoliniumchlorid-Hexahydrat (GdCl ₃ · 6H ₂ O)	Sigma Aldrich
Gel Code® Blue Stain Reagent	Pierce
Glycerin	Roth
Glycin	Merck, Sigma
Harnstoff	Gerbu
H-Dis-O- ¹³ CH ₃	W. Hellebrandt (Institut für Chemie)
H-Dis-octyl	W. Hellebrandt (Institut für Chemie)
Hefeextrakt	Roth, Serva
Imidazol	Fluka
IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid)	Gerbu
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Sigma Aldrich, Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Roth
Lanthanchlorid (LaCl ₃)	Sigma Aldrich
Lanthanchlorid-Heptahydrat (LaCl ₃ · 7H ₂ O)	Sigma Aldrich
Magensiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	Merck
Manganchlorid-Tetrahydrat (MnCl ₂ · 4H ₂ O)	Sigma Aldrich
Methanol	Merck
MOPS	Gerbu
myo-Inositol	Sigma Aldrich
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O)	Merk
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
NeutrAvidin®	Pierce
N-Hydrosysuccinimid (NHS)	Biacore
Nicotinamid	Sigma Aldrich
Proteaseinhibitortabletten, cOmpete, EDTA-free	Roche
Proteinstandard Bovines Gammaglobulin	Pierce
Proteinstandard SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range	Bio-Rad
Pyridoxalhydrochlorid	Sigma Aldrich
Riboflavin	Sigma Aldrich
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid:Bis-Acrylamid 37,5:1)	Roth

Materialien

SDS	Serva, Sigma Aldrich
SP-Sepharose TM Fast Flow	GE Healthcare
Szinti Mix Aquasafe 800	Zinsser Analytik
TEMED	Sigma Aldrich
Thiaminhydrochlorid	Sigma Aldrich
Tris/HCl	Roth, Merck
Trypton	Roth
TSP-d ₄ Natriumsalz (98 % D)	Aldrich
UDP Dinatriumsalz	Sigma Aldrich
UDP-GalNAc Dinatriumsalz	Sigma Aldrich
UDP-Glc	Sigma Aldrich
UDP-Hexanolamin-Sepharose	Prof. Dr. M. M. Palcic, Kopenhagen, Dänemark / W. Hellebrandt (Institut für Chemie)
UDP-u- ¹⁴ C-Gal Lithiumsalsz	Amersham Biosciences
UDP-u- ¹⁴ C-GalNAc Lithiumsalsz	ARC
UDP- α -D-Gal Dinatriumsalz	Prof. Dr. B. Ernst, Basel, Schweiz
UMP Dinatriumsalz	Fluka
Uridin	Fluka
Vitamin B12 (Cyanocobalamin)	Sigma Aldrich
Ytterbiumchlorid (YbCl ₃)	Sigma Aldrich
Ytterbiumchlorid-Hexahydrat (YbCl ₃ · 6H ₂ O)	Sigma Aldrich

6.1.2 Gebrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Dialysekassetten, Slide-A-Lyzer, 10 kDa	Thermo Scientific
Dialyseschlauch, SnakeSkin® Pleated, 10 kDa	Thermo Scientific, Pierce
Filtereinheit, Steritop™-GP, 500 ml, 0,22 µm	Millipore
Filtereinheit, Flow Bottle Top Filter, aPES Membran, 0,2 µm	Thermo Scientific
Kanülen, steril	B/Braun
Küvetten, Einmal-Viereck-	Sarstedt
Mikrotestplatten, 96 Vertiefungen, flach	Roth
NMR-Röhrchen, 3 mm für Bruker Match™ System	Hilgenberg
NMR-Röhrchen, 5 mm Whigemie für D2O, Bruker	Shigemi
pH-Universalindikatorpapier	Merck
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Sensor Chip CM5	Biacore, GE Healthcare
Sep-Pak® Vac RC (100 mg) C18-Cartridges	Waters
Spritzen, steril	B/Braun, BD
Spritzenfilter, Millex®-GB, steril, PVDF, 0,22 µm	Millipore
Spritzenfilter, Rotilabo®, steril, CME, 0,22 µm	Carl Roth
Spritzentilter, Rotilabo®, unsteril, CME, 0,8 µm	Carl Roth
Szintillationsflaschen mit Deckel, PE, 20 ml	PerkinElmer

Zentrifugen-Filtereinheit, Amicon® Ultra-4, 10 kDa	Millipore
Zentrifugen-Filtereinheit, Vivaspin 15R, 10 kDa	sartorius stedium biotech

6.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
ÄKTA purifier 10: CU-950, Frac-950, Mixer M-925, Monitor UV-900, Monitor pH/C-900, Pump P-903, Valve INV-907, Valve PV-908	GE Healthcare
Autoklav 3850 ELV	tuttnauer Systec
Autoklav Laboklav MSV 55	SHP Steriltechnik AG
Biacore 3000	Biacore
Bradford-Reagenz Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad
Detektor Uvicord SII	Pharmacia Biotech
Elektroporator Gene Pulser II	Bio-Rad
Flüssigkeitsszintillationszähler Wallac 1409	Wallac
Fraktionssammler SuperFrac™	Pharmacia Biotech
French Press Cell Disrupter: French-Pressure Cell Press, French Pressure Cell 40K, rapid Fill Kit	Thermo IEC
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD plus	Christ
Gefriertrocknungsanlage BETA A	Christ
Geltrockner Model 543	Bio-Rad
Glasfritte P3	
Glasfritte P4	
HiLoad 26/600 Superdex™ 75 pepgrade	GE Healthcare Life Science
Inkubator Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
Inkubator Orbital Shaker Model 420	Forma Scientific
iTC ₂₀₀	MicroCal
MRX Microplate Reader	Dynex Technologies
NMR-Spektrometer Bruker Avance DRX-500/AVIII-500 mit TCI-Kryoprobenkopf (Lübeck), SampleXpress	Bruker
NMR-Spektrometer Bruker Avance II 600 mit TCI-Kryoprobenkopf (Frankfurt)	Bruker
NMR-Spektrometer Bruker Avance III 950 mit TCI-Kryoprobenkopf (Frankfurt)	Bruker
NMR-Spektrometer Bruker Avance I 700 mit TXI-Kryoprobenkopf (Hamburg)	Bruker
Orbitalschüttler IKA KS 125 basic	IKA Labortechnik
Pumpe Econo Pumpe	Bio-Rad
Reinstwassersystem RS 90-4/UF	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH
Säule XK 15/20 + Adapter	Pharmacia Biotech
Säule XK 26/40 + Adapter	Pharmacia Biotech
Säulen Econo-Column® + Flow Adaptor	Bio-Rad
Schreiber Rec 112, Rec 102	Pharmacia Biotech
SDS-PAGE-Zubehör Mini-PROTEAN® 3	Bio-Rad

Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad
Spektralphotometer MRX TC	Dynex Tehcnologies
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	peqlab
Spektralphotometer V550 UV/VIS	Jasco
TGradient	Biometra
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermomixer Thermostat 5320	Eppendorf
Thermomixer Thermostat plus	Eppendorf
Vakuum-Controlller B161	Büchi
Vakuumkammer BAKER spe-12G	J. T. Baker
Vakuumpumpe Duo 5	Pfeiffer Vakuum
Waage KERN BA BC 200	Kern
Waage KERN PCB 1000-2	Kern
Waage Microwaage MC 210 S	Sartorius
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Scientific
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf
Zentrifuge Optima™ LE-80K	Beckmann Coulter
Zentrifuge Sorvall RC 5B Plus, Rotor GS3, Rotor SA 600	Du Pont

6.2 Protein Präparation

6.2.1 Mutageneseprimer

GTB I123V

*

Forward: 5' CGTCGTATGGAAATGGTCAGCGACTTCTGCG 3'
Reverse: 5' CGCAGAAGTCGCTGACCATTTCCATACGACG 3'

*

GC content: 54.84%	Location: 391-421
Melting temp: 79.3°C	Mismatched bases: 1
Length: 31 bp	Mutation: Substitution
5' flanking region: 15 bp	Forward primer MW: 9567.31 Da
3' flanking region: 15 bp	Reverse primer MW: 9465.27 Da

GTB I192V

*

Forward: 5' CGTCGTATGGAAATGGTCAGCGACTTCTGCG 3'
Reverse: 5' CGCAGAAGTCGCTGACCATTTCCATACGACG 3'

*

GC content: 54.84%	Location: 391-421
Melting temp: 79.3°C	Mismatched bases: 1


```
-10GTB      GAATACCTGTGGGACCAGCAACTGCTGGGTTGGCCGGCTGTTCTGCGTAAACTGCGTTTC 780
GTBI192V    GAATACCTGTGGGACCAGCAACTGCTGGGTTGGCCGGCTGTTCTGCGTAAACTGCGTTTC 780
GTBI123V    GAATACCTGTGGGACCAGCAACTGCTGGGTTGGCCGGCTGTTCTGCGTAAACTGCGTTTC 780
*****
```

```
-10GTB      ACTGCAGTTCGGAAAAACCACCAGGCTGTTTCGTAACCCG 819
GTBI192V    ACTGCAGTTCGGAAAAACCACCAGGCTGTTTCGTAACCCG 819
GTBI123V    ACTGCAGTTCGGAAAAACCACCAGGCTGTTTCGTAACCCG 819
*****
```

6.3 NMR-Pulsprogramme

Es sind jeweils die verwendeten NMR-Pulsprogramme angegeben die sich nicht im Standardkatalog von Bruker befinden.

b_trosytf3gpsi.tb

```
;b_trosytf3gpsi.tb
;modifiziert am 15. November 2012, T.Biet
;avance-version (10/02/12)
;best-TROSY
;2D H-1/X correlation via TROSY
;  using sensitivity improvement
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient selection
;using f3 - channel
;uncompensated version d25=d26
;(use parameterset B_TROSYETF3GPSI)
;
;(E. Lescop, P. Schanda & B. Brutscher,
;  J. Magn. Reson. 187 163-169 (2007))
;(T. Schulte-Herbrueggen & O.W. Sorensen, J. Magn. Reson. 144,
;  123 - 128 (2000))
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

prosol relations=<triple>

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

define list<gradient> EA3 = { 1.0000 0.8750 }
define list<gradient> EA5 = { 0.6667 1.0000 }
define list<gradient> EA7 = { 1.0000 0.6595 }

"p22=p21*2"
"d11=30m"

"d25=2.7m"
"d26=2.7m"

"p29=300u"

"d0=3u"

"in0=inf1/2"

"DELTA1=d26-p29-d16-p41*cnst41-p42*cnst40"
"DELTA6=d25-p29-d16-larger(p22,p42)/2"
"DELTA7=d26-p16-d16-p42/2"
"DELTA8=p43*cnst44-de"

#  ifdef LABEL_CN
"DELTA=d0*2+p8+p21*4/3.1416"
#  else
```

```

"DELTA=d0*2+p21*4/3.1416"
#   endif /*LABEL_CN*/

"spoff13=bf2*(cnst26/1000000)-o2"

"spoff25=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff26=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff27=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff28=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff29=bf1*(cnst19/1000000)-o1"

"acqt0=0"
baseopt_echo

1 d11 ze
2 d11
3 d1 p11:f1
  50u UNBLKGRAD

  (p41:sp25 ph3)
  p29:gp1
  d16
  DELTA1
  (center (p42:sp26 ph2) (p22 ph1):f3 )
  DELTA1
  p29:gp1
  d16
  (p41:sp27 ph2):f1

  p16:gp2
  d16

  (p21 ph5):f3
  d0

#   ifdef LABEL_CN
  (p8:sp13 ph1):f2
#   else
#   endif /*LABEL_CN*/

  d0
  (p22 ph1):f3
  DELTA

  p16:gp3*EA3
  d16

  (p43:sp28 ph6)
  p29:gp4
  d16
  DELTA6
  (center (p42:sp26 ph2) (p22 ph2):f3 )
  DELTA6
  p29:gp4
  d16
  (p43:sp29 ph1)

  p16:gp5*EA5
  d16

  (p21 ph1):f3
  p16:gp6
  d16
  DELTA7 p10:f1
  (center (p42:sp26 ph2) (p22 ph2):f3 )
  DELTA7
  p16:gp6
  d16 p11:f1
  (p21 ph7:r):f3

  p16:gp7*EA7
  d16
  DELTA8
  4u BLKGRAD

  go=2 ph31
  d11 mc #0 to 2
  FILEA(calgrad(EA3) & calgrad(EA5) & calgrad(EA7) & calph(ph6, +180) & calph(ph7, +180),
  caldel(d0, +in0) & calph(ph5, +180) & calph(ph31, +180))
  exit

```

NMR-Pulsprogramme

```
ph1=0
ph2=1
ph3=2
ph4=3
ph5=0 2
ph6=1
ph7=1
ph31=0 2

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;sp13: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca and C=O, adiabatic)
;sp25: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Pc9_4_90.1000)
;sp26: f1 channel - shaped pulse 180 degree (Reburp.1000)
;sp27: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Pc9_4_90.1000)
;
;      for time reversed pulse
;sp28: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Eburp2.1000)
;sp29: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Eburp2tr.1000)
;
;      for time reversed pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p8 : f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion (adiabatic)
;p29: gradient pulse 3 [300 usec]
;p41: f1 channel - 90 degree shaped pulse for excitation
;      Pc9_4_90.1000 (2.2ms)
;p42: f1 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing
;      Reburp.1000 (1.5ms)
;p43: f1 channel - 90 degree shaped pulse for excitation
;      Eburp2.1000/Eburp2tr.1000 (1.4ms)
;d0 : incremented delay (F1) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d25: 1/(4J'(NH)) [2.7 msec]
;d26: 1/(4J(NH)) [2.7 msec]
;cnst19: H(N) chemical shift (offset, in ppm)
;cnst26: Call chemical shift (offset, in ppm) [101 ppm]
;cnst40: compensation of chemical shift evolution during p42
;      Reburp.1000: 0.5
;      compensate to the extend the other delays allow
;cnst41: compensation of chemical shift evolution during p41
;      Pc9_4_90.1000: 0.529
;cnst44: compensation of chemical shift evolution during p43
;      Eburp2.1000: 0.69
;infl: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;in0: 1/(2 * SW(N)) = DW(N)
;nd0: 2
;NS: 2 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments in F1
;FnMODE: echo-antiecho in F1

;for z-only gradients:
;gpz1: 2%
;gpz2: 21%
;gpz3: -80%
;gpz4: 5%
;gpz5: 30%
;gpz6: 45%
;gpz7: 30.13%

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.32
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.32
;gpnam5: SMSQ10.100
;gpnam6: SMSQ10.100
;gpnam7: SMSQ10.100

;Processing
;PHC0(F1): 45.0
```

metr_hmqcph.tb

```

;b_trosyETF3gpsi.tb
;modifiziert am 15. November 2012, T.Biet
;avance-version (10/02/12)
;best-TROSY
;2D H-1/X correlation via TROSY
; using sensitivity improvement
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient selection
;using f3 - channel
;uncompensated version d25=d26
;(use parameterset B_TROSYETF3GPSI)
;
;(E. Lescop, P. Schanda & B. Brutscher,
; J. Magn. Reson. 187 163-169 (2007))
;(T. Schulte-Herbrueggen & O.W. Sorensen, J. Magn. Reson. 144,
; 123 - 128 (2000))
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

prosol relations=<triple>

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

define list<gradient> EA3 = { 1.0000 0.8750 }
define list<gradient> EA5 = { 0.6667 1.0000 }
define list<gradient> EA7 = { 1.0000 0.6595 }

"p22=p21*2"
"d11=30m"

"d25=2.7m"
"d26=2.7m"

"p29=300u"

"d0=3u"

"in0=infl/2"

"DELTA1=d26-p29-d16-p41*cnst41-p42*cnst40"
"DELTA6=d25-p29-d16-larger(p22,p42)/2"
"DELTA7=d26-p16-d16-p42/2"
"DELTA8=p43*cnst44-de"

# ifdef LABEL_CN
"DELTA=d0*2+p8+p21*4/3.1416"
# else
"DELTA=d0*2+p21*4/3.1416"
# endif /*LABEL_CN*/

"spoff13=bf2*(cnst26/1000000)-o2"

"spoff25=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff26=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff27=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff28=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff29=bf1*(cnst19/1000000)-o1"

"acqt0=0"
baseopt_echo

1 d11 ze
2 d11
3 d1 p11:f1
50u UNBLKGRAD

(p41:sp25 ph3)

```

NMR-Pulsprogramme

```
p29:gp1
d16
DELTA1
(center (p42:sp26 ph2) (p22 ph1):f3 )
DELTA1
p29:gp1
d16
(p41:sp27 ph2):f1

p16:gp2
d16

(p21 ph5):f3
d0

# ifdef LABEL_CN
(p8:sp13 ph1):f2
# else
# endif /*LABEL_CN*/

d0
(p22 ph1):f3
DELTA

p16:gp3*EA3
d16

(p43:sp28 ph6)
p29:gp4
d16
DELTA6
(center (p42:sp26 ph2) (p22 ph2):f3 )
DELTA6
p29:gp4
d16
(p43:sp29 ph1)

p16:gp5*EA5
d16

(p21 ph1):f3
p16:gp6
d16
DELTA7 p10:f1
(center (p42:sp26 ph2) (p22 ph2):f3 )
DELTA7
p16:gp6
d16 p11:f1
(p21 ph7:r):f3

p16:gp7*EA7
d16
DELTA8
4u BLKGRAD

go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
F1EA(calgrad(EA3) & calgrad(EA5) & calgrad(EA7) & calph(ph6, +180) & calph(ph7, +180),
caldel(d0, +in0) & calph(ph5, +180) & calph(ph31, +180))
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=2
ph4=3
ph5=0 2
ph6=1
ph7=1
ph31=0 2

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;sp13: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca and C=0, adiabatic)
;sp25: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Pc9_4_90.1000)
;sp26: f1 channel - shaped pulse 180 degree (Reburp.1000)
;sp27: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Pc9_4_90.1000)
;
; for time reversed pulse
;sp28: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Eburp2.1000)
;sp29: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Eburp2tr.1000)
;
; for time reversed pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
```

```

;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p8 : f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion (adiabatic)
;p29: gradient pulse 3 [300 usec]
;p41: f1 channel - 90 degree shaped pulse for excitation
; Pc9_4_90.1000 (2.2ms)
;p42: f1 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing
; Reburp.1000 (1.5ms)
;p43: f1 channel - 90 degree shaped pulse for excitation
; Eburp2.1000/Eburp2tr.1000 (1.4ms)
;d0 : incremented delay (F1) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d25: 1/(4J'(NH)) [2.7 msec]
;d26: 1/(4J(NH)) [2.7 msec]
;cnst19: H(N) chemical shift (offset, in ppm)
;cnst26: Call chemical shift (offset, in ppm) [101 ppm]
;cnst40: compensation of chemical shift evolution during p42
; Reburp.1000: 0.5
; compensate to the extend the other delays allow
;cnst41: compensation of chemical shift evolution during p41
; Pc9_4_90.1000: 0.529
;cnst44: compensation of chemical shift evolution during p43
; Eburp2.1000: 0.69
;inf1: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;in0: 1/(2 * SW(N)) = DW(N)
;nd0: 2
;NS: 2 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments in F1
;FnMODE: echo-antiecho in F1

;for z-only gradients:
;gpz1: 2%
;gpz2: 21%
;gpz3: -80%
;gpz4: 5%
;gpz5: 30%
;gpz6: 45%
;gpz7: 30.13%

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.32
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.32
;gpnam5: SMSQ10.100
;gpnam6: SMSQ10.100
;gpnam7: SMSQ10.100

;Processing
;PHC0(F1): 45.0

```

metr_hmqcph-II.tb

```

;b_trosyETF3gpsi.tb
;modifiziert am 15. November 2012, T.Biet
;avance-version (10/02/12)
;best-TROSY
;2D H-1/X correlation via TROSY
; using sensitivity improvement
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient selection
;using f3 - channel
;uncompensated version d25=d26
;(use parameterset B_TROSYETF3GPSI)
;
;(E. Lescop, P. Schanda & B. Brutscher,
; J. Magn. Reson. 187 163-169 (2007))
;(T. Schulte-Herbrueggen & O.W. Sorensen, J. Magn. Reson. 144,
; 123 - 128 (2000))
;
; $CLASS=HighRes
; $DIM=2D
; $TYPE=
; $SUBTYPE=
; $COMMENT=

```

NMR-Pulsprogramme

```
prosol relations=<triple>

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

define list<gradient> EA3 = { 1.0000 0.8750 }
define list<gradient> EA5 = { 0.6667 1.0000 }
define list<gradient> EA7 = { 1.0000 0.6595 }

"p22=p21*2"
"d11=30m"

"d25=2.7m"
"d26=2.7m"

"p29=300u"

"d0=3u"

"in0=inf1/2"

"DELTA1=d26-p29-d16-p41*cnst41-p42*cnst40"
"DELTA6=d25-p29-d16-larger(p22,p42)/2"
"DELTA7=d26-p16-d16-p42/2"
"DELTA8=p43*cnst44-de"

#   ifdef LABEL_CN
"DELTA=d0*2+p8+p21*4/3.1416"
#   else
"DELTA=d0*2+p21*4/3.1416"
#   endif /*LABEL_CN*/

"spoff13=bf2*(cnst26/1000000)-o2"

"spoff25=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff26=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff27=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff28=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff29=bf1*(cnst19/1000000)-o1"

"acqt0=0"
baseopt_echo

1 d11 ze
2 d11
3 d1 p11:f1
   50u UNBLKGRAD

   (p41:sp25 ph3)
   p29:gp1
   d16
   DELTA1
   (center (p42:sp26 ph2) (p22 ph1):f3 )
   DELTA1
   p29:gp1
   d16
   (p41:sp27 ph2):f1

   p16:gp2
   d16

   (p21 ph5):f3
   d0

#   ifdef LABEL_CN
   (p8:sp13 ph1):f2
#   else
#   endif /*LABEL_CN*/

   d0
   (p22 ph1):f3
   DELTA
```

```

p16:gp3*EA3
d16

(p43:sp28 ph6)
p29:gp4
d16
DELTA6
(center (p42:sp26 ph2) (p22 ph2):f3 )
DELTA6
p29:gp4
d16
(p43:sp29 ph1)

p16:gp5*EA5
d16

(p21 ph1):f3
p16:gp6
d16
DELTA7 p10:f1
(center (p42:sp26 ph2) (p22 ph2):f3 )
DELTA7
p16:gp6
d16 p11:f1
(p21 ph7:r):f3

p16:gp7*EA7
d16
DELTA8
4u BLKGRAD

go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
F1EA(calgrad(EA3) & calgrad(EA5) & calgrad(EA7) & calph(ph6, +180) & calph(ph7, +180),
caldel(d0, +in0) & calph(ph5, +180) & calph(ph31, +180))
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=2
ph4=3
ph5=0 2
ph6=1
ph7=1
ph31=0 2

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;sp13: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca and C=0, adiabatic)
;sp25: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Pc9_4_90.1000)
;sp26: f1 channel - shaped pulse 180 degree (Reburp.1000)
;sp27: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Pc9_4_90.1000)
;
; for time reversed pulse
;sp28: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Eburp2.1000)
;sp29: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Eburp2tr.1000)
;
; for time reversed pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p8 : f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion (adiabatic)
;p29: gradient pulse 3 [300 usec]
;p41: f1 channel - 90 degree shaped pulse for excitation
; Pc9_4_90.1000 (2.2ms)
;p42: f1 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing
; Reburp.1000 (1.5ms)
;p43: f1 channel - 90 degree shaped pulse for excitation
; Eburp2.1000/Eburp2tr.1000 (1.4ms)
;d0 : incremented delay (F1) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d25: 1/(4J'(NH) [2.7 msec]
;d26: 1/(4J(NH) [2.7 msec]
;cnst19: H(N) chemical shift (offset, in ppm)
;cnst26: Call chemical shift (offset, in ppm) [101 ppm]
;cnst40: compensation of chemical shift evolution during p42
; Reburp.1000: 0.5
; compensate to the extend the other delays allow
;cnst41: compensation of chemical shift evolution during p41
; Pc9_4_90.1000: 0.529
;cnst44: compensation of chemical shift evolution during p43

```

NMR-Pulsprogramme

```
;          Eburp2.1000: 0.69
;inf1: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;in0: 1/(2 * SW(N)) = DW(N)
;nd0: 2
;NS: 2 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments in F1
;FnMODE: echo-antiecho in F1

;for z-only gradients:
;gpz1: 2%
;gpz2: 21%
;gpz3: -80%
;gpz4: 5%
;gpz5: 30%
;gpz6: 45%
;gpz7: 30.13%

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.32
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.32
;gpnam5: SMSQ10.100
;gpnam6: SMSQ10.100
;gpnam7: SMSQ10.100

;Processing

;PHC0(F1): 45.0
```

metr_hmqcph-III.tb

```
;b_trosetf3gpsi.tb
;modifiziert am 15. November 2012, T.Biet
;avance-version (10/02/12)
;best-TROSY
;2D H-1/X correlation via TROSY
;  using sensitivity improvement
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient selection
;using f3 - channel
;uncompensated version d25=d26
;(use parameterset B_TROSYETF3GPSI)
;
;(E. Lescop, P. Schanda & B. Brutscher,
;  J. Magn. Reson. 187 163-169 (2007))
;(T. Schulte-Herbrueggen & O.W. Sorensen, J. Magn. Reson. 144,
;  123 - 128 (2000))
;
;CLASS=HighRes
;DIM=2D
;TYPE=
;SUBTYPE=
;COMMENT=

prosol relations=<triple>

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

define list<gradient> EA3 = { 1.0000 0.8750 }
define list<gradient> EA5 = { 0.6667 1.0000 }
define list<gradient> EA7 = { 1.0000 0.6595 }

;p22=p21*2"
;d11=30m"

;d25=2.7m"
;d26=2.7m"

;p29=300u"
```

```
"d0=3u"

"in0=inf1/2"

"DELTA1=d26-p29-d16-p41*cnst41-p42*cnst40"
"DELTA6=d25-p29-d16-larger(p22,p42)/2"
"DELTA7=d26-p16-d16-p42/2"
"DELTA8=p43*cnst44-de"

#   ifdef LABEL_CN
"DELTA=d0*2+p8+p21*4/3.1416"
#   else
"DELTA=d0*2+p21*4/3.1416"
#   endif /*LABEL_CN*/

"spoff13=bf2*(cnst26/1000000)-o2"

"spoff25=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff26=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff27=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff28=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff29=bf1*(cnst19/1000000)-o1"

"acqt0=0"
baseopt_echo

1 d11 ze
2 d11
3 d1 p11:f1
   50u UNBLKGRAD

   (p41:sp25 ph3)
   p29:gp1
   d16
   DELTA1
   (center (p42:sp26 ph2) (p22 ph1):f3 )
   DELTA1
   p29:gp1
   d16
   (p41:sp27 ph2):f1

   p16:gp2
   d16

   (p21 ph5):f3
   d0

#   ifdef LABEL_CN
   (p8:sp13 ph1):f2
#   else
#   endif /*LABEL_CN*/

   d0
   (p22 ph1):f3
   DELTA

   p16:gp3*EA3
   d16

   (p43:sp28 ph6)
   p29:gp4
   d16
   DELTA6
   (center (p42:sp26 ph2) (p22 ph2):f3 )
   DELTA6
   p29:gp4
   d16
   (p43:sp29 ph1)

   p16:gp5*EA5
   d16

   (p21 ph1):f3
   p16:gp6
   d16
   DELTA7 p10:f1
   (center (p42:sp26 ph2) (p22 ph2):f3 )
   DELTA7
   p16:gp6
   d16 p11:f1
```

NMR-Pulsprogramme

```
(p21 ph7:r):f3

p16:gp7*EA7
d16
DELTA8
4u BLKGRAD

go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
F1EA(calgrad(EA3) & calgrad(EA5) & calgrad(EA7) & calph(ph6, +180) & calph(ph7, +180),
caldel(d0, +in0) & calph(ph5, +180) & calph(ph31, +180))
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=2
ph4=3
ph5=0 2
ph6=1
ph7=1
ph31=0 2

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;sp13: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca and C=O, adiabatic)
;sp25: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Pc9_4_90.1000)
;sp26: f1 channel - shaped pulse 180 degree (Reburp.1000)
;sp27: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Pc9_4_90.1000)
;
;      for time reversed pulse
;sp28: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Eburp2.1000)
;sp29: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Eburp2tr.1000)
;
;      for time reversed pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p8 : f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion (adiabatic)
;p29: gradient pulse 3 [300 usec]
;p41: f1 channel - 90 degree shaped pulse for excitation
;      Pc9_4_90.1000 (2.2ms)
;p42: f1 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing
;      Reburp.1000 (1.5ms)
;p43: f1 channel - 90 degree shaped pulse for excitation
;      Eburp2.1000/Eburp2tr.1000 (1.4ms)
;d0 : incremented delay (F1) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d25: 1/(4J'(NH)) [2.7 msec]
;d26: 1/(4J(NH)) [2.7 msec]
;cnst19: H(N) chemical shift (offset, in ppm)
;cnst26: Call chemical shift (offset, in ppm) [101 ppm]
;cnst40: compensation of chemical shift evolution during p42
;      Reburp.1000: 0.5
;      compensate to the extend the other delays allow
;cnst41: compensation of chemical shift evolution during p41
;      Pc9_4_90.1000: 0.529
;cnst44: compensation of chemical shift evolution during p43
;      Eburp2.1000: 0.69
;in1: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;in0: 1/(2 * SW(N)) = DW(N)
;nd0: 2
;NS: 2 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments in F1
;FnMODE: echo-antiecho in F1

;for z-only gradients:
;gpz1: 2%
;gpz2: 21%
;gpz3: -80%
;gpz4: 5%
;gpz5: 30%
;gpz6: 45%
;gpz7: 30.13%

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.32
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.32
```

```
;gpnam5: SMSQ10.100
;gpnam6: SMSQ10.100
;gpnam7: SMSQ10.100
```

```
;Processing
```

```
;PHC0(F1): 45.0
```

metr-hmqcph.tb / metr-hmqcph_new.tb

Hierbei handelt es sich um dieselben Pulsprogramme, jedoch wurden bei metr-hmqcph_new.tb zwei 4 μ s Wartezeiten eingefügt und sind hervorgehoben.

```
;metr-hmqcph.tb
;avance-version (09/04/17)
;Methyl-TROSY HMQC with optional Water supression
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum
; coherence
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;
;V. Tugarinov, P.W. Hwang, J.E. Ollerenshaw & L.E. Kay,
; J. Magn. Reson. 125, 10420-10428 (2003)
;
; $CLASS=HighRes
; $DIM=2D
; $TYPE=
; $SUBTYPE=
; $COMMENT=
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2"
"d2=3.6m"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
```

```
"d0=3u"
```

```
"in0=inf1/2"
```

```
"DELTA1=d2-p19-d16-d13"
```

```
1 ze
2 d11 do:f2
3 4u
```

```
# ifdef WATER
d11 fq=cnst20 (bf ppm) :f1
d11 p19:f1
d1 cw:f1 ph29
d13 do:f1
d13 p12:f2
# else
d1 p12:f2
# endif
```

```
p3:f2 ph0
d13 UNBLKGRAD
```

```
# ifdef WATER
4u
p16:gp1
d16 fq=0 :f1
# else
4u
p16:gp1
d16
# endif
```

```

d12 pl1:f1
pl ph1
d13
p19:gp2
d16
DELTA1
p3:f2 ph3
d0
p2 ph2
d0
p3:f2 ph4
DELTA1
p19:gp2
d16 pl12:f2
d13 BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 mc #0 to 2 F1PH(calph(ph3, +90) & calph(ph29, +90), caldel(d0, +in0))
exit

```

```

ph0=0
ph1=0
ph2=0
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph29=0
ph31=0 2 2 0

```

```

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p19: gradient pulse 2 [500 usec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH [3.6 ms]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst20: chemical shift of residual Water peak (in ppm) [4.7 ppm]
;infl: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;for z-only gradients:
;gpz1: 30%
;gpz2: 40%

;use gradient files:
;gpnaml: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100

;preprocessor-flags-start
;WATER: for optional Watersuppression start experiment with
; option -DWATER (eda: ZGPTNS)
;preprocessor-flags-end

```

metr-hmqcphnd.2.tb

```

;metr-hmqcph.tb
;avance-version (09/04/17)
;Methyl-TROSY HMQC with optional Water supression
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum
; coherence
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;
;V. Tugarinov, P.W. Hwang, J.E. Ollerenshaw & L.E. Kay,
; J. Magn. Reson. 125, 10420-10428 (2003)

```

```
;  
;$CLASS=HighRes  
;$DIM=2D  
;$TYPE=  
;$SUBTYPE=  
;$COMMENT=  
  
#include <Avance.incl>  
#include <Grad.incl>  
#include <Delay.incl>  
  
"p2=p1*2"  
"d2=3.6m"  
"d11=30m"  
"d12=20u"  
"d13=4u"  
  
"d0=3u"  
  
"in0=inf1/2"  
  
"DELTA1=d2-p19-d16-d13"  
  
1 ze  
2 d11  
3 4u  
  
# ifdef WATER  
  d11 fq=cnst20 (bf ppm) :f1  
  d11 p19:f1  
  d1 cw:f1 ph29  
  d13 do:f1  
  d13 p12:f2  
# else  
  d1 p12:f2  
# endif  
  
  p3:f2 ph0  
  d13 UNBLKGRAD  
  
# ifdef WATER  
  p16:gp1  
  d16 fq=0 :f1  
# else  
  p16:gp1  
  d16  
# endif  
  
  d12 p11:f1  
  p1 ph1  
  d13  
  p19:gp2  
  d16  
  DELTA1  
  p3:f2 ph3  
  d0  
  p2 ph2  
  d0  
  p3:f2 ph4  
  4u  
  p19:gp2  
  d16  
  4u BLKGRAD  
  go=2 ph31  
  d11 mc #0 to 2 F1PH(calph(ph3, +90) & calph(ph29, +90), caldel(d0, +in0))  
exit  
  
ph0=0  
ph1=0  
ph2=0  
ph3=0 2  
ph4=0 0 2 2  
ph29=0  
ph31=0 2 2 0  
  
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)  
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
```

```
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse           [1 msec]
;p19: gradient pulse 2                   [500 usec]
;d0 : incremented delay (2D)             [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH                           [3.6 ms]
;d11: delay for disk I/O                 [30 msec]
;d12: delay for power switching          [20 usec]
;d13: short delay                        [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst20: chemical shift of residual Water peak (in ppm) [4.7 ppm]
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ

;for z-only gradients:
;gpz1: 30%
;gpz2: 40%

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100

;preprocessor-flags-start
;WATER: for optional Watersupression start experiment with
; option -DWATER (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end
```

hmqcrexgpphpr.tb / hmqcrexgpphpr_new.tb

Hierbei handelt es sich um dieselben Pulsprogramme, jedoch wurden bei hmqcrexgpphpr_new.tb zwei 4 μ s Wartezeiten eingefügt und sind hervorgehoben.

```
;hmqcrexgpphpr.tb
;avance-version (09/04/17)
;HMQC
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum
; coherence
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;
;D.M. Korzhnev, K. Kloiber, V. Kanelis, V. Tugarinov & L.E. Kay,
; J. Magn. Reson. 126, 3964-3973 (2004)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"d2=1s/(cnst2*2)"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"

"d0=3u"

"in0=inf1/2"

"DELTA1=d2-p19-d16-d13"
```

```

1 ze
2 dl1 do:f2
3 4u

# ifdef WATER
dl1 fq=cnst20 (bf ppm) :f1
dl1 pl9:f1
dl cw:f1 ph29
dl3 do:f1
dl3 pl2:f2
# else
dl pl2:f2
# endif

"if (cnst9 == 0) \
{ \
  DELTA3=1s; \
  COUNTER=0; \
} \
else \
{ \
  DELTA3=(1 / (cnst9*4) ) - p30/2000000; \
  COUNTER=d21*cnst9*2; \
}"

p3:f2 ph0
dl3 UNBLKGRAD

# ifdef WATER
4u
pl6:gp1
dl6 fq=0 :f1
# else
4u
pl6:gp1
dl6
# endif

dl2 pl1:f1
pl ph1
dl3
pl9:gp2
dl6
DELTA1
p3:f2 ph3
4u pl23:f2

if "cnst9 == 0"
{
  4u
}
else
{
  4u
6  DELTA3
  (p30 ph5):f2
  DELTA3
  lo to 6 times COUNTER
}

p2 ph6

if "cnst9 == 0"
{
  4u
}
else
{
  4u
7  DELTA3
  (p30 ph5):f2
  DELTA3
  lo to 7 times COUNTER
}

d0
p2 ph2
d0 pl2:f2
p3:f2 ph4
p2 ph1
DELTA1
pl9:gp2
dl6 pl12:f2
dl3 BLKGRAD

```

NMR-Pulsprogramme

```
go=2 ph31 cpd2:f2
dll do:f2 mc #0 to 2 F1PH(caliph(ph4, -90) & caliph(ph29, +90), caldel(d0, +in0))
exit
```

```
ph0=0
ph1=0
ph2=0
ph3=0 2
ph4=0
ph5=1
ph6=0 0 1 1 2 2 3 3
ph29=0
ph31=0 2 2 0
```

```
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p123: f3 channel - power level for 13C CPMG pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p30: f2 channel - 180 degree pulse at p123 (CPMG block) [60 usec]
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p19: gradient pulse 2 [500 usec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH [3.6 ms]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d21: length of mixing time per CPMG block [1/2 T] [10 - 20 ms]
;cnst2: = J(XH)
;cnst9: RF-field for CPMG block [Hz] [0 - 500]
;cnst20: chemical shift of residual Water peak (in ppm) [4.7 ppm]
;in1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;for z-only gradients:
;gpz1: 10%
;gpz2: 40%

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100

;preprocessor-flags-start
;WATER: for optional Watersuppression start experiment with
;option -DWATER (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end
```

metr-hmqcph-HH.tb

```
;metr-hmqcph.tb
;avance-version (09/04/17)
;Methyl-TROSY HMQC with optional Water suppression
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum
; coherence
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;
;V. Tugarinov, P.W. Hwang, J.E. Ollerenshaw & L.E. Kay,
; J. Magn. Reson. 125, 10420-10428 (2003)
;
; $CLASS=HighRes
; $DIM=2D
; $TYPE=
; $SUBTYPE=
; $COMMENT=
```

```

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"d2=1s/(cnst2*2)"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"

"d0=3u"

"in0=infl/2"

"DELTA1=d2-p19-d16-d13"

1 ze
2 d11 do:f2
3 4u

# ifdef WATER
d11 fq=cnst20 (bf ppm) :f1
d11 p19:f1
d1 cw:f1 ph29
d13 do:f1
d13 p12:f2
# else
d1 p12:f2
# endif

p3:f2 ph0
d13 UNBLKGRAD

# ifdef WATER
p16:gp1
d16 fq=0 :f1
# else
p16:gp1
d16
# endif

d12 p11:f1
p1 ph1
d13
p19:gp2
d16
DELTA1
p3:f2 ph3
d0
p2 ph2
d0
p3:f2 ph4
DELTA1
p19:gp2
d16 p112:f2
d13 BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 mc #0 to 2 F1PH(ip3 & ip29, id0)
exit

ph0=0
ph1=0
ph2=0
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph29=0
ph31=0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p19: gradient pulse 2 [500 usec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]

```

NMR-Pulsprogramme

```
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH [3.6 ms]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;cnst20: chemical shift of residual Water peak (in ppm) [4.7 ppm]
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEQ
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;for z-only gradients:
;gpz1: 30%
;gpz2: 40%

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100

;preprocessor-flags-start
;WATER: for optional Watersupression start experiment with
; option -DWATER (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end

;$Id: hmqcphpr,v 1.5 2009/07/02 16:40:44 ber Exp $
```

hmqcrexgpphpr_HH.2.tb

```
;hmqcrexgpphpr.tb
;avance-version (09/04/17)
;HMQC
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum
; coherence
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;
;D.M. Korzhnev, K. Kloiber, V. Kanelis, V. Tugarinov & L.E. Kay,
; J. Magn. Reson. 126, 3964-3973 (2004)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"d2=1s/(cnst2*2)"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"

"d0=3u"

"in0=inf1/2"

"DELTA1=d2-p19-d16-d13"

1 ze
2 d11 do:f2
3 4u

# ifdef WATER
d11 fq=cnst20 (bf ppm) :f1
d11 p19:f1
```

```

d1 cw:f1 ph29
d13 do:f1
d13 p12:f2
# else
d1 p12:f2
# endif

if "cnst9 == 0"
{
  "DELTA3=1s"
  "COUNTER=0"
}
else
{
  "DELTA3=(1 / (cnst9*4) ) - p30/2000000"
  "COUNTER=d21*cnst9*2+0.5"
}

p3:f2 ph0
d13 UNBLKGRAD

# ifdef WATER
p16:gp1
d16 fq=0 :f1
# else
p16:gp1
d16
# endif

d12 p11:f1
p1 ph1
d13
p19:gp2
d16
DELTA1
p3:f2 ph3
4u p123:f2

if "cnst9 == 0"
{
  4u
}
else
{
  4u
6  DELTA3
  (p30 ph5):f2
  DELTA3
  lo to 6 times COUNTER
}

p2 ph6

if "cnst9 == 0"
{
  4u
}
else
{
  4u
7  DELTA3
  (p30 ph5):f2
  DELTA3
  lo to 7 times COUNTER
}

d0
p2 ph2
d0 p12:f2
p3:f2 ph4
p2 ph1
DELTA1
p19:gp2
d16 p112:f2
d13 BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 mc #0 to 2 F1PH(ip4 & ip29, id0)
exit

ph0=0
ph1=0
ph2=0
ph3=0 2
ph4=0

```

```
ph5=1
ph6=0 0 1 1 2 2 3 3
ph29=0
ph31=0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p123: f3 channel - power level for 13C CPMG pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p30: f2 channel - 180 degree pulse at p123 (CPMG block) [60 usec]
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p19: gradient pulse 2 [500 usec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH [3.6 ms]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d21: length of mixing time per CPMG block [1/2 T] [10 - 20 ms]
;cnst2: = J(XH)
;cnst9: RF-field for CPMG block [Hz] [0 - 500]
;cnst20: chemical shift of residual Water peak (in ppm) [4.7 ppm]
;infl: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;for z-only gradients:
;gpz1: 10%
;gpz2: 40%

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100

;preprocessor-flags-start
;WATER: for optional Watersupression start experiment with
; option -DWATER (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end

;$Id: hmccphpr,v 1.5 2009/07/02 16:40:44 ber Exp $
```

6.4 Substrate und Substratanaloga

6.4.1 SPR-Daten

Verwendung unterschiedlicher Referenzen

UDP-Galactose

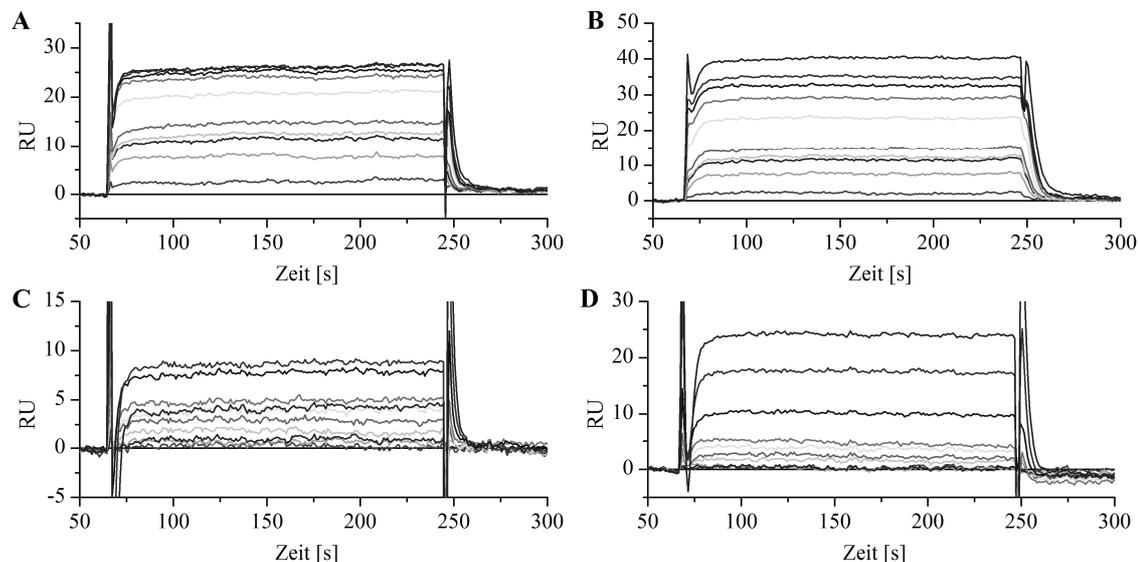


Abbildung 6.1 | Sensorgramme der Bindung von UDP-Gal an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und (A, B) 5 mM MnCl_2 bzw. (C, D) 5 mM MgCl_2 mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A, C) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B, D) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP-Gal Konzentrationen von 5 μM bis 10 mM für die Messungen mit MnCl_2 und mit von 50 μM bis 10 mM für die Messungen mit MgCl_2 durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung.

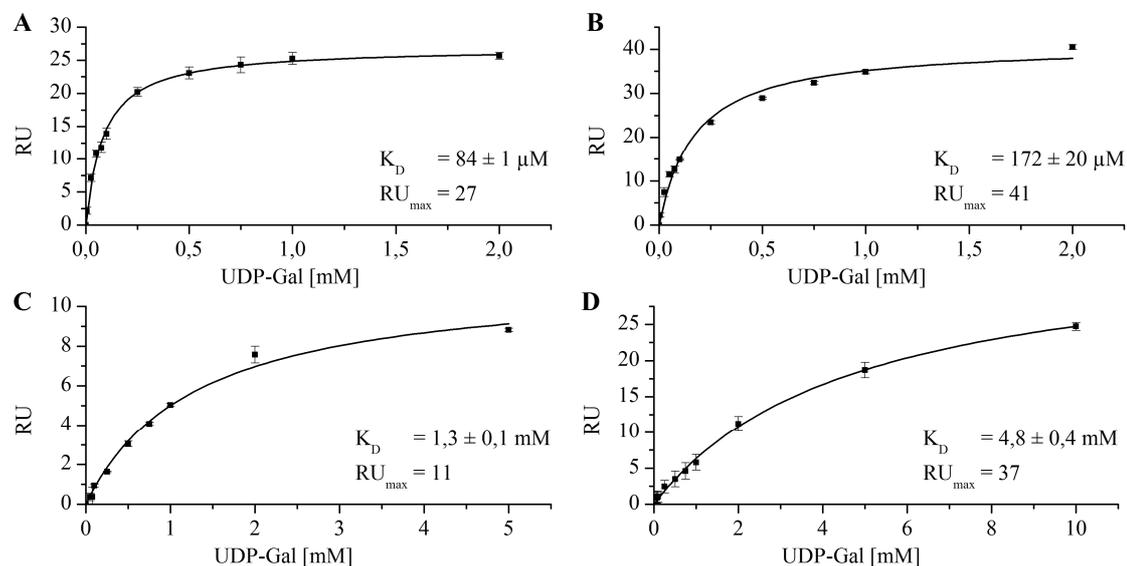


Abbildung 6.2 | Bindungsisotherme der Bindung von UDP-Gal an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und (A, B) 5 mM MnCl_2 bzw. (C, D) 5 mM MgCl_2 mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A, C) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B, D) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP-Gal Konzentrationen von 5 μM bis 10 mM für die Messungen mit MnCl_2 und von 50 μM bis 10 mM für die Messungen mit MgCl_2 durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. Eingefügt in den Graphen wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximalen Antworten RU_{max} .

UDP-Glucose

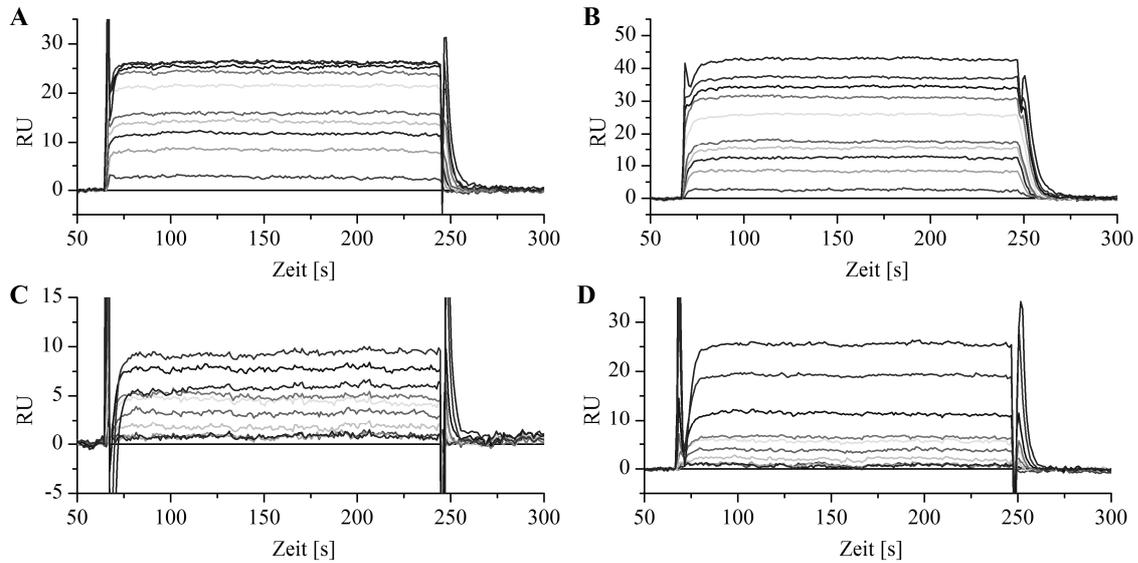


Abbildung 6.3 | Sensorgramme der Bindung von UDP-Glc an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und (A, B) 5 mM MnCl₂ bzw. (C, D) 5 mM MgCl₂ mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A, C) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B, D) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP-Glc Konzentrationen von 5 µM bis 10 mM für die Messungen mit MnCl₂ und von 50 µM bis 10 mM für die Messungen mit MgCl₂ durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung.

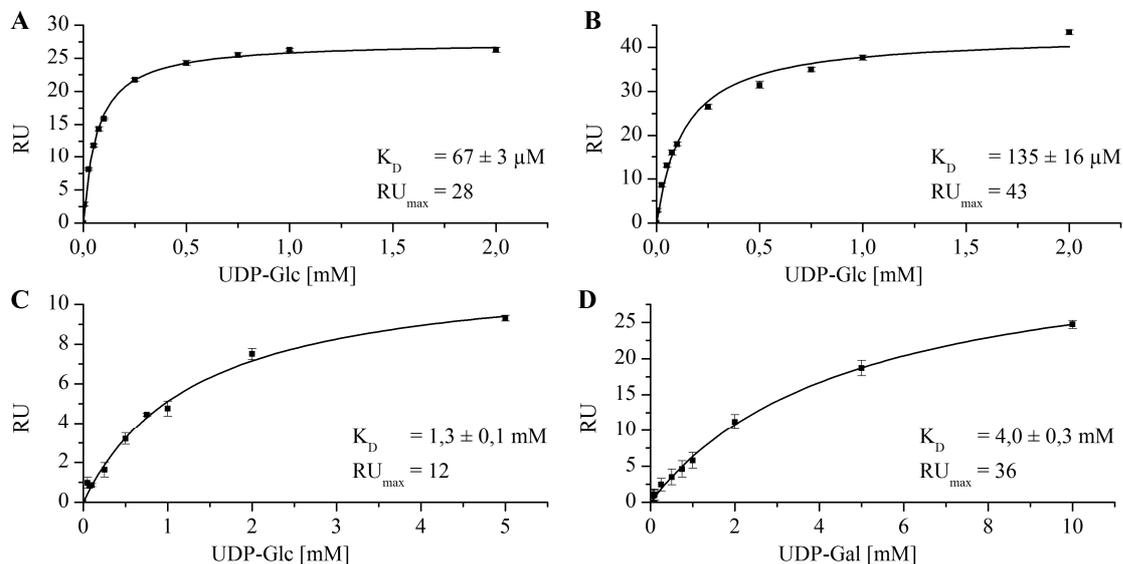


Abbildung 6.4 | Bindungsisotherme der Bindung von UDP-Glc an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und (A, B) 5 mM MnCl₂ bzw. (C, D) 5 mM MgCl₂ mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A, C) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B, D) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP-Glc Konzentrationen von 5 µM bis 10 mM für die Messungen mit MnCl₂ und von 50 µM bis 10 mM für die Messungen mit MgCl₂ durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. Eingefügt in den Graphen wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximalen Antworten RU_{max} .

UDP

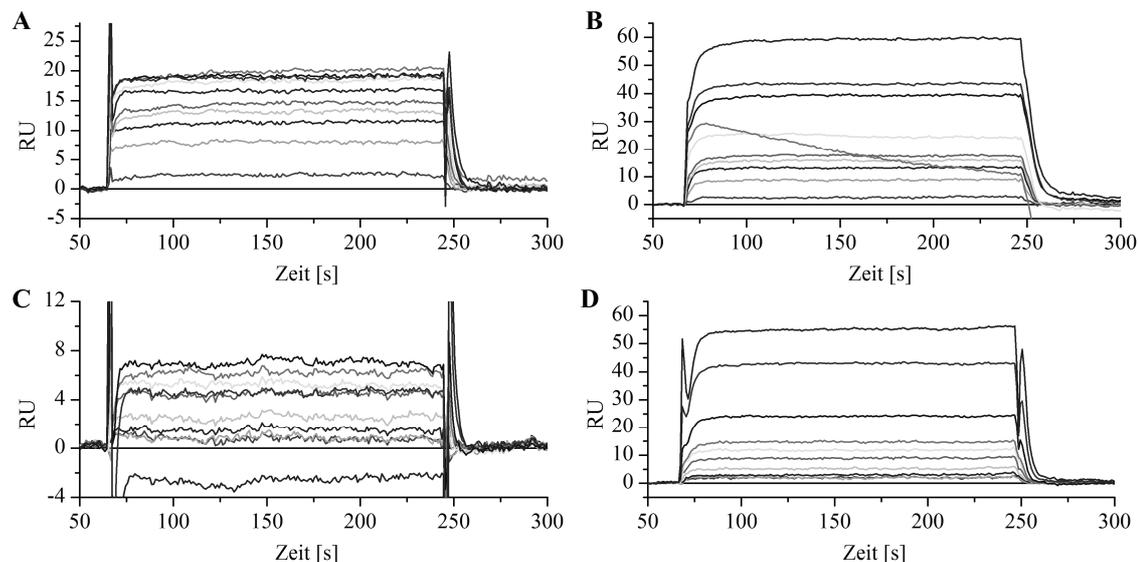


Abbildung 6.5 | Sensorgramme der Bindung von UDP an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und (A, B) 5 mM MnCl₂ bzw. (C, D) 5 mM MgCl₂ mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A, C) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B, D) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP Konzentrationen von 5 µM bis 10 mM für die Messungen mit MnCl₂ und von 50 µM bis 10 mM für die Messungen mit MgCl₂ durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung.

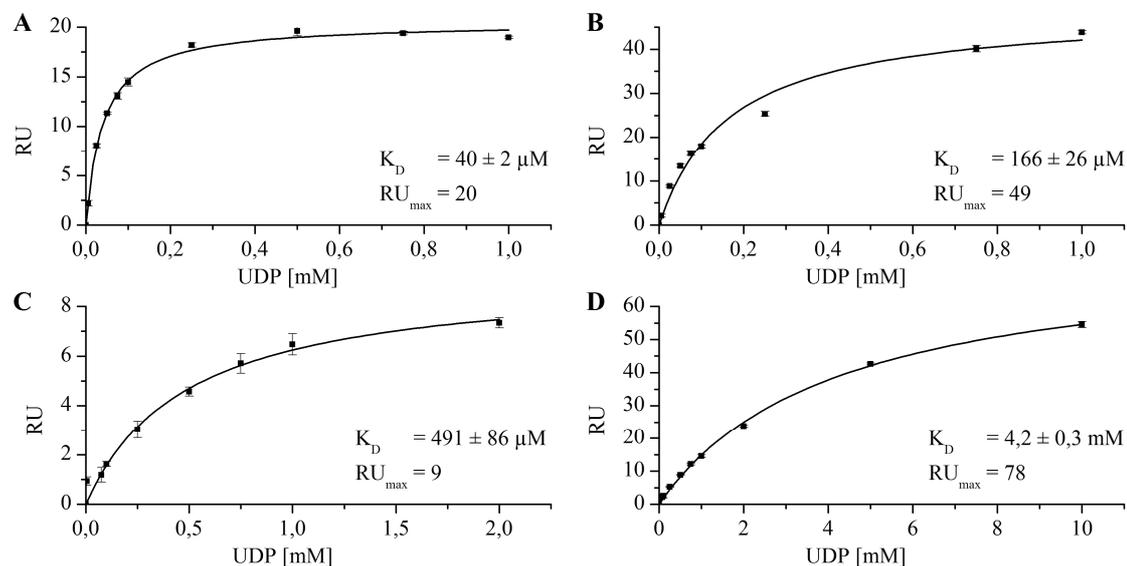


Abbildung 6.6 | Bindungsisotherme der Bindung von UDP an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und (A, B) 5 mM MnCl₂ bzw. (C, D) 5 mM MgCl₂ mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A, C) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B, D) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP Konzentrationen von 5 µM bis 10 mM für die Messungen mit MnCl₂ und von 50 µM bis 10 mM für die Messungen mit MgCl₂ durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. Eingefügt in den Graphen wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximalen Antworten RU_{max} .

UMP

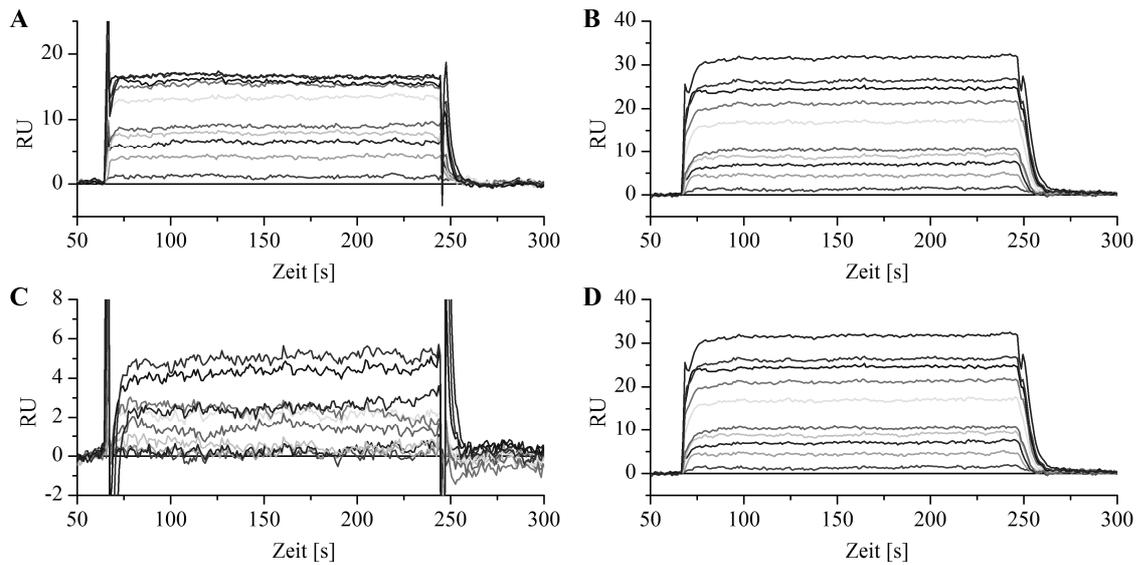


Abbildung 6.7 | Sensorgramme der Bindung von UMP an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und (A, B) 5 mM MnCl₂ bzw. (C, D) 5 mM MgCl₂ mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A, C) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B, D) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UMP Konzentrationen von 5 µM bis 10 mM für die Messungen mit MnCl₂ und von 50 µM bis 10 mM für die Messungen mit MgCl₂ durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung.

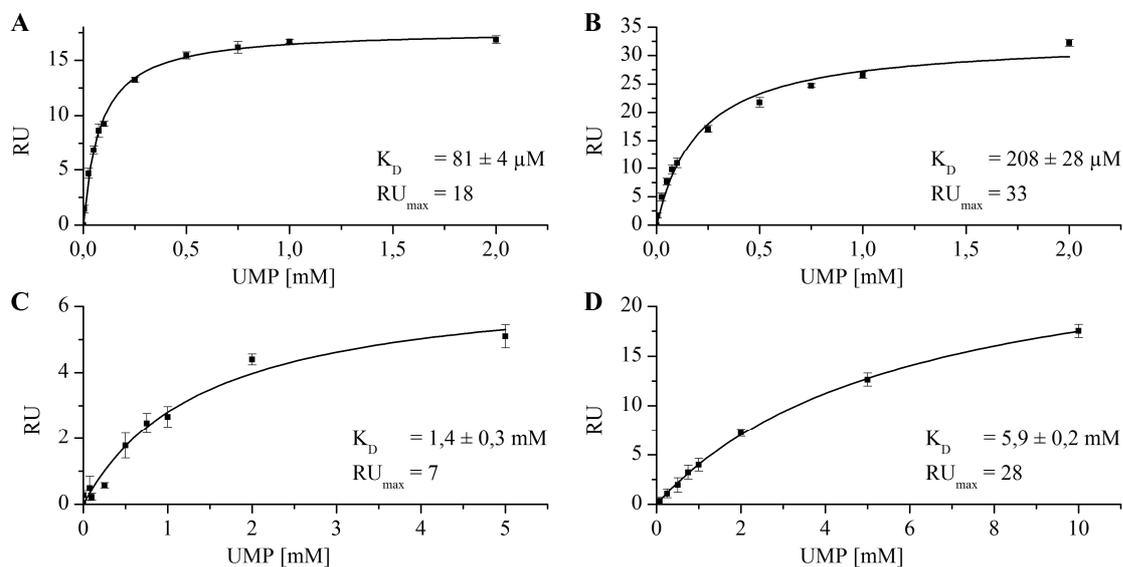


Abbildung 6.8 | Bindungsisotherme der Bindung von UMP an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und (A, B) 5 mM MnCl₂ bzw. (C, D) 5 mM MgCl₂ mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A, C) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B, D) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UMP Konzentrationen von 5 µM bis 10 mM für die Messungen mit MnCl₂ und von 50 µM bis 10 mM für die Messungen mit MgCl₂ durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. Eingefügt in den Graphen wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximalen Antworten R_{Umax}.

Uridin

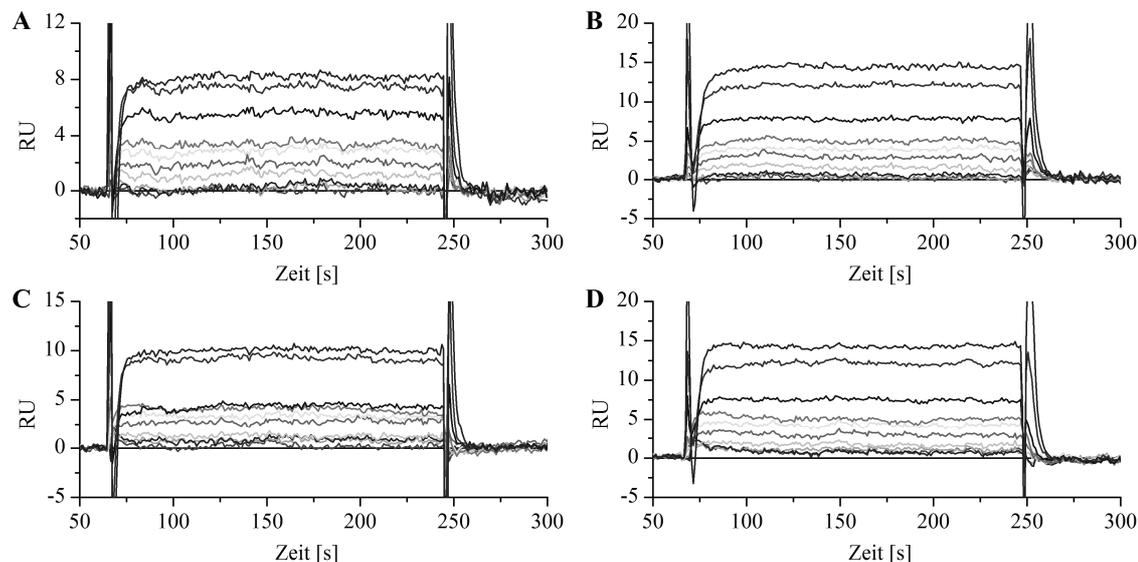


Abbildung 6.9 | Sensorgramme der Bindung von Uridin an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und (A, B) 5 mM MnCl₂ bzw. (C, D) 5 mM MgCl₂ mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A, C) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B, D) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit Uridin Konzentrationen von 5 µM bis 10 mM für die Messungen mit MnCl₂ und von 50 µM bis 10 mM für die Messungen mit MgCl₂ durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung.

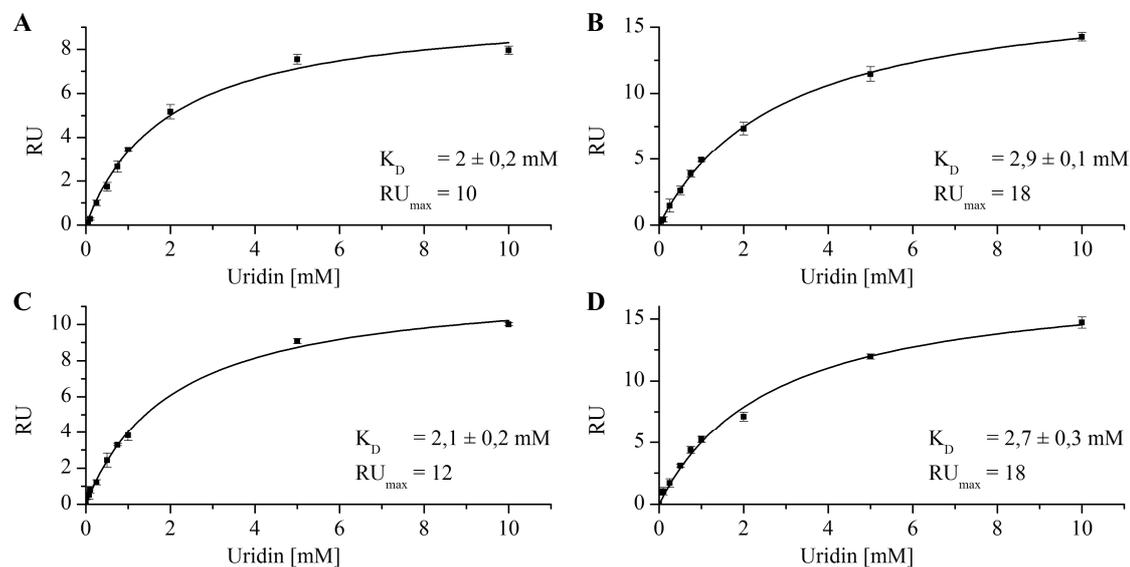


Abbildung 6.10 | Bindungsisotherme der Bindung von Uridin an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und (A, B) 5 mM MnCl₂ bzw. (C, D) 5 mM MgCl₂ mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A, C) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B, D) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit Uridin Konzentrationen von 5 µM bis 10 mM für die Messungen mit MnCl₂ und von 50 µM bis 10 mM für die Messungen mit MgCl₂ durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. Eingefügt in den Graphen wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximalen Antworten RU_{max} .

3DD

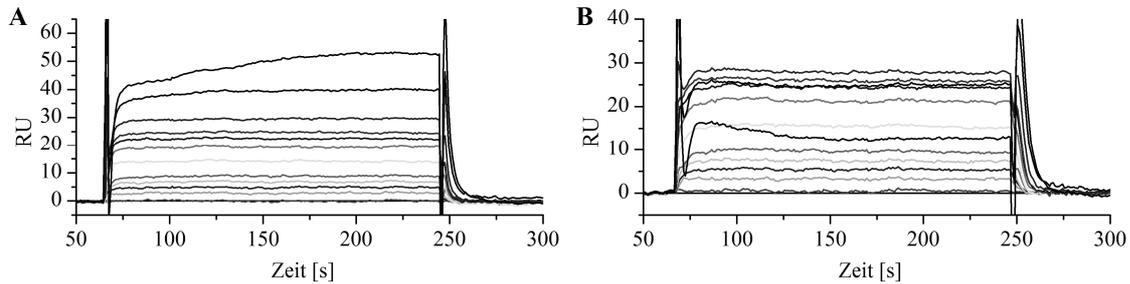


Abbildung 6.11 | Sensorgramme der Bindung von 3DD an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM MnCl₂ mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit 3DD Konzentrationen von 5 µM bis 10 mM durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung.

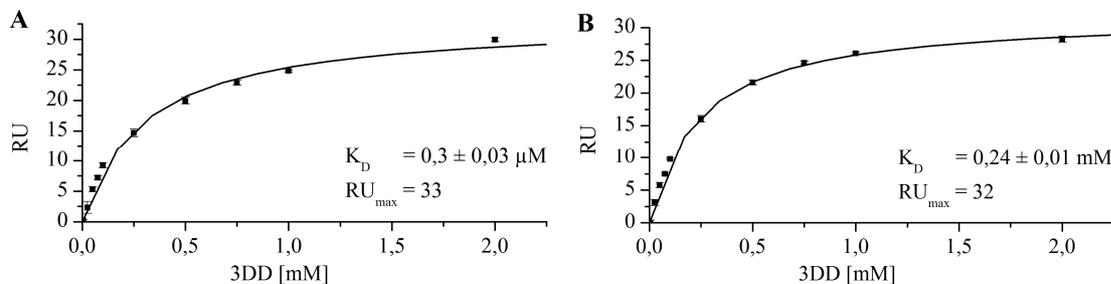


Abbildung 6.12 | Bindungsisotherme der Bindung von UMP an immobilisierte GTB bei Verwendung unterschiedlicher Referenzen. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM MnCl₂ mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Als Referenz wurde eine leere Flusszelle (A) bzw. eine mit NA belegte Flusszelle (B) verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit 3DD Konzentrationen von 5 µM bis 10 mM für die Messungen mit MnCl₂ durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. Eingefügt in den Graphen wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximalen Antworten RU_{max} .

Vergleich der Glycosyltransferasen GTA, GTB und AAGlyB

UDP-Galactose

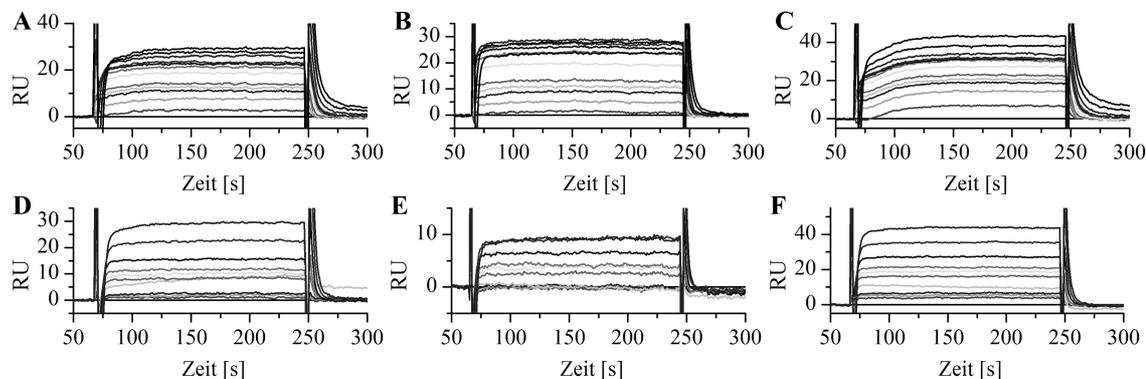


Abbildung 6.13 | Sensorgramme der Bindung von UDP-Gal an immobilisierte GTA, GTB und AAGlyB mit Mn^{2+} und Mg^{2+} als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ (A-C) bzw. 5 mM $MgCl_2$ (D-F) mit GTA (A, D), GTB (B, E) und AAGlyB (C, F) immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP-Gal Konzentrationen von 5 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und von 50 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung.

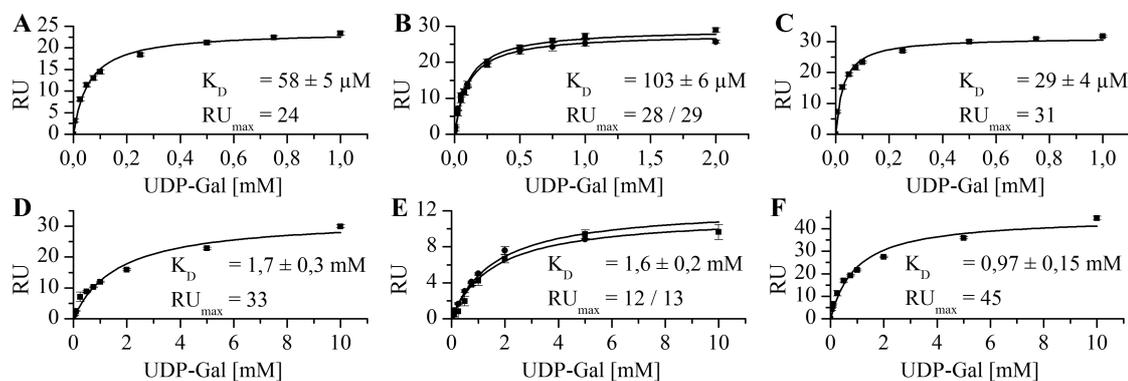


Abbildung 6.14 | Bindungsisotherme der Bindung von UDP-Gal an immobilisierte GTB mit (A) Mn^{2+} und (B) Mg^{2+} als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ (A-C) bzw. 5 mM $MgCl_2$ (D-F) mit GTA (A, D), GTB (B, E) und AAGlyB (C, F) immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1 und 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP-Gal Konzentrationen von 5 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und von 50 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. Die Messungen von Chip 1 und Chip 2 wurden zusammen mit einem K_D -Wert und zwei RU_{max} gefittet (Gl.2.2). Eingefügt in den Graphen wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximalen Antworten RU_{max} .

UDP-Glucose

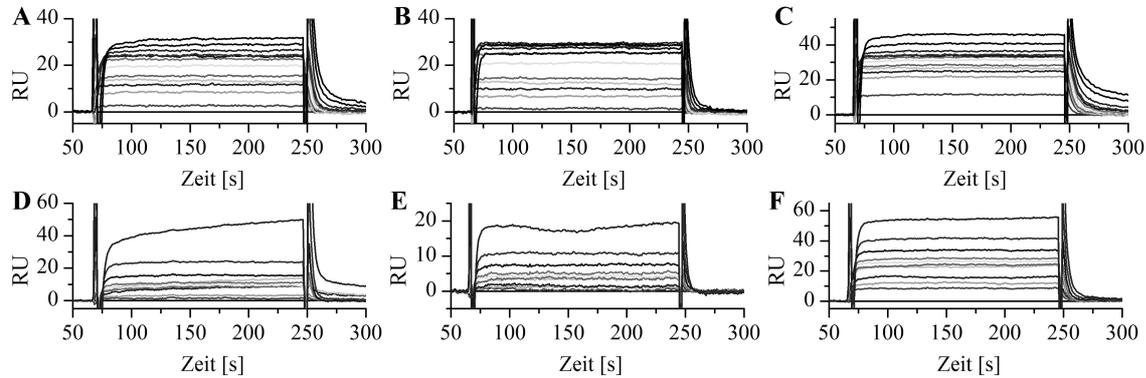


Abbildung 6.15 | Sensorgramme der Bindung von UDP-Glc an immobilisierte GTA, GTB und AAGlyB mit Mn^{2+} und Mg^{2+} als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ (A-C) bzw. 5 mM $MgCl_2$ (D-F) mit GTA (A, D), GTB (B, E) und AAGlyB (C, F) immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP-Glc Konzentrationen von 5 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und von 50 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung.

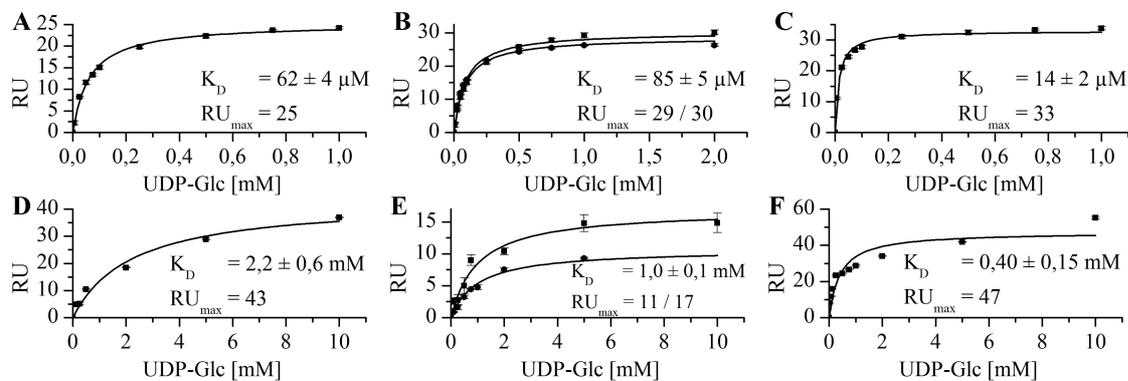


Abbildung 6.16 | Bindungsisotherme der Bindung von UDP-Glc an immobilisierte GTB mit (A) Mn^{2+} und (B) Mg^{2+} als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ (A-C) bzw. 5 mM $MgCl_2$ (D-F) mit GTA (A, D), GTB (B, E) und AAGlyB (C, F) immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1 und 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP-Glc Konzentrationen von 5 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und von 50 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. Die Messungen von Chip 1 und Chip 2 wurden zusammen mit einem K_D -Wert und zwei RU_{max} gefittet (Gl.2.2). Eingefügt in den Graphen wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximalen Antworten RU_{max} .

UDP

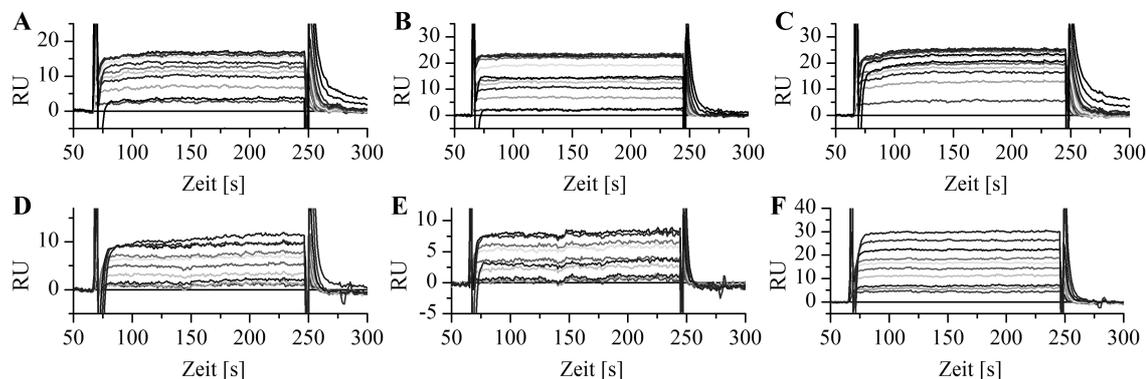


Abbildung 6.17 | Sensorgramme der Bindung von UDP an immobilisierte GTA, GTB und AAGlyB mit Mn^{2+} und Mg^{2+} als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ (A-C) bzw. 5 mM $MgCl_2$ (D-F) mit GTA (A, D), GTB (B, E) und AAGlyB (C, F) immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP Konzentrationen von 5 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und von 50 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung.

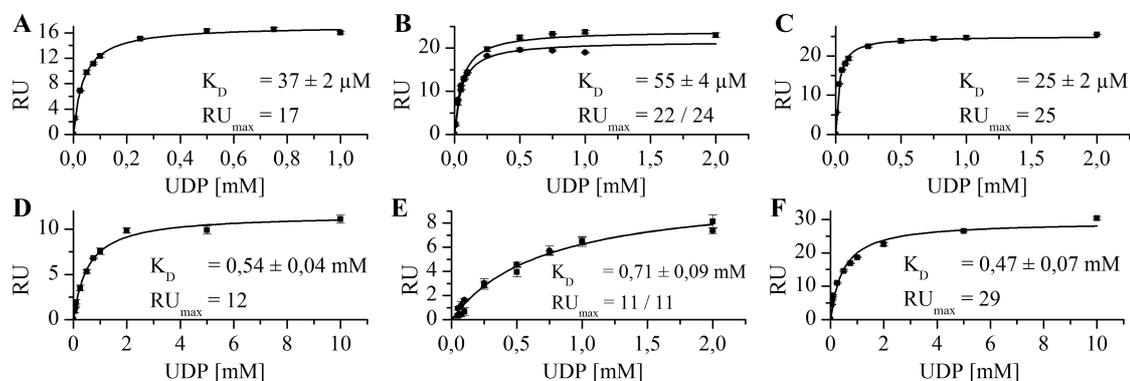


Abbildung 6.18 | Bindungsisotherme der Bindung von UDP an immobilisierte GTB mit (A) Mn^{2+} und (B) Mg^{2+} als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ (A-C) bzw. 5 mM $MgCl_2$ (D-F) mit GTA (A, D), GTB (B, E) und AAGlyB (C, F) immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1 und 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UDP Konzentrationen von 5 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und von 50 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. Die Messungen von Chip 1 und Chip 2 wurden zusammen mit einem K_D -Wert und zwei RU_{max} gefittet (Gl.2.2). Eingefügt in den Graphen wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximalen Antworten RU_{max} .

UMP

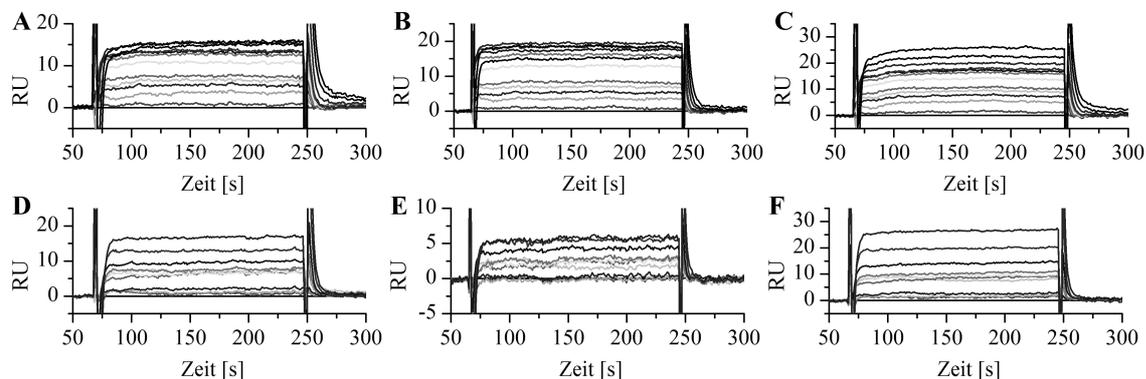


Abbildung 6.19 | Sensorgramme der Bindung von UMP an immobilisierte GTA, GTB und AAGlyB mit Mn^{2+} und Mg^{2+} als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ (A-C) bzw. 5 mM $MgCl_2$ (D-F) mit GTA (A, D), GTB (B, E) und AAGlyB (C, F) immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UMP Konzentrationen von 5 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und von 50 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung.

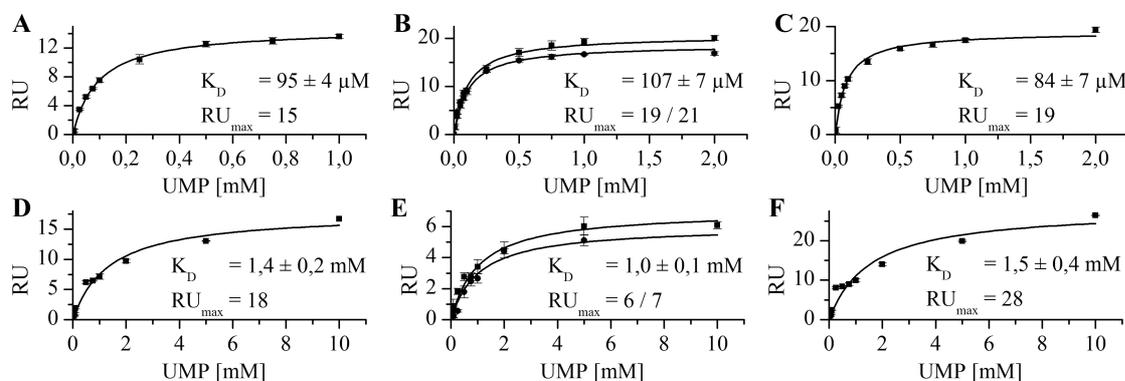


Abbildung 6.20 | Bindungsisotherme der Bindung von UMP an immobilisierte GTB mit (A) Mn^{2+} und (B) Mg^{2+} als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ (A-C) bzw. 5 mM $MgCl_2$ (D-F) mit GTA (A, D), GTB (B, E) und AAGlyB (C, F) immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1 und 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit UMP Konzentrationen von 5 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und von 50 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. Die Messungen von Chip 1 und Chip 2 wurden zusammen mit einem K_D -Wert und zwei RU_{max} gefittet (Gl.2.2). Eingefügt in den Graphen wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximalen Antworten RU_{max} .

Uridin

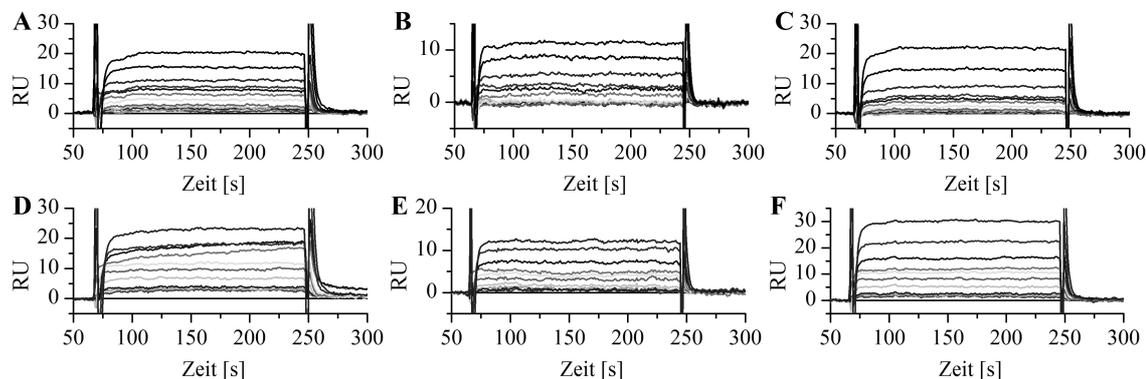


Abbildung 6.21 | Sensorgramme der Bindung von Uridin an immobilisierte GTA, GTB und AAGlyB mit Mn^{2+} und Mg^{2+} als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ (A-C) bzw. 5 mM $MgCl_2$ (D-F) mit GTA (A, D), GTB (B, E) und AAGlyB (C, F) immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit Uridin Konzentrationen von 5 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und von 50 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung.

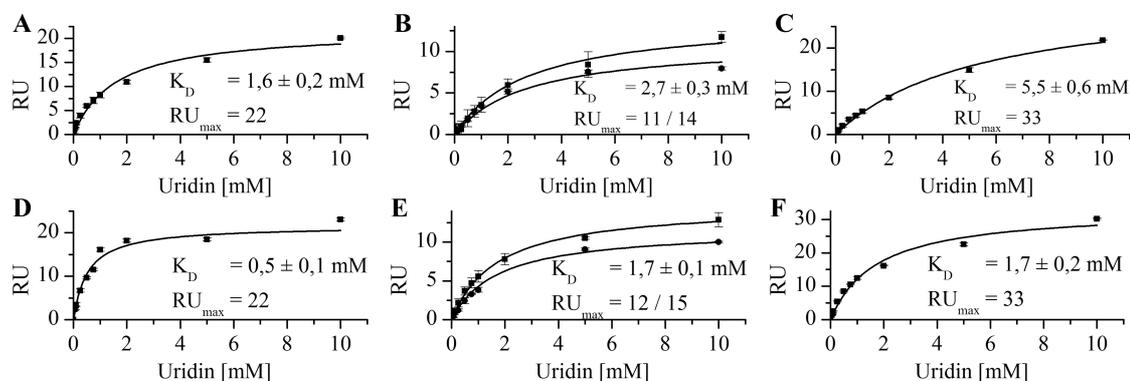


Abbildung 6.22 | Bindungsisotherme der Bindung von Uridin an immobilisierte GTB mit (A) Mn^{2+} und (B) Mg^{2+} als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ (A-C) bzw. 5 mM $MgCl_2$ (D-F) mit GTA (A, D), GTB (B, E) und AAGlyB (C, F) immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1 und 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit Uridin Konzentrationen von 5 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und von 50 μ M bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. Die Messungen von Chip 1 und Chip 2 wurden zusammen mit einem K_D -Wert und zwei RU_{max} gefittet (Gl.2.2). Eingefügt in den Graphen wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximalen Antworten RU_{max} .

3DD

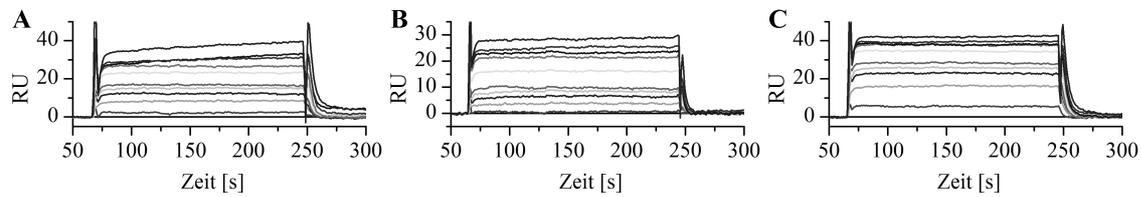


Abbildung 6.23 | Sensorgramme der Bindung von UDP-Glc an immobilisierte GTA, GTB und AAGlyB mit Mn^{2+} als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ mit GTA (A), GTB (B) und AAGlyB (C) immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit Konzentrationen von 5 μM bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und mit UDP-Glc Konzentrationen von 50 μM bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Gezeigt ist jeweils die erste Messung.

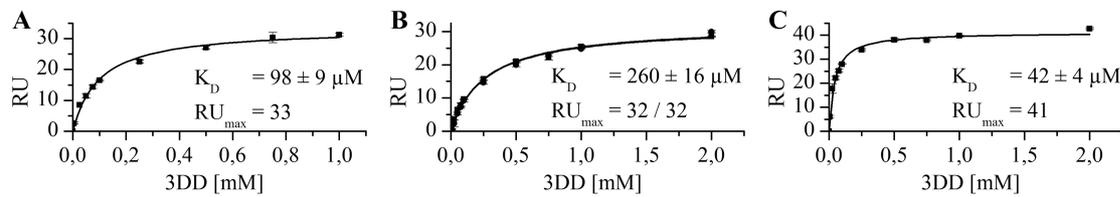


Abbildung 6.24 | Bindungsisotherme der Bindung von UDP-Glc an immobilisierte GTB mit Mn^{2+} als bivalentes Kation. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM $MnCl_2$ mit GTA (A), GTB (B) und AAGlyB (C) immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 1 und 2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung mit Konzentrationen von 5 μM bis 10 mM für die Messungen mit $MnCl_2$ und mit UDP-Glc Konzentrationen von 50 μM bis 10 mM für die Messungen mit $MgCl_2$ durchgeführt. Stark abweichende Messwerte wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt und sind in den Abbildungen nicht zu sehen. Die Messungen von Chip 1 und Chip 2 wurden zusammen mit einem K_D -Wert und zwei RU_{max} gefittet (Gl.2.2). Eingefügt in den Graphen wurden die jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximalen Antworten RU_{max} .

6.4.2 ITC-Daten

UPD

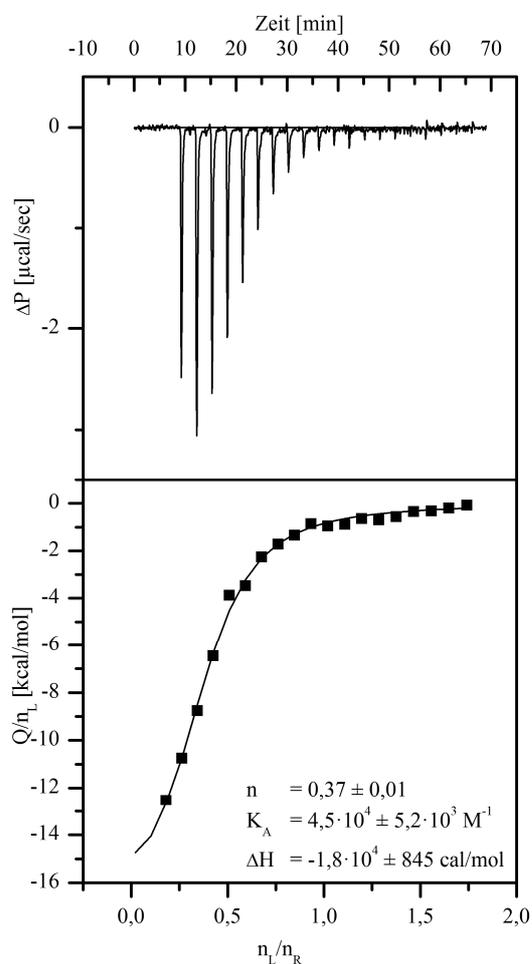


Abbildung 6.25 | ITC-Thermogram von GTB titriert mit UDP bei 25°C. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl, 5 mM MnCl₂ und 1 mM 2-Mercaptoethanol durchgeführt. Oben sind jeweils die Rohdaten gezeigt. Der Graph unten zeigt die gemessene Wärmemenge (Q) dividiert durch die injizierte Stoffmenge des Liganden n_L , aufgetragen gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Rezeptor. Eingelegt in den jeweiligen Graphen sind die Anzahl an Bindungsstellen (n), die Assoziationskonstante (K_A in M^{-1}) sowie die Enthalpie (ΔH in cal/mol) und den jeweiligen Standardabweichungen. Die Proteinkonzentration betrug 336 μM GTB und es wurden 21 Injektionen mit je 1,8 μl einer 3 mM UDP-Lösung durchgeführt.

UDP (H-Dis)

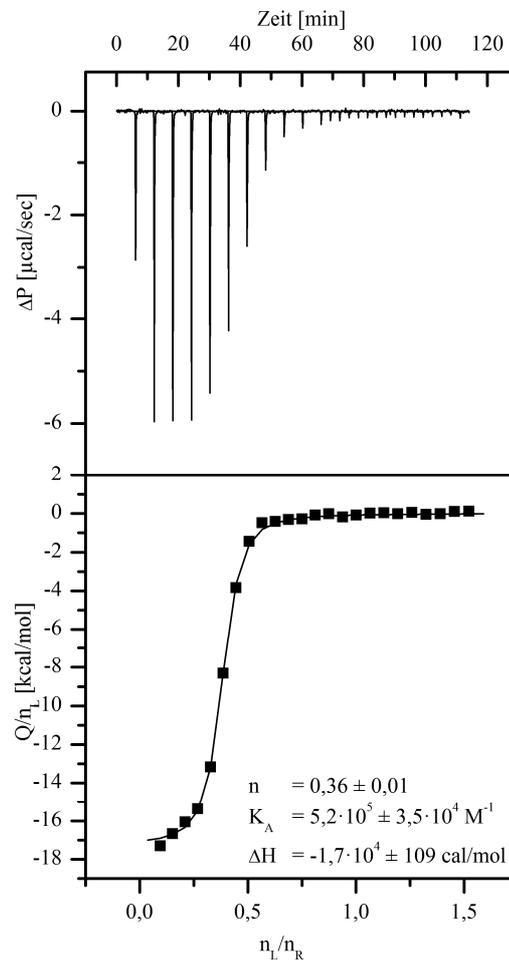


Abbildung 6.26 | ITC-Thermogram von GTB in Anwesenheit von H-Dis titriert mit UDP bei 25°C. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl, 5 mM MnCl₂ und 1 mM 2-Mercaptoethanol durchgeführt. Oben sind jeweils die Rohdaten gezeigt. Der Graph unten zeigt die gemessene Wärmemenge (Q) dividiert durch die injizierte Stoffmenge des Liganden n_L , aufgetragen gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Rezeptor. Eingefügt in den jeweiligen Graphen sind die Anzahl an Bindungsstellen (n), die Assoziationskonstante (K_A in M^{-1}) sowie die Enthalpie (ΔH in cal/mol) und der den jeweiligen Standardabweichungen. Die Probenzelle enthielt 390 μM GTB und 4 mM H-Dis. Es wurden 26 Injektionen mit je 1,5 μl einer 3 mM UDP-Lösung durchgeführt.

UDP-Gal (3DD)

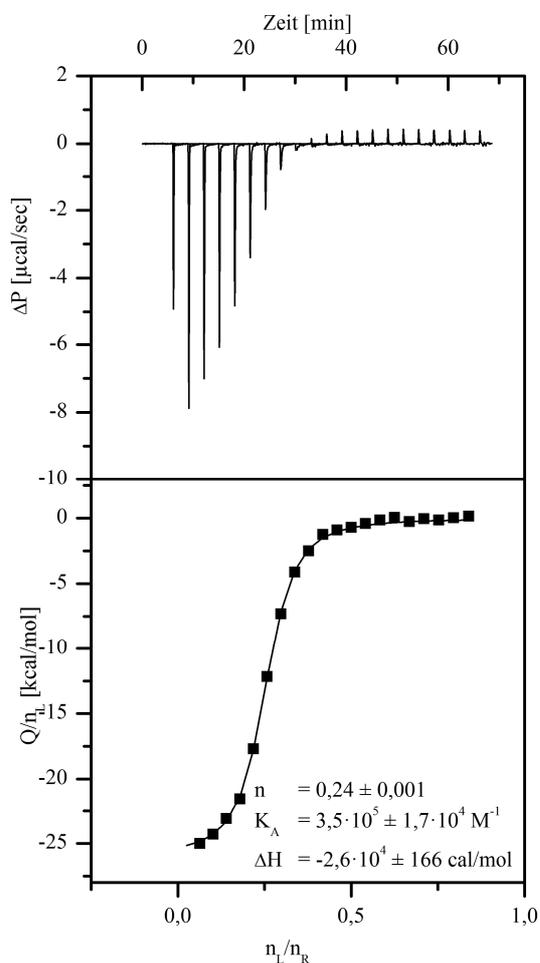


Abbildung 6.27 | ITC-Thermogram von GTB in Anwesenheit von 3DD titriert mit UDP-Gal bei 25°C. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl, 5 mM MnCl_2 und 1 mM 2-Mercaptoethanol durchgeführt. Oben sind jeweils die Rohdaten gezeigt. Der Graph unten zeigt die gemessene Wärmemenge (Q) dividiert durch die injizierte Stoffmenge des Liganden n_L , aufgetragen gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Rezeptor. Eingefügt in den jeweiligen Graphen sind die Anzahl an Bindungsstellen (n), die Assoziationskonstante (K_A in M^{-1}) sowie die Enthalpie (ΔH in cal/mol) und den jeweiligen Standardabweichungen. Die Probenzelle enthielt 390 μM GTB und 4 mM 3DD. Es wurden 26 Injektionen mit je 1,5 μl einer 2 mM UDP-Gal-Lösung durchgeführt.

UDP-Glc

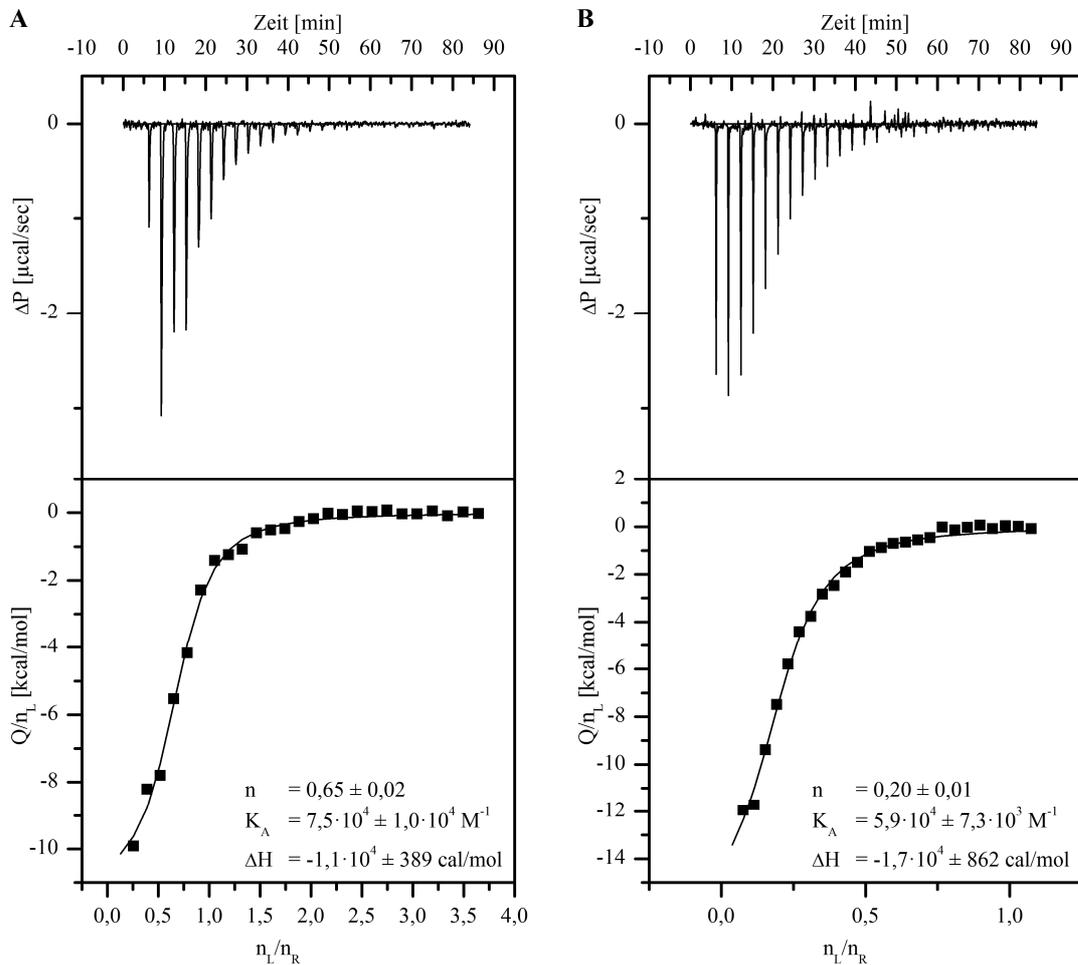


Abbildung 6.28 | ITC-Thermogram von GTB titriert mit UDP-Glc bei 25°C. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl, 5 mM MnCl₂ und 1 mM 2-Mercaptoethanol durchgeführt. Oben sind jeweils die Rohdaten gezeigt. Der Graph unten zeigt die gemessene Wärmemenge (Q) dividiert durch die injizierte Stoffmenge des Liganden n_L, aufgetragen gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Rezeptor. Eingefügt in den jeweiligen Graphen sind die Anzahl an Bindungsstellen (n), die Assoziationskonstante (K_A in M⁻¹) sowie die Enthalpie (ΔH in cal/mol) und den jeweiligen Standardabweichungen. In (A) betrug die Proteinkonzentration 230 μM GTB und es wurden 26 Injektionen mit je 1,5 μl einer 4 mM UDP-Glc-Lösung durchgeführt. In (B) betrug die Proteinkonzentration 390 μM GTB und es wurden 26 Injektionen mit je 1,5 μl einer 2 mM UDP-Glc-Lösung durchgeführt.

UDP-Glc (H-Dis)

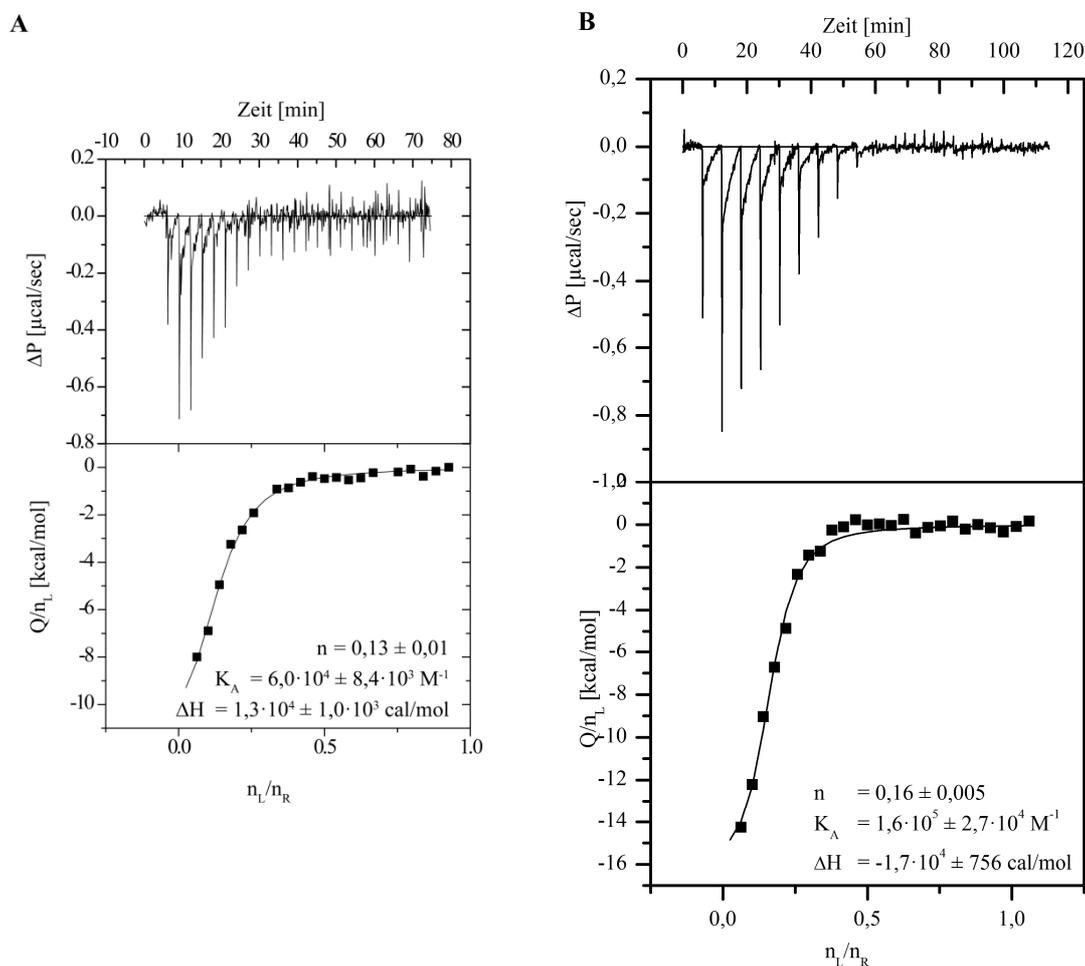


Abbildung 6.29 | Thermogram von GTB in Anwesenheit von H-Dis titriert mit UDP-Glc bei 25°C. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl, 5 mM MnCl₂ und 1 mM 2-Mercaptoethanol durchgeführt. Oben sind jeweils die Rohdaten gezeigt. Der Graph unten zeigt die gemessene Wärmemenge (Q) dividiert durch die injizierte Stoffmenge des Liganden n_L , aufgetragen gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Rezeptor. Eingefügt in den jeweiligen Graphen sind die Anzahl an Bindungsstellen (n), die Assoziationskonstante (K_A in M^{-1}) sowie die Enthalpie (ΔH in cal/mol) und den jeweiligen Standardabweichungen. Die Probenzelle enthielt in (A) und (B) 390 μM GTB und 4 mM H-Dis. Es wurden 26 Injektionen mit je 1,5 μl einer 2 mM UDP-Gal-Lösung durchgeführt.

UDP-Glc (3DD)

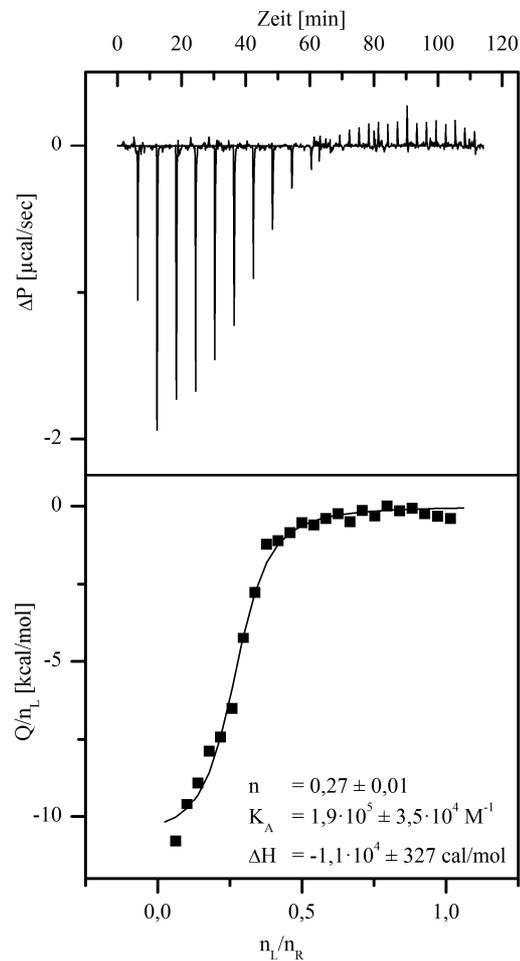


Abbildung 6.30 | Thermogram von GTB in Anwesenheit von 3DD titriert mit UDP-Glc bei 25°C. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl, 5 mM MnCl₂ und 1 mM 2-Mercaptoethanol durchgeführt. Oben sind jeweils die Rohdaten gezeigt. Der Graph unten zeigt die gemessene Wärmemenge (Q) dividiert durch die injizierte Stoffmenge des Liganden n_L, aufgetragen gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Rezeptor. Eingefügt in den jeweiligen Graphen sind die Anzahl an Bindungsstellen (n), die Assoziationskonstante (K_A in M⁻¹) sowie die Enthalpie (ΔH in cal/mol) und den jeweiligen Standardabweichungen. Die Probenzelle enthielt 390 μM GTB und 4 mM 3DD. Es wurden 26 Injektionen mit je 1,5 μl einer 2 mM UDP-Glc-Lösung durchgeführt.

3AD

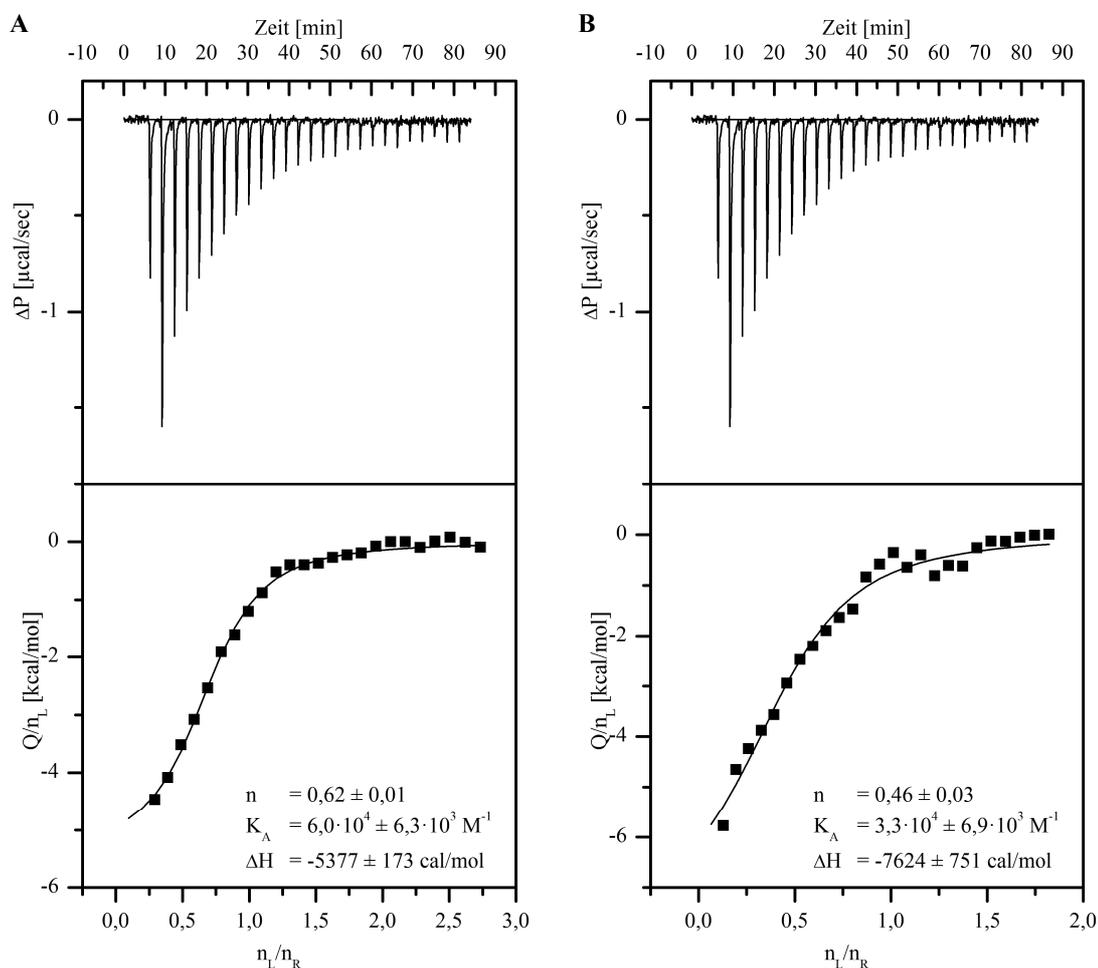


Abbildung 6.31 | ITC-Thermogram von GTB titriert mit 3AD bei 25°C. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl, 5 mM MnCl₂ und 1 mM 2-Mercaptoethanol durchgeführt. Oben sind jeweils die Rohdaten gezeigt. Der Graph unten zeigt die gemessene Wärmemenge (Q) dividiert durch die injizierte Stoffmenge des Liganden n_L , aufgetragen gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Rezeptor. Eingelegt in den jeweiligen Graphen sind die Anzahl an Bindungsstellen (n), die Assoziationskonstante (K_A in M^{-1}) sowie die Enthalpie (ΔH in cal/mol) und den jeweiligen Standardabweichungen. In (A) betrug die Proteinkonzentration 230 μM GTB und es wurden 26 Injektionen mit je 1,5 μl einer 3 mM 3AD-Lösung durchgeführt. In (B) betrug die Proteinkonzentration 230 μM GTB und es wurden 26 Injektionen mit je 1,5 μl einer 2 mM 3AD-Lösung durchgeführt.

6.5 Glycosyltransferase Inhibitor

6.5.1 SPR-Daten

Tabelle 6.2 | Dissoziationskonstanten von Fragment 382 gegenüber GTA, GTB und AAGlyB. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C), 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂ bzw. 5 mM MnCl₂ in Ab- und Anwesenheit von 1 mM UDP mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip (Chip 3 und 4) durchgeführt (siehe Tabelle 2.10). Alle Messungen wurden auf zwei unterschiedlichen Sensorchips in dreifacher Bestimmung mit Konzentrationen von 25 µM bis 7 mM durchgeführt. Die erhaltenen Bindungsisothermen wurden mit einem Bindungsmodell für zwei Bindungsstellen gefittet.

Enzyme	Puffer	K _{D,1} [mM]	RU _{max,1} [RU]	K _{D,2} [M]	RU _{max,2} [RU]	R ²	Chi ²
GTA	-	0.56 ± 0.14	37 / 24	0.4	2·10 ³ / 7·10 ³	≥ 0.99	2.95
	Mg ²⁺	0.74 ± 0.06	36 / 30	54·10 ⁹	8·10 ¹⁴ / 3·10 ¹⁴	≥ 0.99	0.46
	Mg ²⁺ / UDP	0.86 ± 0.13	37 / 23	-0.6	-4·10 ³ / -9·10 ³	≥ 0.99	0.58
	Mn ²⁺	1.07 ± 0.14	33 / 37	-201·10 ⁹	-2·10 ¹⁵ / -9·10 ¹⁴	≥ 0.99	0.79
	Mn ²⁺ / UDP	2.60 ± 0.32	29 / 29	41·10 ⁹	5·10 ¹⁴ / 3·10 ¹⁴	≥ 0.99	0.09
GTB	-	0.22 ± 0.03	22 / 17	928·10 ⁹	9·10 ¹⁵ / 2·10 ¹⁶	≥ 0.99	1.04
	Mg ²⁺	0.22 ± 0.01	19 / 17	0.1	1·10 ³ / 2·10 ³	≥ 0.99	0.14
	Mg ²⁺ / UDP	0.27 ± 0.02	15 / 16	0.2	3·10 ³ / 2·10 ³	≥ 0.99	0.16
	Mn ²⁺	0.41 ± 0.04	18 / 18	1.6	12·10 ³ / 21·10 ³	≥ 0.99	0.14
	Mn ²⁺ / UDP	1.88 ± 0.40	23 / 17	-0.09	-698 / -1·10 ³	≥ 0.99	0.04
AAGlyB	-	0.56 ± 0.11	35 / 25	0.2	848 / 2·10 ³	≥ 0.99	1.28
	Mg ²⁺	0.64 ± 0.07	31 / 26	0.2	935 / 2·10 ³	≥ 0.99	0.24
	Mg ²⁺ / UDP	0.97 ± 0.21	21 / 11	0.1	697 / 1·10 ³	≥ 0.99	0.21
	Mn ²⁺	0.83 ± 0.09	28 / 26	261·10 ⁹	1·10 ¹⁵ / 2·10 ¹⁵	≥ 0.99	0.43
	Mn ²⁺ / UDP	16.8 ± 19.29	105 / 95	-0.06	-292 / -146	≥ 0.99	0.03

GTA

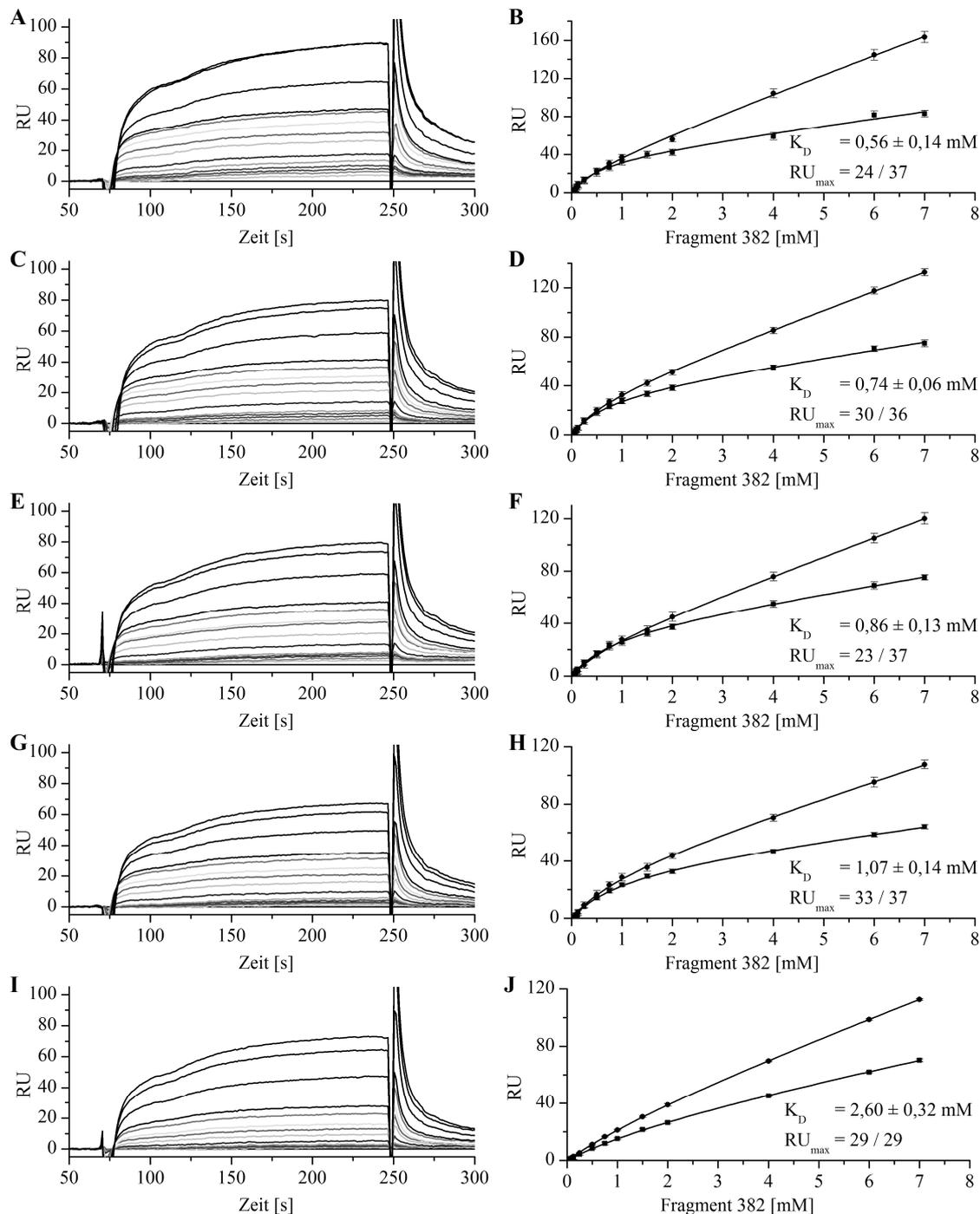


Abbildung 6.32 | Sensorgramme und Bindungsisothere der Bindung von Fragment 382 an immobilisierte GTA. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C) und 100 mM NaCl sowie (A, B) ohne Metallion, mit (C, D) 5 mM MgCl₂, mit (E, F) 5 mM MgCl₂ und 1mM UDP, mit (G, H) 5 mM MnCl₂ sowie mit (I, J) 5 mM MnCl₂ und 1mM UDP mit GTA immobilisiert auf einem CM5 Chip durchgeführt. Als Referenz wurde eine leere Flusszelle verwendet. Alle Messungen wurden auf zwei unterschiedlichen Sensorchips (Chip 3/4) in dreifacher Bestimmung mit Konzentrationen von Fragment 382 von 25 µM bis 7 mM durchgeführt. Gezeigt ist jeweils das Sensorgramm der ersten Messung. Angegeben sind die Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximale Antwort RU_{\max} der spezifischen Bindungsstelle eines Modells mit zwei Bindungsstellen.

GTB

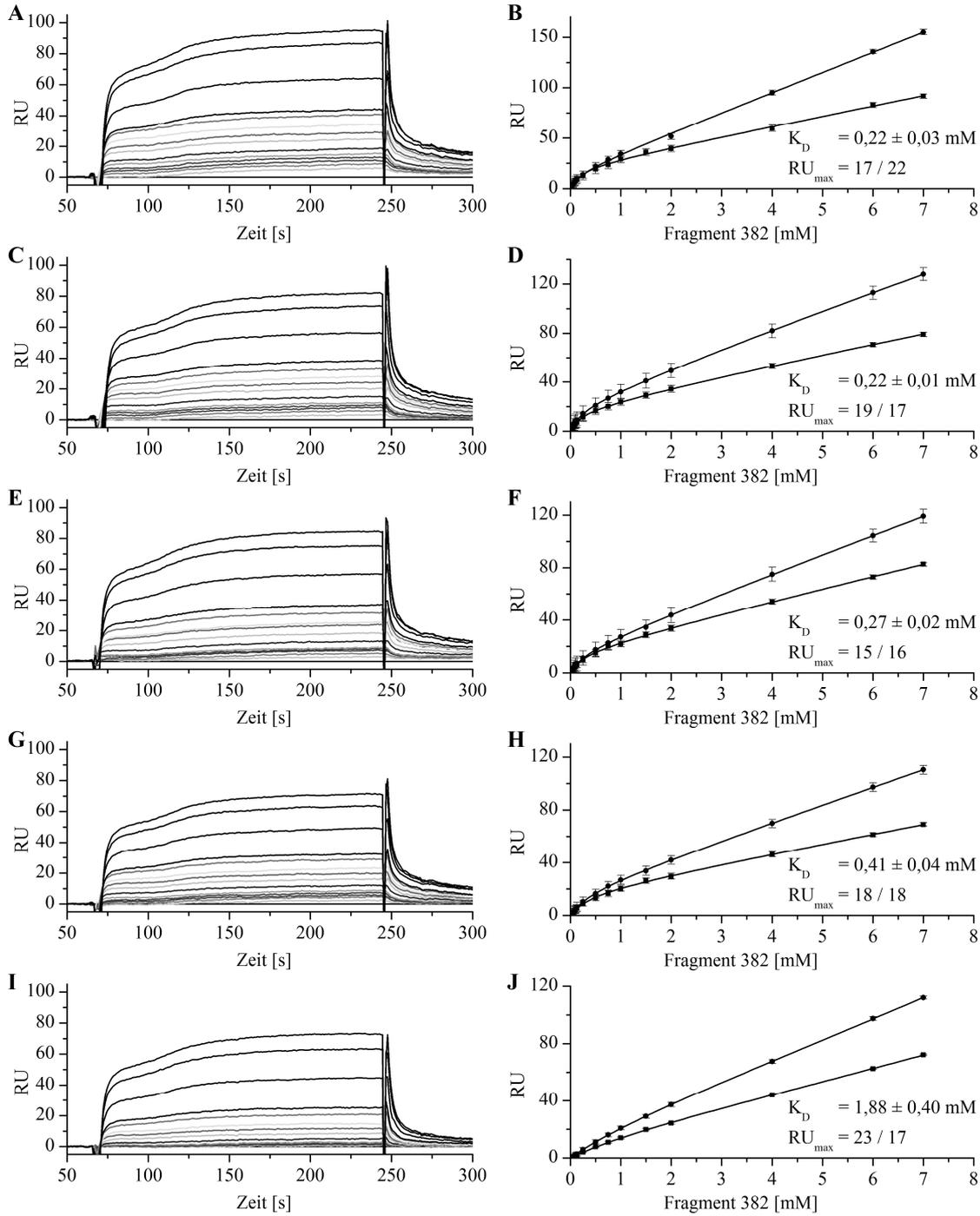


Abbildung 6.33 | Sensorgramme und Bindungsisothere der Bindung von Fragment 382 an immobilisierte GTB. Die Messungen wurden in in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C) und 100 mM NaCl sowie (A, B) ohne Metallion, mit (C, D) 5 mM MgCl₂, mit (E, F) 5 mM MgCl₂ und 1mM UDP, mit (G, H) 5 mM MnCl₂ sowie mit (I, J) 5 mM MnCl₂ und 1mM UDP mit GTB immobilisiert auf einem CM5 Chip durchgeführt. Als Referenz wurde eine leere Flusszelle verwendet. Alle Messungen wurden auf zwei unterschiedlichen Sensorchips (Chip 3/4) in dreifacher Bestimmung mit Konzentrationen von Fragment 382 von 25 µM bis 7 mM durchgeführt. Gezeigt ist jeweils das Sensorgramm der ersten Messung. Angegeben sind die Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximale Antwort RU_{max} der spezifischen Bindungsstelle eines Modells mit zwei Bindungsstellen.

AAGlyB

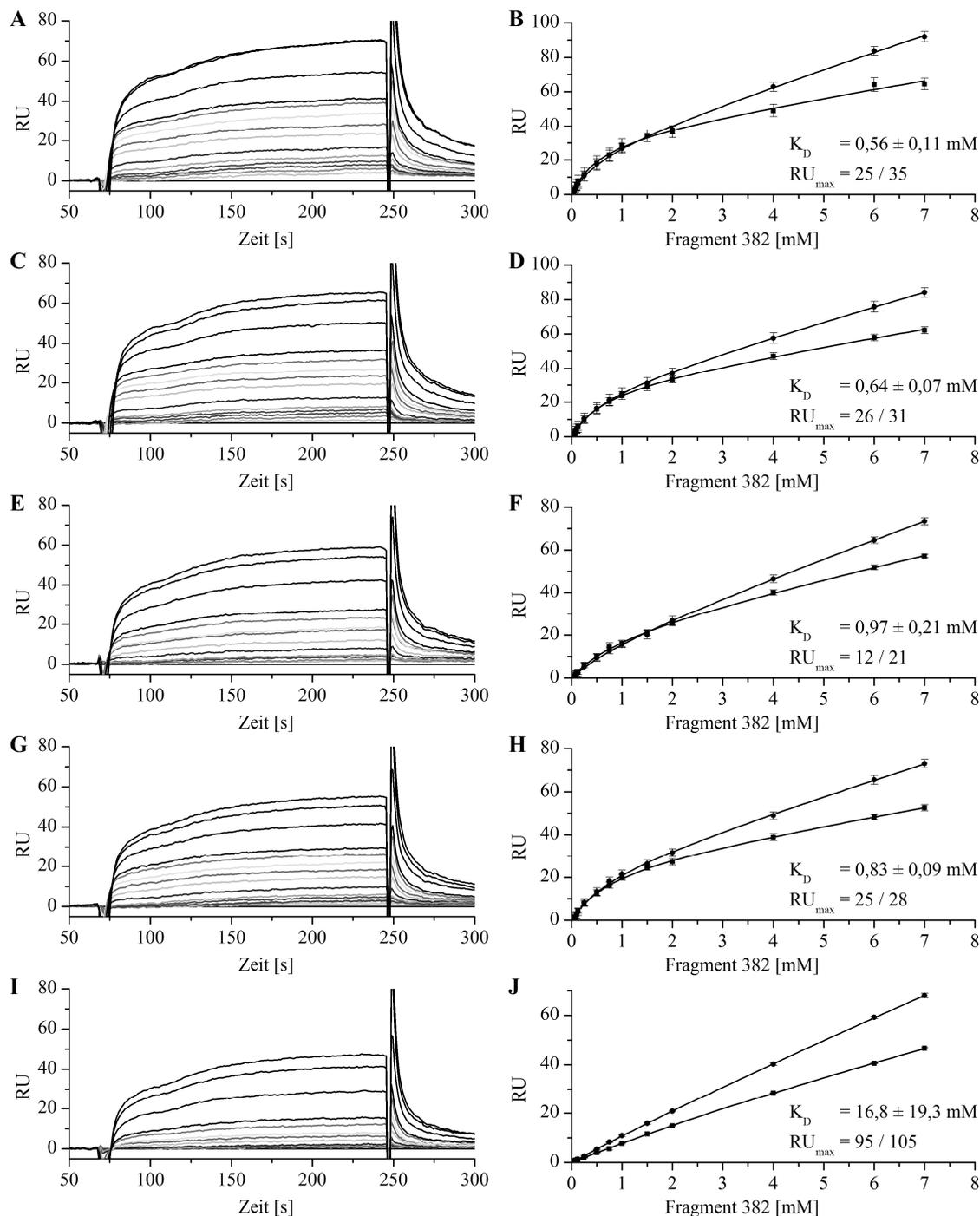


Abbildung 6.34 | Sensorgramme und Bindungsisotherme der Bindung von Fragment 382 an immobilisierte AAGlyB. Die Messungen wurden in 50 mM MOPS (pH 6,7 bei 25°C) und 100 mM NaCl sowie (A, B) ohne Metallion, mit (C, D) 5 mM MgCl₂, mit (E, F) 5 mM MgCl₂ und 1mM UDP, mit (G, H) 5 mM MnCl₂ sowie mit (I, J) 5 mM MnCl₂ und 1mM UDP mit AAGlyB immobilisiert auf einem CM5 Chip durchgeführt. Als Referenz wurde eine leere Flusszelle verwendet. Alle Messungen wurden auf zwei unterschiedlichen Sensorchips (Chip 3/4) in dreifacher Bestimmung mit Konzentrationen von Fragment 382 von 25 µM bis 7 mM durchgeführt. Gezeigt ist jeweils das Sensorgramm der ersten Messung. Angegeben sind die Dissoziationskonstanten K_D sowie die maximale Antwort RU_{max} der spezifischen Bindungsstelle eines Modells mit zwei Bindungsstellen.

6.5.2 STD-NMR-Daten

Tabelle 6.3 | ^1H -chemische Verschiebungen δ von UDP bei 298 K und 500 MHz. Die Probe enthielt 1 mM UDP und zusätzlich 20 μM GTB in 50 mM Bis-Tris- d_{19} (pH 6,7 bei 25 °C), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM 2-Mercaptoethanol- d_6 und 300 μM TSP- d_4 als interne Referenz.

Proton	Chemische Verschiebung [ppm]
H5 _U	5,96
H6 _U	7,96
H1 _R	5,97
H2 _R	4,39
H3 _R	4,39
H4 _R	4,28
H5 _R	3,25

Tabelle 6.4 | ^1H -chemische Verschiebungen δ von Fragment 382 bei 298 K und 500 MHz. Die Probe enthielt 1 mM Fragment 382 und zusätzlich 20 μM GTB in 50 mM Bis-Tris- d_{19} (pH 6,7 bei 25 °C), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM 2-Mercaptoethanol- d_6 und 300 μM TSP- d_4 als interne Referenz.

Proton	Chemische Verschiebung [ppm]
H2' / H6'	3,92
H3' / H5'	3,43
H2'' / H6''	8,08
H3''-H5''	7,56

6.6 NMR-Experimente

6.6.1 Zuordnungstabelle

Tabelle 6.5 | Chemische Verschiebungen von $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N -markierter GTB. Angegeben ist das jeweilige Spinsystem bzw. die Position und Art des jeweiligen Aminosäurerestes. Gemessen wurde die Probe bei 950 MHz und enthielt 1 mM der $u\text{-}^2\text{H}$, ^{13}C , ^{15}N -markierten GTB in NMR-Phosphatpuffer (H_2O) (siehe Tabelle 2.15) mit 100 μM TSP- d_4 als interne Referenz und 10 % D_2O . Zusätzlich sind die Ergebnisse der Titration von $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N -markierter GTB mit UDP dargestellt (siehe 3.3.4). Angegeben ist die Sättigung, bei der die Signale eine Änderung der chemischen Verschiebung erfahren bzw. Eigenschaften der Signale.

Aminosäure/Spinsystem	$^1\text{H}^{\text{N}}$ [ppm]	$^{15}\text{N}^{\text{H}}$ [ppm]	UDP-Titration
161Arg	8,443	121,552	
162Val	7,619	122,677	
163Thr	8,628	122,013	
164Leu	8,527	128,135	
165Gly	8,671	107,891	
166Thr	8,301	115,057	
{1}	7,696	117,859	

{4}	6,809	109,864	
{6}	8,604	121,321	
{8}	7,799	123,762	10%
{9}	7,676	114,379	
{11}	7,406	111,577	
{12}	7,755	113,893	10%
{13}	6,781	113,001	
{14}	7,377	110,904	
{16}	6,977	112,928	
{17}	7,655	111,702	
{18}	7,665	120,628	
{20}	8,076	116,674	
{21}	7,980	131,223	
{23}	7,550	114,908	
{24}	8,594	121,689	40%
{25}	7,030	114,740	
{26}	6,899	113,227	
{27}	9,922	128,240	
{29}	7,014	113,043	
{30}	7,702	111,167	
{32}	7,533	112,865	
{33}	7,372	111,785	
{34}	8,533	122,038	
{35}	7,632	115,005	
{38}	7,744	118,931	20%
{39}	8,265	117,621	
{40}	8,437	118,579	60%
{41}	8,275	117,361	10% (Ausläufer aus {39})
{45}	7,298	109,372	
{46}	8,312	124,329	
{47}	7,586	113,164	
{49}	10,065	126,539	
{51}	6,843	112,156	
{52}	8,032	109,245	
{53}	8,467	111,854	
{54}	7,039	120,799	
{56}	6,770	117,735	
{57}	8,059	117,262	10%
{58}	7,083	109,661	
{59}	8,536	126,626	
{60}	6,885	111,881	
{61}	8,948	115,571	
{62}	7,370	120,352	40%
{63}	6,689	115,220	
{64}	8,805	125,250	Signal verschwindet
{65}	6,776	110,719	40%

NMR-Experimente

{67}	6,953	112,511	
{69}	7,981	125,661	
{71}	6,786	112,093	
{72}	8,196	120,936	
{73}	7,579	119,599	
{74}	7,955	120,979	
{75}	7,934	119,368	
{76}	7,749	117,568	
{80}	7,592	109,778	
{81}	8,067	120,523	10%
{85}	8,713	118,613	
{86}	7,888	113,874	
{87}	7,430	113,608	
{88}	8,939	123,804	
{91}	7,891	120,088	Nah am Rauschen
{93}	7,349	117,843	
{94}	9,559	121,620	
{95}	10,849	115,211	
{98}	6,856	116,029	
{99}	8,384	114,151	
{100} Seitenkette	7,007	113,941	
{100} Seitenkette	6,911	113,945	
{101}	6,837	110,834	
{102}	6,638	112,995	
{103}	6,773	111,738	
{104}	9,478	130,213	
{105}	8,588	120,422	
{106}	8,190	121,785	
{108}	8,744	124,638	10%
{109}	7,425	118,264	
{112}	9,953	124,195	
{113}	7,720	113,008	
{116}	8,458	115,772	
{117}	6,810	109,380	
{118}	10,296	129,772	
{119}	8,647	116,261	40%
{120}	6,833	114,627	
{121}	6,678	110,716	
{124}	8,677	122,953	
{125}	7,814	121,122	
{126}	8,251	122,017	
{127}	6,834	111,838	
{129}	9,372	129,043	Langsamer Austausch mit {614}
{130}	9,029	128,303	
{131}	8,370	124,650	Vereinigt sich mit {310}
{132}	7,598	118,936	

{133}	9,089	128,536	
{134}	9,653	116,722	
{135}	8,084	119,687	10%
{138}	8,631	122,669	10% (Signal verschwindet)
{140}	8,723	114,842	
{141}	6,931	113,226	
{143}	7,107	113,038	
{144}	10,186	126,611	Signal verschwindet
{145}	7,723	112,110	
{146}	8,308	120,957	starke Überlagerung
{147}	7,140	134,600	
{150}	8,022	118,872	Signal verschwindet
{152}	8,610	118,386	
{153}	7,782	116,947	
{154}	7,683	109,684	
{157}	9,092	123,863	80%
{158}	8,003	118,465	40%
{159}	8,182	119,898	
{160}	8,439	124,886	Signal verschwindet
{161}	8,204	115,121	
{163}	8,656	115,025	60%
{164}	6,989	113,256	
{165}	8,553	118,216	
{166}	6,905	112,217	10%
{167}	8,598	113,263	
{169}	7,535	111,996	
{170}	7,592	112,301	
{173}	9,097	124,274	Nah am Rauschen
{174}	8,496	117,355	10%
{175}	10,746	128,531	
{176}	8,670	123,662	
{177}	7,890	117,209	
{178}	8,085	118,882	
{179}	8,462	109,935	20%
{181}	7,683	113,146	
{184}	7,291	110,725	
{185}	7,236	112,546	
{188}	7,152	133,777	
{189}	8,389	122,674	40%
{190}	8,150	117,831	
{191}	8,933	123,097	
{192}	7,777	133,347	
{193}	9,309	125,442	
{194}	8,026	123,619	
{195}	8,277	124,703	40%
{196}	8,159	109,931	

{197}	8,042	110,567	
{199}	6,641	113,936	
{201}	10,819	114,963	
{203}	6,868	112,516	
{204}	7,632	112,881	Signal verschwindet
{205}	8,829	119,663	
{206}	7,828	118,249	Signal verschwindet
{209}	7,571	117,668	10%
{210}	8,036	119,744	
{212}	8,371	121,820	80%
{213}	8,185	116,219	Signal verschwindet
{215}	6,714	111,647	
{216}	7,657	113,890	
{217}	7,452	110,859	Signal verschwindet
{218}	7,018	112,053	
{219}	6,881	112,923	Signal verschwindet
{220}	6,996	111,759	
{221}	8,146	120,579	
{222}	8,238	124,421	
{223}	8,654	120,236	
{225}	6,914	112,974	Signal verschwindet
{226}	8,094	118,365	Signal verschwindet
{228}	8,115	119,426	
{230}	6,717	110,664	
{231}	8,275	125,073	
{232}	8,656	121,193	
{233}	8,301	115,313	
{234}	7,009	116,587	
{235}	7,421	114,536	Signal verschwindet
{236}	8,175	120,216	
{237}	7,288	111,585	
{238}	8,008	114,063	
{240}	8,602	114,883	10%
{241}	8,906	124,811	
{243}	6,769	122,059	
{244}	6,803	110,307	
{245}	9,450	117,067	
{247}	8,438	116,816	
{248}	7,060	122,811	
{249}	8,062	125,144	
{250}	7,426	115,757	60%
{251}	9,133	125,138	
{252}	9,172	115,062	
{253}	10,021	114,790	
{255}	7,457	111,760	
{256}	7,368	122,160	

{257}	7,974	108,516	
{258}	8,463	121,403	
{259}	7,764	120,755	
{260}	7,587	111,002	
{262}	7,920	119,139	10%
{263}	7,382	117,296	
{264}	8,470	117,000	
{266}	7,759	123,485	10%
{267}	8,739	122,858	
{268}	7,610	115,577	
{269}	8,576	118,480	
{270}	7,571	111,644	
{272}	8,228	121,822	
{273}	7,681	133,555	
{275}	6,838	113,230	
{276}	7,201	112,278	10%
{277}	8,199	122,475	
{278}	7,358	119,221	
{279}	7,641	111,992	
{280}	8,065	120,850	
{281}	8,343	126,384	
{282}	7,696	119,584	
{283}	7,981	119,251	
{284}	7,299	117,439	
{285}	7,123	118,200	
{287}	7,139	117,250	
{289}	8,506	124,780	Signal verschwindet
{290}	8,032	115,270	10%
{292}	6,813	112,790	
{293}	9,326	123,747	10%
{294}	7,664	112,483	
{297}	8,386	117,946	
{298}	8,025	126,098	
{301}	7,440	121,916	
{302}	9,136	115,900	
{304}	8,708	114,055	
{305}	7,999	116,233	
{306}	8,039	124,385	
{307}	7,567	110,797	
{310}	8,331	125,188	
{312}	8,569	124,816	
{313}	8,965	122,201	
{314}	9,231	119,945	40%
{318}	8,439	122,579	
{319}	8,476	119,643	
{322}	7,816	113,019	

{327}	7,150	116,126	
{330}	8,753	108,060	
{336}	8,069	124,276	20%
{339}	7,935	121,515	
{340}	8,747	116,571	
{343}	8,278	121,395	starke Überlagerung
{349}	9,200	121,800	Signal verschwindet
{355}	7,803	115,458	
{358}	8,424	119,342	starke Überlagerung
{361}	8,455	119,649	
{362}	8,157	119,449	
{367}	7,809	113,851	
{372}	8,067	119,146	
{376}	7,309	134,373	Überlagerung
{377}	7,336	133,254	10%
{378}	7,905	129,239	Langsamer Austausch mit {604}
{380}	8,393	125,481	
{381}	8,327	125,475	
{384}	9,505	124,199	
{385}	8,433	123,830	
{386}	8,382	121,373	
{387}	8,536	120,623	
{388}	7,738	120,174	kleines Signal
{389}	7,695	118,641	40%
{390}	7,993	117,961	
{391}	9,481	117,305	
{392}	7,850	114,990	
{393}	9,717	113,091	
{394}	7,925	112,305	
{395}	8,040	111,887	
{396}	6,935	111,831	
{397}	6,884	111,104	
{398}	7,297	110,265	
{399}	8,706	118,730	
{400}	8,158	120,587	
{401}	8,152	120,213	
{402}	8,268	124,075	10%
{403}	9,144	131,632	
{409}	7,981	130,246	
{419}	8,865	134,547	
{420}	7,470	133,957	
{421}	6,946	133,925	
{422}	8,342	119,405	
{423}	8,340	120,074	
{424}	8,591	121,026	
{425}	7,252	119,299	

{435}	7,610	122,789	
{472}	7,871	113,158	
{482}	6,734	110,778	
{491}	7,901	120,306	
{492}	6,805	110,701	
{496}	7,862	113,140	
{497}	7,759	113,140	
{498}	7,608	113,176	
{528}	8,416	122,187	
{540}	8,306	124,328	
{560}	8,455	125,399	
{587}	7,535	113,429	10%
{589}	8,461	122,842	Signal verschwindet
{590}	7,738	120,759	
{591}	8,389	120,002	10%
{592}	11,949	131,485	Signal verschwindet
{593}	11,506	131,442	Signal verschwindet
{594}	8,420	115,780	
{595}	7,066	113,354	Signal verschwindet
{596}	8,156	126,792	
{597}	7,802	116,726	40%
{598}	7,724	116,947	
{599}	7,700	116,878	
{600}	8,856	124,922	Signal verschwindet
{601}	10,894	115,364	
{602}	8,147	116,288	Signal verschwindet
{603}	8,075	116,754	
{604}	7,976	129,054	Langsamer Austausch mit {378}
{605}	7,782	125,243	Signal kommt dazu
{606}	9,172	115,140	Signal kommt dazu
{607}	6,772	122,185	
{608}	7,000	113,413	
{610}	9,428	124,105	
{611}	9,235	119,973	40%
{612}	8,474	123,987	Signal kommt dazu
{613}	8,934	115,730	10%
{614}	9,502	130,567	
{615}	8,443	126,503	Signal kommt dazu
{616}	6,520	118,791	
{629}	7,884	114,078	

6.6.2 CPMG-Relaxations-Dispersion Messungen mit der GTB

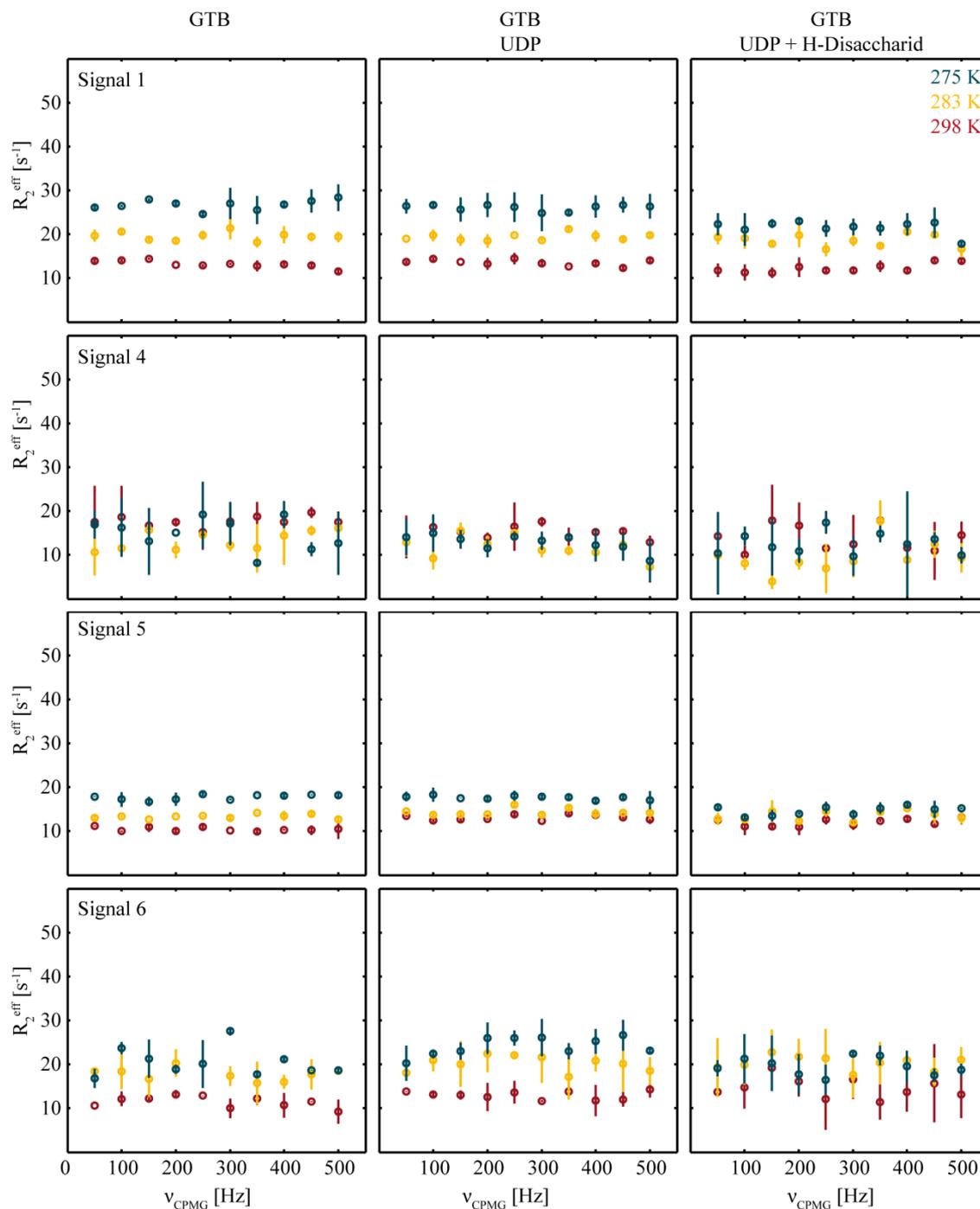


Abbildung 6.35 | Relaxations-Dispersionsprofile von GTB in Abhängigkeit von Substraten. Es wurden Methyl-TROSY CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB bei einer Feldstärke von 500 MHz, ν_{CPMG} -Frequenzen von 50 bis 500 Hz und 275 K (blau), 283 K (gelb) sowie 298 K (rot) durchgeführt. Gezeigt sind die Dispersionsprofile von Signal 1, 4, 5 und 6 (von oben nach unten) ohne (links), mit UDP (mitte) sowie mit UDP und H-Disaccharid (rechts). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der doppeltbestimmten Messwerte an. Das dazugehörige Methyl-TROSY NMR-Spektrum sowie die Nummerierung der Signale ist in Abbildung 3.30 zu finden. Die Darstellung erfolgte mit GUARD (Kleckner and Foster 2011).

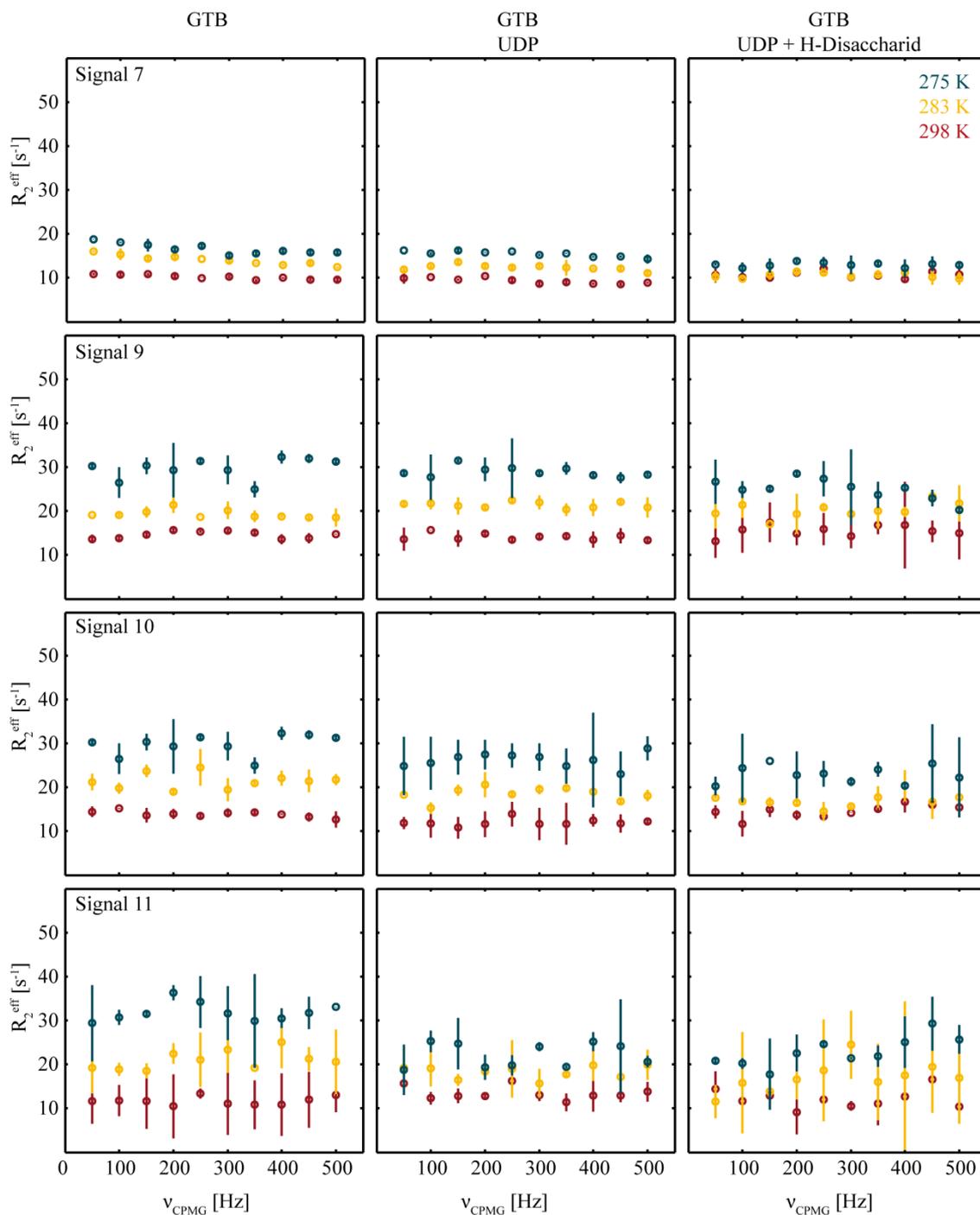


Abbildung 6.36 | Relaxations-Dispersionsprofile von GTB in Abhängigkeit von Substraten. Es wurden Methyl-TROSY CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter GTB bei einer Feldstärke von 500 MHz, ν_{CPMG} -Frequenzen von 50 bis 500 Hz und 275 K (blau), 283 K (gelb) sowie 298 K (rot) durchgeführt. Gezeigt sind die Dispersionsprofile von Signal 7, 9, 10 und 11 (von oben nach unten) ohne (links), mit UDP (mitte) sowie mit UDP und H-Disaccharid (rechts). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der doppelbestimmten Messwerte an. Das dazugehörige Methyl-TROSY NMR-Spektrum sowie die Nummerierung der Signale ist in Abbildung 3.30 zu finden. Die Darstellung erfolgte mit GUARDDD (Kleckner and Foster 2011).

6.6.3 Untersuchungen der GTB mit Lanthanoiden

Tabelle 6.6 | Aktivität von GTB in Anwesenheit verschiedener Metallionen. Gemessen wurde die Aktivität einer GTB-Probe in 50 mM MOPS pH 7, 100 mM NaCl, 1 mM DTT in Anwesenheit der angegebenen Metallionen. Es wurde der Aktivitätstest, wie unter 2.3.4 beschrieben, mit einer A_{\max} von 50545 dpm durchgeführt. Zusätzlich ist die prozentuale spezifische Aktivität gegenüber den Messungen mit $MnCl_2$ aufgeführt.

Metall	Verdünnungsfaktor 1:xxx	DPM	spezifische Aktivität [U/mg]	spezifische Aktivität [%]
$MnCl_2$	6000	5087	13.15	100.0
$MnCl_2$	6000	5137	13.28	
H_2O	600	1065	0.25	1.9
H_2O	1	22228	0.01	0.1
$H_2O + EDTA$	1	128	0.00	0.0
$MgCl_2$	600	3586	0.92	6.9
$MgCl_2$	600	3570	0.91	
$LaCl_3$	600	274	0.05	0.3
$LaCl_3$	100	336	0.01	0.1
$DyCl_3$	600	684	0.15	1.2
$DyCl_3$	100	299	0.01	0.1
$GdCl_3$	600	456	0.09	0.7
$GdCl_3$	100	243	0.01	0.0
$YbCl_3$	600	525	0.11	0.8
$YbCl_3$	100	334	0.01	0.1

Tabelle 6.7 | PRE-Effekte der Titration von $u\text{-}^2H, ^{15}N, \{Ile\delta 1\text{-}^{13}CH_3\}$ -markierter GTB-Probe mit $GdCl_3$ in Anwesenheit von UDP. Angegeben ist die Differenz der Linienbreiten in Hz der Titration von GTB in Anwesenheit von UDP mit $GdCl_3$ und $LaCl_3$.

Signal #	0 μM	25 μM	50 μM	75 μM	100 μM	125 μM	150 μM	200 μM	300 μM
2	-3,77								
3	-2,64	2,02							
9	3,23	12,17							
6	-3,58	2,09	34,71						
4	-5,93	-1,64	14,16						
11	0,67	4,07	4,16						
8	2,06	4,00	0,24	4,54					
7	-0,34	1,30	3,35	5,84	12,37	16,09	8,24	20,10	
10	5,88	3,21	5,33	13,12	2,44	-3,40	20,93	13,52	
1	2,77	-2,08	8,45	13,60	21,86	1,00	11,83	11,71	
5	0,51	4,12	5,75	4,75	5,23	5,62	3,57	7,88	17,19

6.6.4 Untersuchungen der West-Nil-Virus Protease

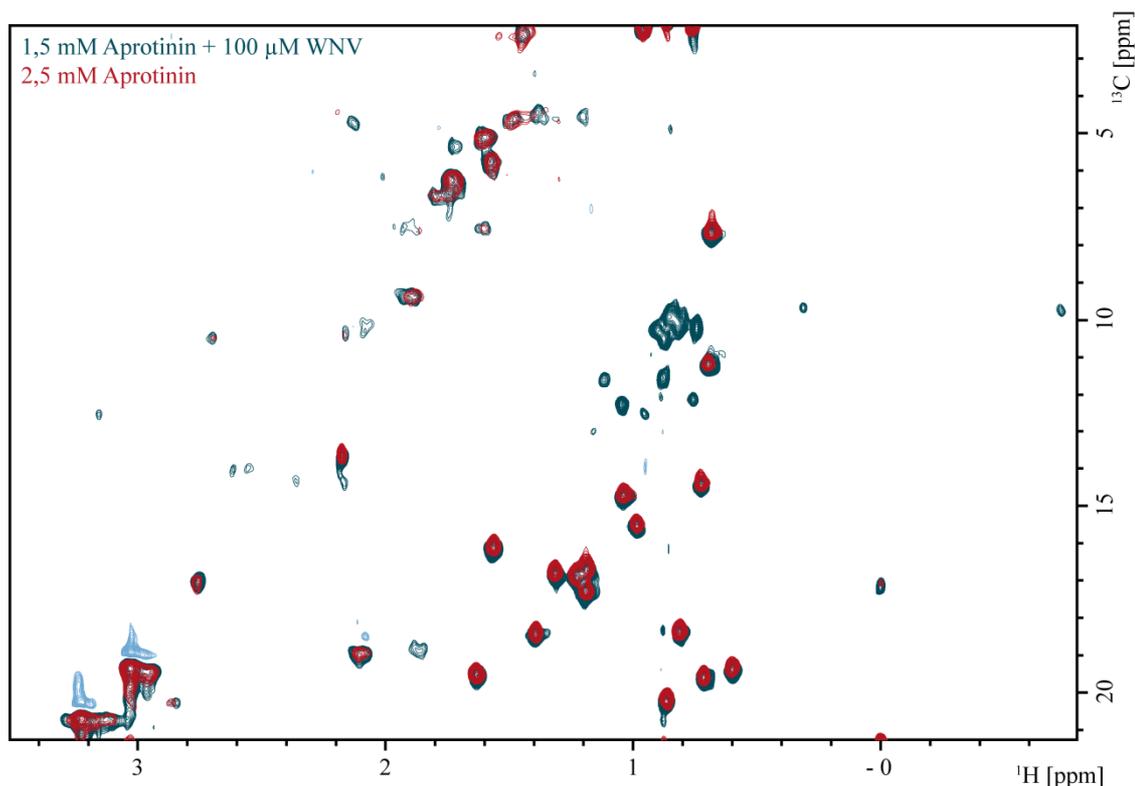


Abbildung 6.37 | Überlagerung von $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease mit 1,5 mM Aprotinin (blau) und 2,5 mM Aprotinin (rot). Gezeigt sind die Methyl-TROSY-NMR-Spektren von 2,5 mM Aprotinin sowie 100 μ M $u\text{-}^2\text{H},^{15}\text{N},\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease (1) mit 1,5 mM Aprotinin in 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in D_2O (pH 7 bei 25 $^\circ\text{C}$) mit 100 μ M TSP- d_4 als interne Referenz gemessen bei 298 K.. Die Aufnahmeparameter sind unter 2.6.10 angegeben.

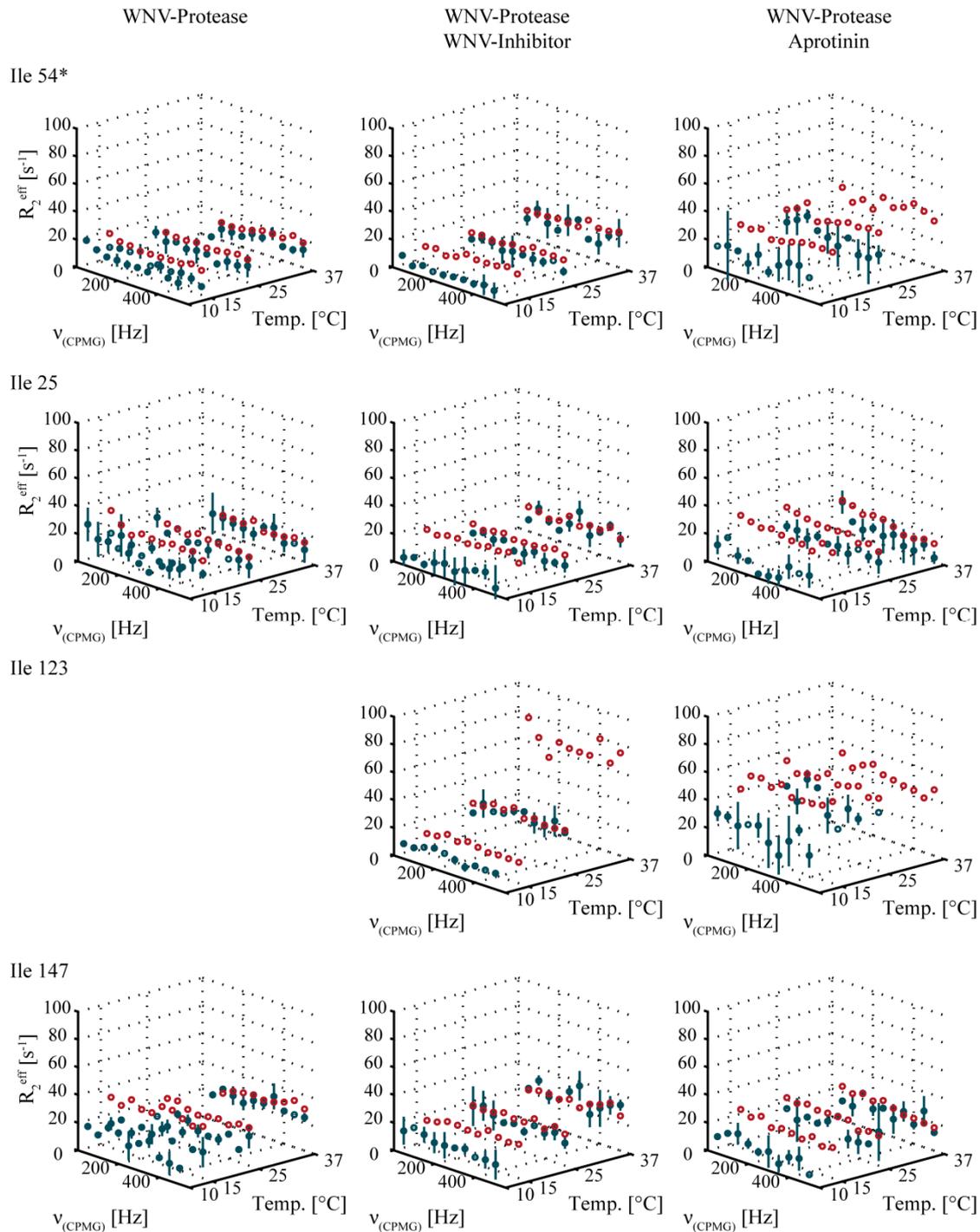


Abbildung 6.38 | Veränderung der Relaxations-Dispersionsprofile der WNV-Protease in Anwesenheit von WNV-Inhibitor und Aprotinin. Es wurden Methyl-TROSY CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit $u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}, \{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease bei 500 MHz (blau) und 700 MHz (rot), ν_{CPMG} -Frequenzen von 50 bis 500 Hz bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Gezeigt sind die Dispersionsprofile von Ile 54*, Ile 25, Ile 123 und Ile 147 (von oben nach unten) ohne (links), mit WNV-Inhibitor (mitte) und mit Aprotinin (rechts). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der doppeltbestimmten Messwerte an. Die dazugehörigen Methyl-TROSY NMR-Spektren sowie die Nummerierung der Signale sind in Abbildung 3.45, Abbildung 3.46 und Abbildung 3.47 zu finden. Bei den Messungen ohne Inhibitor, konnte kein Signal für das Ile 123 detektiert werden. Die Darstellung erfolgte mit GUARDD (Kleckner and Foster 2011).

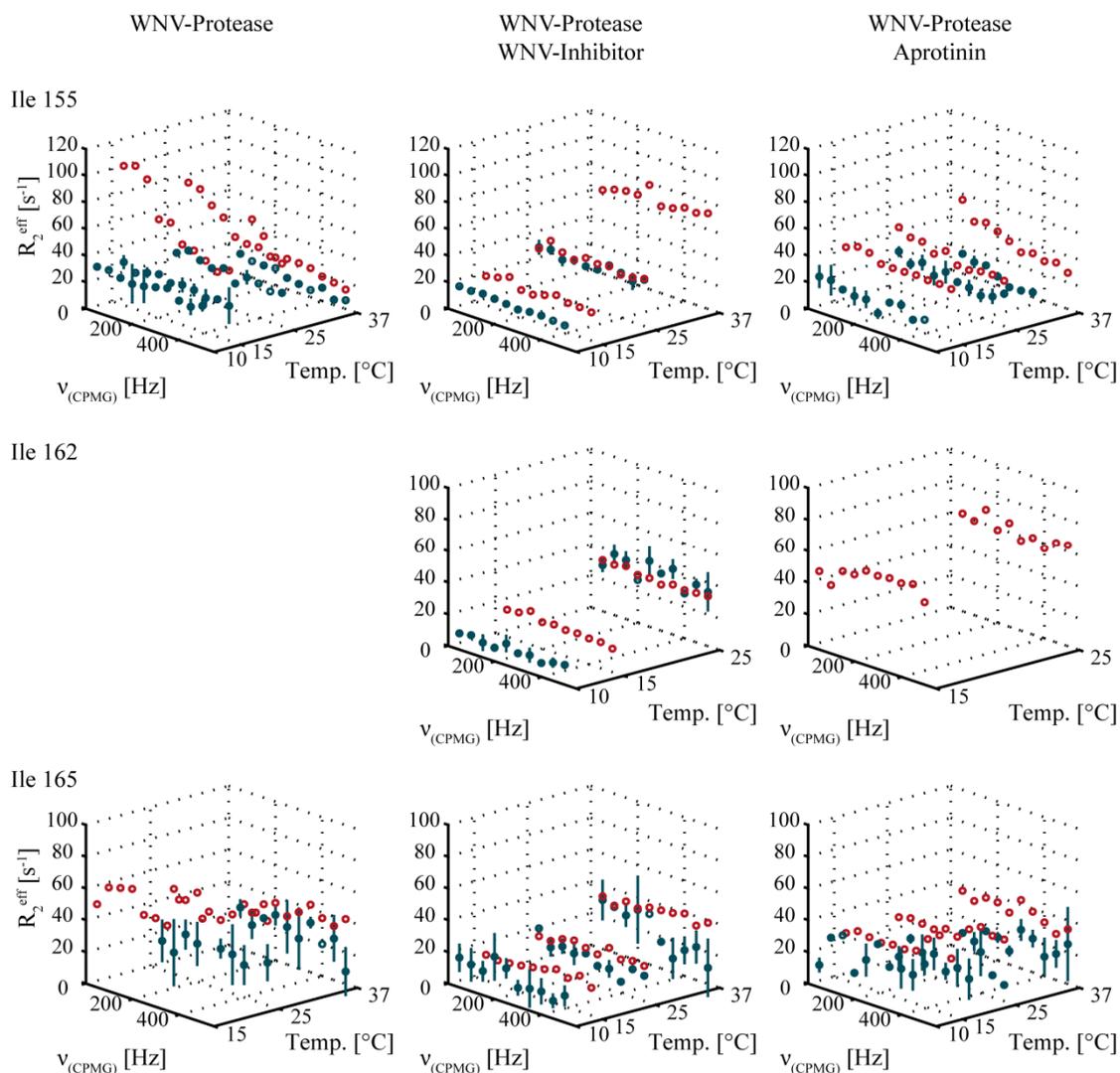


Abbildung 6.39 | Veränderung der Relaxations-Dispersionsprofile der WNV-Protease in Anwesenheit von WNV-Inhibitor und Aprotinin. Es wurden Methyl-TROSY CPMG-Relaxations-Dispersions Experimente mit $u\text{-}^2\text{H}$, ^{15}N , $\{\text{Ile}\delta 1\text{-}^{13}\text{CH}_3\}$ -markierter WNV-Protease bei 500 MHz (blau) und 700 MHz (rot), ν_{CPMG} -Frequenzen von 50 bis 500 Hz bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Gezeigt sind die Dispersionsprofile von Ile 155, Ile 162 und Ile 165 (von oben nach unten) ohne (links), mit WNV-Inhibitor (mitte) und mit Aprotinin (rechts). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der doppeltbestimmten Messwerte an. Die dazugehörigen Methyl-TROSY NMR-Spektren sowie die Nummerierung der Signale sind in Abbildung 3.45, Abbildung 3.46 und Abbildung 3.47 zu finden. Bei den Messungen ohne Inhibitor, konnte kein Signal für das Ile 162 detektiert werden. Die Darstellung erfolgte mit GUARDD (Kleckner and Foster 2011).

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Lena Lisbeth Grimm
 Nationalität: Deutsch
 Geburtsdatum: 11.11.1985 (Starnberg)
 Private Adresse: An der Mauer 12/8
 23552 Lübeck, Deutschland

Ausbildung

01/2011 - 12/2014 **Promotionsstudentin / Wissenschaftliche Mitarbeiterin** am Institut für Chemie (Prof. Dr. Thomas Peters), Universität zu Lübeck.
Doktorarbeit: "Ligandenbindung und Proteindynamik bei *humaner Blutgruppe B Galactosyltransferase* und *West-Nil Virus Protease NS2B-NS3*"

2008 - 2010 **Master of Science** in "Molecular Life Science" an der Universität zu Lübeck.

06/2010 – 12/2010 **Masterarbeit:** "Zur Interaktion kleiner Moleküle mit humanen Blutgruppen ABO Glycosyltransferasen" am Institut für Chemie (Prof. Dr. Thomas Peters), Universität zu Lübeck.

2005 - 2008 **Bachelor of Science** in "Molecular Life Science" an der Universität zu Lübeck.

05/2008 - 10/2008 **Bachelorarbeit:** "Photodynamische Therapie in Kombination mit einem Antiseptikum zur Eliminierung von *Candida albicans*" am Institut für Biomedizinische Optik (Dr. Heyke Diddens), Universität zu Lübeck.

1996 - 2005 **Abitur**, Gymnasium Landschulheim Kempfenhausen

Praktika / Auslandserfahrung

09 - 10/2013 **Nanyang Technological University, Singapur.**
 Division of Structural Biology & Biochemistry, School of Biological Sciences, Assoc Prof. Julien Lescar.
 Projekte: Untersuchungen zur Struktur eines Dengue-Virus Membran Proteins mittels Kernspinresonanz, Kristallisation einer Chikungunya-Virus Protease Domäne, sowie einen Komplex der Mehlwurm α -Amylase mit einem Peptidinhibitor.

- 03 - 05/2010 **Institut Pasteur Korea, Seoul, Südkorea.**
Center of Core Technology, Screening Technology Platform,
Dr. Jonathan Cechetto.
Projekte: Durchführung der Validierung und des Screenings
von humanen embryonalen Stammzellen auf
Differenzierung. Assay Entwicklung eines Screenings zur
Induktion von Seneszenz in Fibroblasten.
- 08 - 11/2009 **The University of Queensland, Brisbane, Australien.**
Institute for Molecular Bioscience, Chemistry and Structural
Biology, Prof. Glenn King, Dr. Volker Herzig.
Projekte: Isolierung von Peptiden die Acetylcholinrezeptoren
blocken aus Spinnengift. Rekombinante Expression und
Charakterisierung von insektiziden Spinnengiften, sowie in
vivo Studien an *L. cuprinato*.
- 2002 - 2003 **Oswego High-School, Illinois, USA.**
Auslandsschuljahr

Lehr- / Nebentätigkeiten

- 01/2011 - 12/2014 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** im Institut für Chemie,
Universität zu Lübeck.
Betreuung der Seminar und Praktika "Allgemeine Chemie"
und "Organische Chemie" und Kolloquien für Studenten des
Studiengangs Molecular Life Science.
- 09/2006 - 06/2007 **Wissenschaftliche Hilfskraft** im Institut für Chemie,
Universität zu Lübeck.
Betreuung der Seminar und Praktika "Allgemeine Chemie"
und "Organische Chemie" für Studenten des Studiengangs
Molecular Life Science.
- 08/2007 **Betreuerin eines Wissenschaftlichen Feriencamps.**
Vorbereitung und Durchführung von Workshops (Roboter,
Polizei) sowie ganztägige Betreuung von Kinder-
/Jugendgruppen.

Publikationen

- Sindhuwinata, N., **Grimm, L. L.**, Weißbach, S., Zinn, S., Munoz, E., Palcic, M. M., Peters, T. (2013) Thermodynamic signature of substrates and substrate analogs binding to human blood group B galactosyltransferase from ITC experiments. *Biopolymers*. 99(10):784-95
- Jorgensen, R., **Grimm, L. L.**, Sindhuwinata, N., Peters, T., Palcic, M. M. (2012) A glycosyltransferase inhibitor from a molecular fragment library simultaneously interferes with metal ion and substrate binding, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51(17)4171-5

DANKSAGUNG

In allererster Linie möchte ich mich bei **Prof. Dr. Thomas Peters** dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesen interessanten Themen zu arbeiten. Die fortwährende Unterstützung, hilfreichen Diskussionen und Ideen sowie eine hervorragende Betreuung haben es mir ermöglicht mich fachlich und persönlich weiterzuentwickeln.

Desweiterm möchte ich mich bei **Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld** bedanken, der mir die Arbeit an der West-Nil Virus Protease ermöglicht hat und seinen Mitarbeitern **Dr. Naoki Sakai**, **Caroline Haase** und **Linlin Zhang** für die tolle Einführung in dieses Themengebiet sowie die Bereitstellung der Plasmide.

Für viele inspirierende Diskussionen und ihrer vorlaufenden Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei **Prof. Dr. Monica M. Palcic** bedanken.

Für die Hilfe bei der Aufnahme der Tripelresonanzexperimente möchte ich mich herzlichst bei **Dr. Frank Löhr** sowie bei **Prof. Dr. Volker Dötsch** für die Messzeit an den NMR-Spektrometern in Frankfurt bedanken.

Mein Dank gilt auch **PD Dr. Sven Müller-Leonnie**s für die Möglichkeit zur Nutzung des iTC₂₀₀-Geräts im Forschungszentrum Borstel und die hilfreichen Tipps sowie Diskussionen die zum Gelingen der Experimente maßgeblich beigetragen haben. Auch gilt mein Dank hier vor allem **Thies Köhli** für die Unterstützung bei den ITC-Experimenten und der GTB-Synthese sowie **Wilfried Hellebrandt** für die Synthese verwendeter Substanzen.

Für das wissenschaftliche und angenehme Arbeitsklima im Institut für Chemie bedanke ich mich herzlichst bei **Dr. Thorsten Biet** für die Hilfe beim Umgang mit den NMR-Spektrometern sowie für die Beantwortung jeder noch so kleinen Frage, **Dr. Hannelore Peters**, **PD Dr. Thomas Weimar**, **Prof. Dr. Karsten Seeger** und **Dr. Alvaro Mallagaray de Benito** für die vielen und ideenreichen Diskussionen. **Dr. Nora Begemann** möchte ich für die tolle Einführung in das Themengebiet der humanen Blutgruppen ABO Glycosyltransferasen und für eine hervorragende Zusammenarbeit danken. Auch gilt mein größter Dank hier **Sophie Weißbach**, **Friedemann Flügge** und **Tobias Schöne** für die Weiterführung der Projekte sowie **Julietta Schweiger**, **Nikolai Yürttagül**, **Robert Creutzmacher** und **Till Zickmantel**, die während ihrer Zeit am Institut weitere Aspekte dieses Themas untersucht haben und damit zum Fortgang der Arbeit beigetragen haben. Zusätzlich danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern aus dem Institut für Chemie: **Dr. Bärbel Blaum**, **Christiane Blunk**, **Mailin Döpkins**, **Brigitte Fiege**, **Anika Hellberg**, **Ulrike Hermsdorf**, **Elisabeth Hölting**, **Sarah Leineweber**, **Mila Leuthold**, **Petra Lipp**, **Kirsten Petersohn**, **Dr. Rosa Pulz**, **Barbara Richer**, **Sarah Schönig**, **Anna Tomhardt** und **Cordula Windler**.

Danksagung

Für die Finanzierung dieser Arbeit bedanke ich mich bei der *European Commission Research and Innovation DG (SILVER)* sowie bei der *DFG - Deutsche Forschungsgemeinschaft*.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, Schwestern und Freunden vom ganzen Herzen danken. Sie haben mich während der gesamten Zeit unterstützt, motiviert und damit zu dem erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Vielen Dank!