

Technische Universität München  
Lehrstuhl für Biologische Chemie

**Untersuchungen zum biochemischen  
Wirkungsmechanismus der *Helicobacter pylori*  
 $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase**

Christian Felix Bolz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Haller  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Skerra  
2. Univ.-Prof. Dr. M. Gerhard

Die Dissertation wurde am 19.12.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 19.07.2013 angenommen.



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	<i>Helicobacter pylori</i> .....	1
1.1.1	Historie und Epidemiologie .....	1
1.1.2	Pathogenese und Virulenzfaktoren .....	3
1.2	Interaktionen zwischen dem Immunsystem und <i>Helicobacter pylori</i> .....	6
1.2.1	Angeborene und spezifische Immunantwort.....	7
1.2.2	Immunevasion.....	9
1.3	$\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (gGT) .....	10
1.3.1	Funktion und Vorkommen der gGTs .....	10
1.3.2	<i>Helicobacter pylori</i> $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (HpgGT) .....	13
1.4	Ziel der Arbeit .....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Material .....	16
2.1.1	Bakterienstämme, Zelllinien und Plasmide .....	16
2.1.2	Oligodesoxynukleotide .....	18
2.1.3	Enzyme und Antikörper .....	20
2.1.4	Nährmedien, Lösungen, Puffer und Antibiotika .....	21
2.1.5	Chemikalien, Standards und Kits .....	26
2.1.6	Geräte .....	27
2.2	Mikrobiologische Methoden .....	29
2.2.1	Vorbereitung von Geräten und Lösungen.....	29
2.2.2	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	29
2.2.3	Herstellung hochkompetenter <i>E. coli</i> -Zellen zur Elektrotransformation.....	30
2.2.4	Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	30
2.2.5	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
2.2.6	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	31

2.2.7	Bestimmung der Transformationseffizienz.....	31
2.2.8	Produktion rekombinanter Proteine in E. coli.....	31
2.3	Zellbiologische Methoden.....	32
2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien.....	32
2.3.2	Lagerung und In-Kulturnahme der Zelllinien.....	34
2.3.3	Bestimmung der Zellzahl.....	34
2.3.4	Elektroporation und transiente Transfektion von Zellen.....	34
2.3.5	Bestimmung der Proliferation von eukaryotischen Zellen.....	35
2.3.6	Durchflusszytometrische Analyse.....	35
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.4.1	DNA-Isolation & Reinigung.....	36
2.4.2	Gelelektrophorese.....	37
2.4.3	<i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA.....	37
2.4.4	Restriktionsendonuklease Verdau.....	39
2.4.5	Ligierung der DNA-Fragmente in Zielvektoren.....	39
2.4.6	Sequenzierung.....	39
2.5	Proteinchemische Methoden.....	39
2.5.1	SDS-Page.....	39
2.5.2	Western-Blot.....	40
2.5.3	Chromatographische Verfahren.....	41
2.5.4	Protein-Refolding.....	44
2.5.5	Bestimmung von Proteinkonzentration.....	45
2.6	Analytische Methoden.....	47
2.6.1	Enzymkinetische Analyse.....	47
2.6.2	Inhibitor-Analyse.....	48
2.6.3	Dünnschicht-Chromatographie.....	49
2.6.4	Massenspektrometrie.....	50

2.7	Computerprogramme und Datenbanken .....	51
3	Ergebnisse .....	52
3.1	Vergleich und Analyse rekombinanter Formen der gGT aus verschiedenen Spezies .....	52
3.1.1	Sequenzvergleich verschiedener gGTs .....	52
3.1.2	Strukturelle Modellierung von gGTs .....	53
3.1.3	Heterologe Produktion bakterieller gGTs aus verschiedenen Spezies.....	54
3.1.4	Konstruktion der Expressions-Vektoren, heterologe Produktion und Reinigung der humanen gGT .....	58
3.1.5	Präparierung von Punktmutanten der <i>Helicobacter pylori</i> gGT .....	65
3.1.6	Funktionelle und enzymkinetische Charakterisierung der gGTs .....	67
3.2	Untersuchung des immunsuppressiven Effektes der <i>H. pylori</i> gGT .....	76
3.2.1	Analyse des Einflusses der HpgGT auf die T-Zellproliferation .....	76
3.2.2	Versuche zur Identifizierung des immunsuppressiven Enzym- produkts der HpgGT .....	78
3.3	Identifizierung und Validierung von selektiven Inhibitoren der <i>H. pylori</i> gGT ...	84
3.3.1	Untersuchung von Acivicin als Referenzinhibitor für gGTs .....	84
3.3.2	Identifizierung und Validierung neuer Inhibitorandidaten .....	88
4	Diskussion.....	97
4.1	Die konservierte Funktion der <i>Helicobacter</i> $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase als Immunevasionsfaktor .....	97
4.2	Die $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase als Target für die Entwicklung von <i>Small Molecule Inhibitors</i> (SMIs) .....	102
5	Zusammenfassung.....	108
6	Abkürzungsverzeichnis .....	110
7	Literaturverzeichnis .....	114

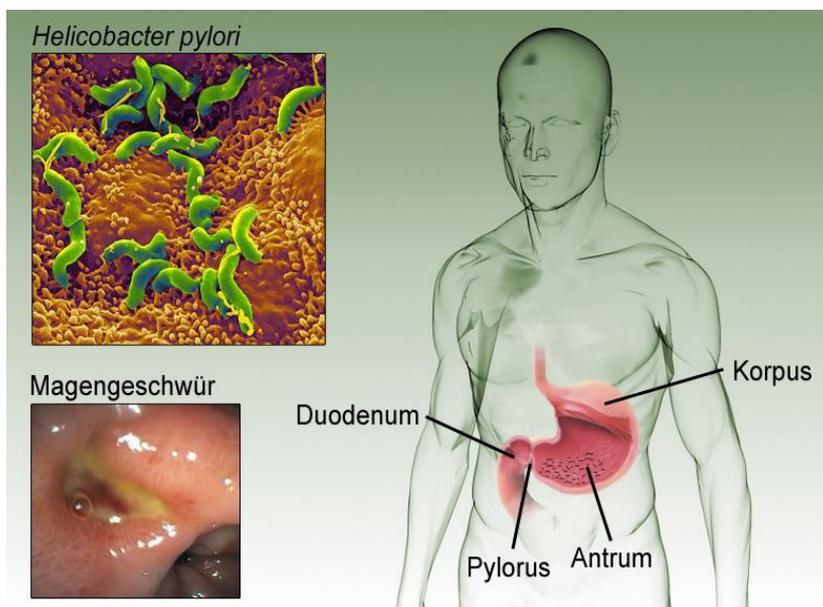


# 1 Einleitung

## 1.1 *Helicobacter pylori*

### 1.1.1 Historie und Epidemiologie

*Helicobacter pylori* ist ein gramnegatives, mikroaerophiles, spiralförmiges Bakterium, welches durch die zwei bis sechs unipolar angeordneten, ca. 3 µm langen Flagellen hohe Motilität besitzt. Durch seine Fähigkeit, die Säurebarriere zu überwinden, kann es die Magenschleimhaut als ökologische Nische nutzen und besiedeln (Kusters et al., 2006; Yokota et al., 1991). Das ca. 2 bis 4 µm lange Bakterium wurde 1983 erstmals als *Campylobacter pyloridis* von den Medizinern J. R. Warren und B. Marshall aus Magenbiopsien isoliert, beschrieben und in direkten Zusammenhang mit der Entwicklung von Ulzera und Magenkrebs gebracht (Marshall and Warren, 1984) (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Darstellung der *Helicobacter pylori* Infektion & klinischem Krankheitsbild; Elektronen mikroskopische Aufnahme: *Helicobacter pylori* grün eingefärbt (Quelle: Manuelle Jadoul, DIAsource) Magengeschwür im Antrum (Quelle: Peter B. Kelsey, DAVE-Projekt).

Für diese Entdeckung und die daraus resultierenden Erkenntnisse wurden die beiden Australier im Jahr 2005 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Untersucht man die Literatur jedoch auf Beschreibungen spiralförmiger Magenbakterien, finden sich bereits erste Berichte über Spirochäten im humanen Magen aus den Jahren 1906 von dem deutschen Mediziner W. Krienitz (Rickes et al., 2006). Es wurde aber weder eine Besiedelung des Magens gezeigt, noch ein direkter Zusammenhang mit dem Auftreten von Magengeschwüren und -krebs beschrieben. Die genaue molekularbiologische Untersuchung des Bakteriums ergab, dass es sich bei dem neu isolierten Bakterium um eine eigene Gattung

handelt (Goodwin et al., 1985; Lau et al., 1987), weshalb es 1989 in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) umbenannt wurde (Goodwin et al., 1989). In den vergangenen dreißig Jahren wurden 28 Arten in der Gattung der *Helicobacter* identifiziert (Solnick and Schauer, 2001), die neben dem Menschen auch verschiedenste Tierarten infizieren können. Darunter finden sich Arten wie *H. felis* und *H. mustelae*, welche aus Katzen, Hunden bzw. Frettchen isoliert wurden (Owen, 1998).

Mit einer Infektionsrate von vierzig bis fünfzig Prozent ist die Infektion mit *H. pylori* eine der häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen weltweit (Mitchell, 1999). Vor allem in Entwicklungsländern sind mehr als achtzig Prozent der Bevölkerung infiziert (Ahmed et al., 2007; Dunn et al., 1997), welche ein deutlich erhöhtes Risiko aufweisen, an Magenkrebs zu erkranken. In diesem Zusammenhang ist *H. pylori* von der WHO seit 1994 als Typ I Karzinogen eingestuft (IARC 1994). Die damit verbundenen Behandlungskosten und Arbeitsausfälle bedingen die besondere volkswirtschaftliche Bedeutung dieser Infektionskrankheit.

Für die Unterschiede in der Durchseuchungsrate zwischen Industrie- und Entwicklungsländern werden verschiedene Faktoren verantwortlich gemacht. So spielen vor allem sozioökonomische Faktoren, wie etwa hygienische Bedingungen, Familiengröße, Bildung und Einkommen, eine entscheidende Rolle bei der Prävalenz der Infektion (Brown, 2000; Malaty et al., 1992; Murray et al., 1997; Van Zanten et al., 1999). Des Weiteren wurde in Studien an Zwillingen gezeigt, dass genetische Dispositionen (Malaty et al., 1994) die Infektionsrate beeinflussen.

Als potentielle Infektionsquellen für *H. pylori* werden in der Literatur verschiedene Routen kontrovers diskutiert. Die Besiedelung der Magenmukosa durch das Bakterium legt eine orale Übertragung nahe. Zahlreiche Studien belegen, dass der wohl wichtigste Übertragungsweg von Mensch zu Mensch oral-oral durch Speichel bzw. Erbrochenem ist. Es konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* bei über fünfzig Prozent der infizierten Patienten im Magensaft nachweisbar ist (Varoli et al., 1991). Ein weiteres Indiz für diesen Übertragungsweg ist die erhöhte Seroprävalenz bei Kleinkindern in Familien, in denen bereits ein Elternteil mit *H. pylori* infiziert war (Escobar and Kawakami, 2004; Malaty, 2007). Darüber hinaus weisen infizierte Familienmitglieder meist denselben *H. pylori*-Stamm auf (Wang et al., 1993).

Neben diesem Hauptübertragungsweg wurden auch die fäkal-orale Übertragung bzw. die Übertragung durch Tiere oder eine Infektion durch kontaminierte Lebensmittel bzw. Wasser

beschrieben. Letzteres konnte zumindest bei Studien in Entwicklungsländern nachgewiesen werden (Hulten et al., 1996).

Es wird vermutet, dass die Interaktion von (zum Teil genetisch determinierten) Wirtsfaktoren, Umweltfaktoren und bakteriellen Virulenzfaktoren den Verlauf der Erkrankung bestimmt (Blaser and Berg, 2001).

### 1.1.2 Pathogenese und Virulenzfaktoren

Die Infektion führt bei – meist jahrzehntelanger – Persistenz im Magen zu einer chronisch-atrophischen Gastritis, intestinaler Metaplasie und, mit geringerer Wahrscheinlichkeit, zur Entstehung von Magenkarzinomen (Blaser, 1998). Die immer entstehende chronische Gastritis durch die *H. pylori* Infektion (Graham et al., 2004; Kusters et al., 2006), bzw. die Infektion als entscheidender Auslöser für Atrophie und intestinale Metaplasie, ist mehrfach in der Literatur beschrieben. Die durch eine chronische *H. pylori*-Infektion bedingten Veränderungen der Mukosa begünstigen die Bildung von Magen- oder Zwölffingerdarmgeschwüren (Ulcus ventriculi bzw. Ulcus duodeni). In Studien konnte eine Korrelation zwischen Ulzera und Infektion in über 85 % der gastroskopierten Patienten gefunden werden (Kuipers et al., 1995).

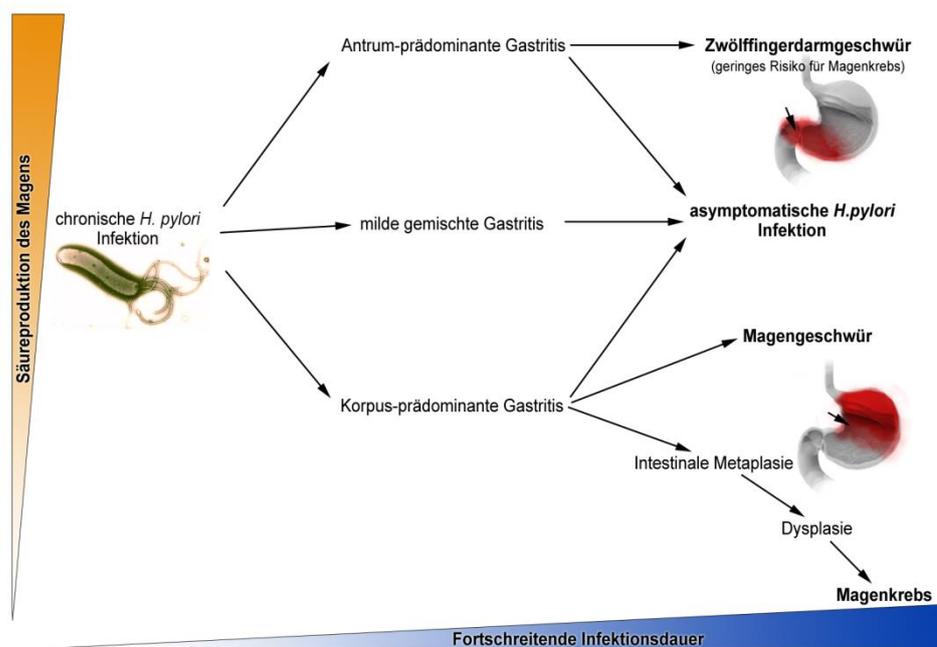
Die Lokalisierung der Geschwüre wird durch den Grad der Säureproduktion des Magens durch die unterschiedliche Lokalisierung der Infektion beeinflusst. Patienten mit geringer Säureproduktion entwickeln meist die stärkste Entzündungsreaktion im gastralen Raum zwischen Korpus und Antrum, welche Magengeschwüre begünstigt. Eine starke Inflammation im distalen Magen und des proximalen Duodenums bei Patienten mit höherer Säureproduktion begünstigt hingegen ein Zwölffingerdarmgeschwür. Neben den eigentlichen Beschwerden durch die Geschwüre können Blutungen (15 bis 20 %) und Perforation der betroffenen Gewebe auftreten (siehe Abbildung 2). Durch eine Antibiotika-basierte Erradikation der *H. pylori*-Infektion kann die Wahrscheinlichkeit für eine erneute Entstehung eines Ulcus dramatisch gesenkt werden (Treiber and Lambert, 1998).

Neben Geschwüren entwickeln Patienten mit *H. pylori*-Infektion in Industriestaaten mit einer Wahrscheinlichkeit von einem bis zwei Prozent Magenkrebs (Kuipers, 1999).

Die Infektion mit *H. pylori* und den damit assoziierten Krankheiten verursacht global enorme sozioökonomische Kosten (Deltenre, 2012). Eine stetig wachsende Anzahl an *H. pylori*-Stämmen können mit einer herkömmlichen Antibiotika-Therapie nicht mehr eradiziert werden. Bereits 27 % der Keime besitzen eine Resistenz gegen Metronidazol (De

Francesco et al., 2010), einem Bestandteil der bislang angewandten Triple-Antibiotika-Therapie. Angesichts dieser Situation gibt es einen großen medizinischen Bedarf an neuen Antiinfektiva gegen bakterielle Zielstrukturen. Optimalerweise sind diese neuen Substanzen genau auf einen Keim oder eine Zielstruktur zugeschnitten („*tailored drugs*“). Dadurch können Nebenwirkungen minimiert und Resistenzentwicklungen vermieden werden.

Insbesondere *cagA*-positive Stämme und IL-1 $\beta$ -Überproduktion seitens der Patienten führen zu einem erhöhten Risiko (El-Omar et al., 2000). Ebenfalls mit der Infektion assoziiert ist die Entstehung von MALT-Lymphomen (Parsonnet et al., 1994).



**Abbildung 2:** Zusammenhang zwischen klinischem Verlauf der *H. pylori* Infektion und Säureproduktion der Patienten (adaptiert von Perez-Perez and Portal-Celhay, 2006).

Epidemiologische und tierexperimentelle Studien zeigen insbesondere eine Korrelation zwischen der Entstehung von Magengeschwüren und Adenokarzinomen mit den bakteriellen Virulenzfaktoren VacA, CagA und BabA (Atherton, 1998; Atherton et al., 1995; Atherton et al., 1997; Boren et al., 1993; Censini et al., 1996; Censini et al., 2001; Gerhard et al., 1999).

Für VacA wird diese Erhöhung des Risikos auf den zytotoxischen Effekt des 95 kDa-Proteins zurückgeführt. Das „vacuolating cytotoxin“ VacA wird zunächst als 140 kDa großes Protoxin hergestellt, welches anschließend posttranslational gespalten wird und in neutralem pH Hexa- bzw. Heptamere bildet (Cover et al., 1997). Das *vacA*-Allel, das in allen *H. pylori*-Stämmen vorhanden ist (Cover and Blaser, 1992), kann in zwei Bereiche unterteilt

werden: den N-Terminus mit Signalpeptid (s-Region), welcher die toxische Aktivität vermittelt, und die Zell-Binde-Domäne (m-Region). Polymorphismen von *vacA* in diesen Bereichen haben direkten Einfluss auf die Toxizität und somit auf die Entstehung von Ulzera (Basso et al., 2008). Der Grad der Entzündungsreaktion ist direkt verbunden mit den *vacA* Signal-Subtypen, wobei s1 eine stärkere Entzündung bewirkt als s2. Der *vacA*-Genotyp mit der Kombination s1/m1 zeigt die größte Korrelation mit der Entstehung von Magenkarzinomen (Miehlke et al., 2000). Die genaue Wirkungsweise des Toxins ist bislang unklar. Neben der direkten toxischen Wirkung auf Epithel-Zellen wird auch eine positive Wirkung auf das Überleben des Keims in der Mukosa beschrieben. Die durch VacA induzierte Erhöhung der Permeabilität von Zellmembranen führt zu einer erhöhten Freisetzung an  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  (Papini et al., 1998). Zusätzlich kann die Ausbildung von Anion-selektiven Kanälen in Membranen von Epithelzellen und der damit verbundenen Freisetzung von z. B.  $\text{HCO}_3^-$  ebenfalls das *H. pylori*-Wachstum begünstigen. Neben den hier aufgeführten Effekten wurde auch die Modulation der Immunantwort durch Beeinflussung der Antigenpräsentation beschrieben (Molinari et al., 1998).

In klinischen Studien wurde eine enge Korrelation zwischen der VacA-Expression und dem „cytotoxin-associated gene“ CagA gefunden (Tummuru et al., 1993). Das CagA-kodierende Gen ist auf dem Gencluster der chromosomalen Pathogenitätsinsel (PAI) lokalisiert (Akopyants et al., 1998). Dieses Cluster enthält etwa dreißig Gene und steht in direktem Zusammenhang mit der Entstehung von Ulcera. Das Molekulargewicht von CagA variiert je nach Anzahl an EPIYA enthaltenden Repeats (102- bzw. 108 bp langes Motiv) zwischen 128 und 144 kDa. Bei Infektionen mit *H. pylori*-Stämmen, welche CagA mit einer hohen Anzahl an Repeats exprimieren, wiesen Patienten einen erhöhten Grad der Atrophie des Epithelgewebes auf. Das Protein wird über das Cag-PAI-codierte Typ IV-Sekretionssystem (Viala et al., 2004) in gastrale Epithelzellen transduziert. Dabei wird CagA durch die Phosphorylierung eines Tyrosins im EPIYA-Motiv durch eine zelluläre Tyrosin-Kinase der Src-Familie aktiviert (Stein et al., 2002). Hier bewirkt es neben der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts (Segal et al., 1996) in Epithelzellen auch die Induktion von Apoptose in T-Zellen (Wang et al., 2001). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass transgene Überexpression des Virulenzfaktors CagA im Mausmodell zu einem wesentlich erhöhten Krebsrisiko führt (Ohnishi et al., 2008).

Eine andere Klasse bakterieller Proteine vermittelt die Adhäsion des Keims und spielt somit eine wichtige Rolle in der Pathogenität. Der wohl am besten beschriebene Vertreter dieser

Gruppe ist das blutgruppenantigenbindende Adhäsion (BabA / HopS) und gehört zu der Familie der Outermembrane-Proteine (OMPs). Das 78 kDa-Protein wird durch das *babA*-Gen codiert und kommt in *H. pylori* in zwei verschiedenen Allelen vor: *babA1*, einer durch eine Insertion verkürzten inaktiven, und *babA2*, einer aktiven Variante. Es konnte gezeigt werden, dass BabA die Bindung an fucosylierte Lewis b (Le<sup>b</sup>)-Antigene vermittelt (Ilver et al., 1998). So ermöglicht es dem Keim, spezifisch an das Magenepithel zu binden. In einer Studie wurde dargestellt, dass bei Zugabe von monoklonalen Antikörpern gegen Le<sup>b</sup> eine Adhäsion von *H. pylori* an fixiertes Magengewebe unterbunden wird (Boren et al., 1993). Insbesondere das Vorhandensein des *babA2*-Allels zeigt eine hohe Korrelation zum Auftreten von Magengeschwüren und Magenkarzinomen (Gerhard et al., 1999).

Ein weiteres Protein dieser Familie ist das sialylsäurebindende Adhäsionsprotein SabA (HopP), welches die Bindung an Silyl-Glykosphingolipide vermittelt (Mahdavi et al., 2002). Das 66 kDa Protein, das sialylierte Lewis x (sLex)-Antigene während des chronischen Entzündungsprozesses im Magenepithel erkennt und bindet, korreliert ebenfalls mit Kolonisierung von *H. pylori* und dessen Virulenz.

Darüber hinaus sind die genannten Virulenzfaktoren an der Induktion der für die *H. pylori*-Infektion charakteristischen Immunantwort beteiligt, die sich insbesondere als chronische Gastritis manifestiert.

Neben dem symptomatischen Verlauf der Infektion bei 20 % der Patienten gibt es aber auch positive Begleiterscheinungen, wie z.B. Hinweise auf einen Schutz vor GERD (gastroesophageal reflux disease) durch eine Infektion mit *H. pylori*. Dies kann durch die Modulation der Magensäureproduktion erklärt werden (Peek and Blaser, 2002). In den letzten Jahren wird ebenfalls ein möglicher Schutz vor Durchfallerkrankungen und Asthma diskutiert.

## **1.2 Interaktionen zwischen dem Immunsystem und *Helicobacter pylori***

Die Immunantwort auf eine Infektion durch *Helicobacter pylori* wird sowohl über das angeborene als auch über das spezifische Immunsystem aktiviert. Das Verhältnis zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort hat entscheidend Einfluss auf den klinischen Verlauf der Infektion. Die chronische Entzündungsreaktion der Magenschleimhaut ist gekennzeichnet durch eine starke Th1-Antwort. Diese ist entscheidend für den weiteren Verlauf der Erkrankung, denn sie scheint eine Voraussetzung

für die Entstehung der *H. pylori*-bedingten Magenkarzinome zu sein (Fox, 2002). Die individuelle Ausprägung der Immunantwort auf die Infektion ist abhängig von genetischen Polymorphismen, die die Expression von Zytokinen oder Rezeptoren beeinflussen. Somit reagiert jeder Patient anders auf die Infektion.

### 1.2.1 Angeborene und spezifische Immunantwort

Das angeborene Immunsystem wird durch pathogen-assoziierte, molekulare Muster (PAMPs) aktiviert. Diese werden durch membranständige Toll-like Rezeptoren (TLRs), einer wichtigen Rezeptorfamilie der angeborenen Immunantwort unter anderem auf Antigen präsentierte Zellen (APCs) des Wirtes, erkannt. Dies hat die Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8) zur Folge. Während bei den meisten anderen pathogenen Keimen der TLR-4 vermittelten Erkennungen des bakteriellen LPS eine Schlüsselrolle zukommt, besitzt *H. pylori* kaum immunaktives LPS (wenig TLR-aktiv). Diese untergeordnete Rolle des TLR-4 konnte auch durch die Zugabe neutralisierender TLR-4 Antikörper auf infizierte AGS-Zellen gezeigt werden, durch die keine Reduktion der Ausschüttung von IL-8 erzielt wurde (Su et al., 2003). Die Erkennung erfolgt hingegen überwiegend mittels TLR-2 und TLR-9 und ist MyD88-abhängig. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung durch TLR-2 und der MyD88-Signalkaskade in B-Zellen einer T-Zell-Aktivierung entgegenwirkt (Sayi et al., 2011). Verglichen mit anderen Erregern spielt der Effekt der TLR-abhängigen Aktivierung der angeborenen Immunantwort nur eine geringe Rolle. Jedoch konnten verschiedene TLR Polymorphismen gefunden werden, die zu einer verstärkten Immunantwort und damit zu einer starken Entzündungsreaktion führen. Diese starke Reaktion wird auch mit der Entstehung von Magenkarzinomen in Verbindung gebracht (El-Omar et al., 2008).

Zusätzlich zur Aktivierung durch TLRs spielen cytosolische Nukleotid Oligomerisierungsdomänen (NOD) ähnliche Rezeptoren (NLRs) eine wichtige Rolle (Franchi et al., 2009). Durch die Adhäsion des Keims findet eine Übertragung verschiedener bakterieller Proteine (z. B. des bereits erwähnten CagAs) und Peptidoglykane mittels Typ IV- Sekretionssystem (T4SS) in die Epithelzelle statt (Odenbreit, 2000). Nach der Erkennung verschiedener Peptidoglykane durch NOD-1 (intrazellulär) bzw. NOD-2 (extrazellulär) wird eine Signalkaskade durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und verschiedener MAPKs induziert, welche in einer erhöhten IL-8-Sekretion resultiert (Sharma et al., 1998). In einer kürzlich

veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass neben der T4SS-induzierten Translokation der Peptidoglykane auch eine T4SS-unabhängige Erkennung durch NOD-1 möglich ist. Hierbei konnten extrazelluläre Membranvesikel eines *cagPAI* *H. pylori*-Stamms eine angeborene Immunantwort hervorrufen (Allison et al., 2009).

Neben der angeborenen Immunantwort induziert *H. pylori* auch eine adaptive Immunreaktion. Der Keim besitzt verschiedene Antigene, die nach Phagozytose der Bakterien durch Makrophagen präsentiert werden und so zu einer T-Zell-Aktivierung führen. Daraus resultiert eine erhöhte Sekretion der inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, sowie TNF- $\alpha$  und IL-8. Induziert durch die chronische Gastritis, die bei allen *H. pylori*-Patienten auftritt, wandert eine große Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in die Lamina Propria. Es findet eine Th1/Th17-dominierte Immunreaktion statt, die sich durch die Sekretion der proinflammatorischen Zytokinen IL-12, IL-18 und TNF- $\alpha$  (Tummala et al., 2004) sowie der Aktivierung von IFN- $\gamma$  auszeichnet. Zusätzlich beeinflusst auch die Expression von IL-1 $\beta$  die inflammatorische Reaktion auf die *H. pylori*-Infektion. Für das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$ , welches bei der *Helicobacter*-Infektion hochreguliert ist, sind drei Polymorphismen (-511, -31, +3954, jeweils ein C-T Austausch) bekannt, die vermutlich zu einer erhöhten Expression von IL-1 $\beta$  führen (El-Omar et al., 2000). Weiterhin ist für das *IL-1RN* Gen eine Region von 86 bp tandem repeats (VNTR) in Intron 2 beschrieben, von denen das Allel 2 mit verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen assoziiert ist. In einer Studie konnte eine Assoziation zwischen den *IL-1B* -31, -511 und *IL-1RN2* Allelen mit einer verminderten Säuresekretion und gleichzeitig erhöhtem Risiko für Magenkarzinome gezeigt werden (Taniguchi et al., 1995). Dies lässt auf eine besondere genetische Anfälligkeit bei einigen Infizierten schließen (Rad et al., 2004). Eine andere Studie beschrieb eine Assoziation des TNF $\alpha$  a3-Allels mit Magenkarzinomen in einem japanischen Kollektiv (Knipp et al., 1993). In dieser Studie wurde jedoch der *Helicobacter*-Status nicht untersucht bzw. miteinbezogen. Zusätzlich zur Th1-Antwort spielen auch regulatorische T-Zellen (Tregs, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) und IL-10 sekretierende Tr1-Zellen eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Persistenz des Keims (Raghavan and Holmgren, 2005). In diesen Studien konnte eine CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup>T-Zell (Treg)-Aktivierung durch *H. pylori* mit einer verstärkten Kolonisierung des Keims korreliert werden. Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen modulierenden Faktoren wie z. B. Polymorphismen mit erhöhter IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  oder gesenkter IL-10 Expression und einem erhöhten Magenkrebsrisiko gezeigt werden

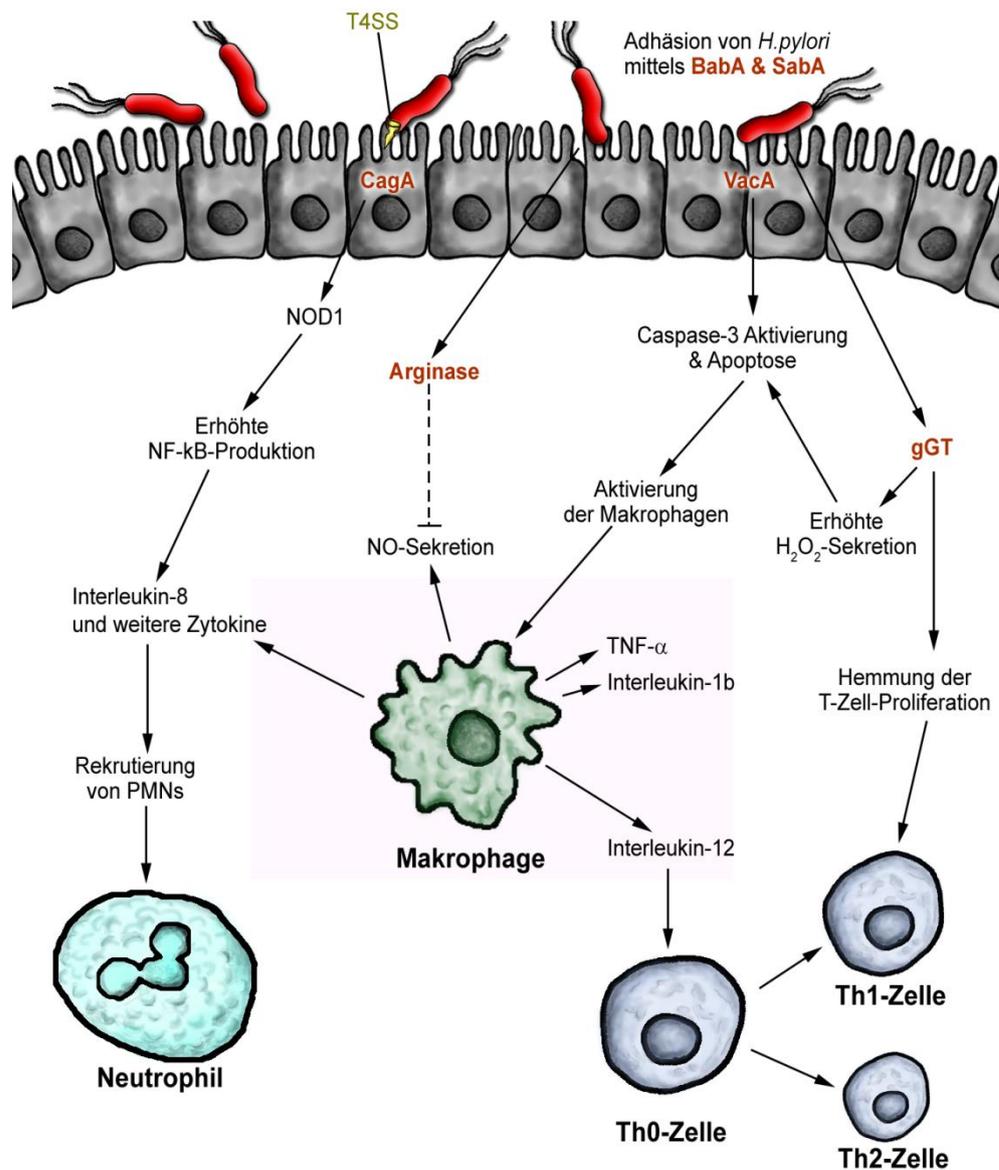
(El-Omar et al., 2003; Togawa et al., 2005). Hierbei hemmen die aktivierten Tregs die T-Zell-Antwort durch eine erhöhte Sekretion von IL-10 und TFG- $\beta$ .

### 1.2.2 Immunevasion

*H. pylori* schafft es trotz inflammatorischer Immunantwort, lebenslang in der menschlichen Mukosa zu persistieren. Eine wichtige Voraussetzung für diese chronische Infektion stellt die Evasion des Keims vor dem Immunsystem dar (siehe Abbildung 3). Neben der bereits beschriebenen initialen Reduktion der Immunantwort hat der Keim verschiedene Strategien zur Immunevasion entwickelt. Die Hauptaktivierung der angeborenen Immunantwort erfolgt, wie bereits im Abschnitt der angeborenen Immunantwort beschrieben, durch TLRs und die Erkennung pathogen-assoziiertes Muster (PAMPs). Jedoch hat *H. pylori* einige Mechanismen entwickelt, um diese Aktivierung zu umgehen bzw. abzuschwächen. Unter anderem verhindert die Adaptation des bakteriellen Flagellums eine Erkennung durch TLR5, der hohe Methylierungs-Grad der DNA die Aktivierung von TLR9, und schwächt die Wirtsadaptation durch Variation der Glykosylierung-Muster des LPS eine TLR4-Aktivierung ab (Khamri et al., 2005). Verglichen mit LPS anderer Bakterien induziert das *H. pylori*-LPS eine 1000fach geringere Makrophagen-Aktivierung.

Ein weiterer beschriebener Mechanismus ist die Nachahmung Plasminogen-bindender Proteine (PgbA & B). Durch die Bindung des Plasminogens und der damit verbundenen Aktivität kann der Keim verschiedene extrazelluläre Matrixproteine des Wirts prozessieren und so eine Rekonstitution und Erholung der durch die Entzündung betroffenen Epithelregion verhindern (Jonsson et al., 2004).

Ebenfalls eine wichtige Rolle für die Immunevasion des Keims spielt die Sekretion verschiedener Faktoren, z. B. von VacA, Arginase oder der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (gGT). VacA vermittelt eine Immunsuppression durch die Beeinflussung von Antigen-präsentierenden und T-Zellen. Insbesondere der apoptotische Effekt auf die T-Zellen muss hier hervorgehoben werden (Gebert et al., 2003). Durch die Arginase wird die NO-Produktion als antibakterielles Agens der Makrophagen durch den Entzug des Substrats L-Arginin unterbunden (Gobert et al., 2001b). Auf den Effekt der gGT wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.



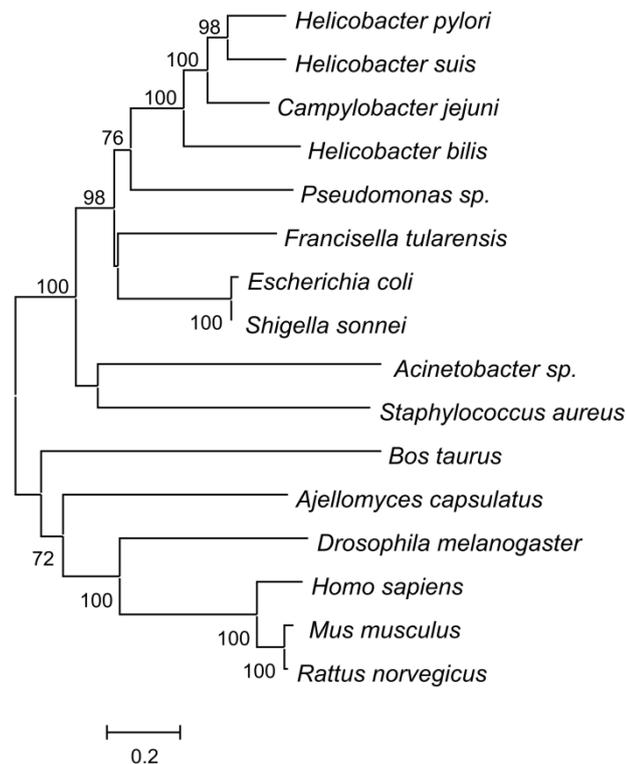
**Abbildung 3:** Interaktionen zwischen Wirt und *H. pylori* und Darstellung der immuneskapitiven Strategien des Keims (adaptiert von Suerbaum and Michetti, 2002).

### 1.3 $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (gGT)

#### 1.3.1 Funktion und Vorkommen der gGTs

$\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen (gGT; EC 2.3.2.2) werden sowohl in eukaryotischen als auch in einigen prokaryotischen Organismen gefunden und besitzen oftmals Homologien in der Aminosäure-Sequenz von über 25 %. Bei den prokaryotischen Vertretern finden sich auch pathogene Erreger wie z. B. *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* oder *Francisella tularensis* (siehe Abbildung 4). Als wichtigste physiologische Substrate der gGT in

Säugetieren fungieren Glutathion und dessen Konjugate. Das Enzym katalysiert in einer Transpeptidierungsreaktion die Übertragung einer glutamyl-Gruppe zwischen Substraten wie z.B. Glutathione (GSH) oder dessen S-Konjugate durch Hydrolyse der  $\gamma$ -Glutamyl-Bindung auf Akzeptoren, wie z. B. Aminosäuren, Peptide (Transpeptidierung) oder Wasser (Hydrolyse) (Meister et al., 1981). Die bakteriellen gGTs werden in das Periplasma bzw. in den extrazellulären Raum sekretiert. In Pflanzen finden sich gGTs in Apoplast bzw. Vakuolen und in Säugetieren liegen gGTs membrangebunden vor.



**Abbildung 4:** Phylogenetischer Evolutionsbaum der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen; der phylogenetische Baum wird unter Einbeziehung der berechneten Evolutionsentfernungen abgeleitet. Zur Berechnung der Evolutionsentfernungen wurde als Einheiten die Zahl der Aminosäure-Substitutionen benutzt. Die Entwicklungsanalysen wurden in MEGA5 durchgeführt (Tamura et al., 2011).

Es handelt sich bei der gGT um ein Mitglied der Familie der Ntn (N-terminale nukleophile)-Hydrolasen. Wie alle Mitglieder dieser Familie werden auch die gGTs posttranslational autokatalytisch aktiviert, wodurch aus dem inaktiven Vorläufer-Protein (~60 kDa) ein Heterodimer, bestehend aus einer kleinen (~20 kDa) und einer großen (~40 kDa) Untereinheit, entsteht. Die aktivierte gGT besitzt, wie alle Ntn-Hydrolasen, eine zentrale homologe  $\alpha\beta\alpha$ -Kernstruktur (Brannigan et al., 1995). Neben dieser konservierten sekundären Struktur finden sich auch Übereinstimmungen in den für die Katalyse wichtigen Aminosäure-Resten, z. B. dem N-terminalen Nukleophil, bzw. den für die Bildung des Oxyanion-Lochs verantwortlichen Aminosäuren.

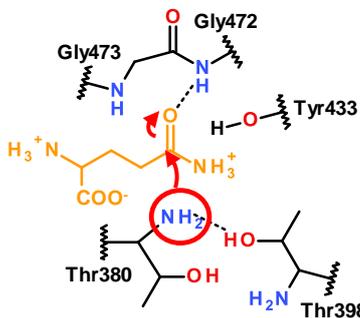


Es ist außerdem beschrieben, dass gGTs Bakterien ermöglichen, extrazelluläres GSH als Cystein-Quelle zu nutzen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *Francisella tularensis* ΔgGT-Stämme eine stark verminderte Kolonisierung und somit reduzierte Virulenz in Mäusen aufweisen (Alkhuder et al., 2009).

Aus diesem Grund ist die gGT ein interessantes Zielprotein für die Entwicklung sowohl von Antiinfektiva gegen Bakterien als auch als Ansatzpunkt für ein Krebstherapeutikum im Menschen.

### 1.3.2 *Helicobacter pylori* $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (HpgGT)

Die gGT konnte bislang in allen isolierten *H. pylori*-Stämmen nachgewiesen werden, ist konstitutiv exprimiert und hoch konserviert (Wachino et al., 2010).



**Abbildung 6:** Mechanismus des nukleophilen Angriffs im aktiven Zentrum der HpgGT.

Für die enzymatische Katalyse findet, wie bei den bereits erwähnten gGTs anderer Spezies, auch bei der HpgGT im aktiven Zentrum ein nukleophiler Angriff statt (Abbildung 6). Das Thr380 greift hierbei an der  $\gamma$ -glutamyl-Amidbindung an. Dieser Angriff wird durch Thr398, welches eine Thr-Thr-Dyade bildet, stabilisiert. Das daraus resultierende, tetraedrische Intermediat wird durch die Reste Gly472 & Gly473, die ein Oxyanion-Loch bilden, stabilisiert. Im nächsten Schritt kann nun H<sub>2</sub>O bzw.

der Akzeptor an den  $\gamma$ -Glutamylrest binden und das Produkt wird freigesetzt (Boanca et al., 2006b). Die nukleophil-aktive Funktion von Thr380 wird erst durch die Autoprozessierung des inaktiven Vorläufer-Proteins am N-Terminus der kleinen Untereinheit erzeugt.

Zur Funktion der gGT sind verschiedene Hypothesen in der Literatur beschrieben, die genaue Funktion ist aber bislang unklar. Physiologisch kann u. a. das Enzym HpgGT durch seine katalytische Aktivität dafür sorgen, dass extrazelluläres Glutamin und Glutathion zu Glutamat umgewandelt wird, welches über einen Na<sup>+</sup>/Glu-Symporter von dem Bakterium aufgenommen werden kann. Glutamat wird dabei für den Tricarbonsäurezyklus zur Energiegewinnung oder in der Glutamin-Synthese zur Weiterverarbeitung benötigt (Leduc et al., 2010; Shibayama et al., 2007). Zusätzlich wird *in vitro* durch den Entzug des GSHs aus der Umgebung der Bakterien oxidativer Stress für umliegende Zellen erzeugt. Es kommt zu einer Erhöhung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion, welche in DNA-Schädigung, der Hochregulierung von IL-8 und der Aktivierung von NF- $\kappa$ B resultiert (Gong et al., 2010). Zusätzlich kommt

es zu einer erhöhten Expression der Wachstumsfaktoren EGF und COX-2 (Busiello et al., 2004).

Wie bereits erwähnt, induziert die von *H. pylori* sezernierte gGT in Abhängigkeit von ihrer katalytischen Aktivität einen Zellzyklusarrest in Lymphozyten. Dieser Zellzyklusarrest ist Folge einer Dephosphorylierung des Retinoblastoma-Genproduktes Rb sowie einer Deregulierung der Cycline D3, A und E, und einer Hochregulation von p27/Kip (Schmees et al., 2007). Die HpgGT-vermittelte Zellzyklusblockade muss in den Ablauf der Antigen-induzierten Aktivierung und konsekutiven Proliferation von T-Zellen eingeordnet werden: Die Aktivierung des T-Zell- Rezeptors (TCR) und ko-stimulatorischer Rezeptoren (CD28, ICOS) führt über verschiedene Adaptermoleküle unter Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-HydroxyKinase (PI3K/Akt) Signalweges zur Aktivierung von NFAT, welcher zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren (NFκB, AP1) die Transkription von Zielgenen – insbesondere IL-2 – aktiviert und zur Destabilisierung von p27 und Zellzyklusprogression führt (Lenferink et al., 2001). Eine Hemmung dieser Signalwege kann auf diversen Ebenen zur Induktion eines Zellzyklusarrests der Lymphozyten führen. Es gibt Hinweise, dass es unter dem Einfluss der HPgGT-Aktivität zu einer Hemmung von ras/raf/erk und c-myc kommt (Schmees et al., 2007). Der Ras-raf Signalweg steuert die Zellzyklusprogression über Regulation der Cycline D3, A und E als auch p27 und p21, wobei c-myc eine zentrale Rolle zukommt. Neben der Beeinflussung des Signalweges wird auch die Depletion des Glutamins als Ursache für die Hemmung diskutiert (Leduc et al., 2010). Der genaue Mechanismus der Zellzyklusblockade wurde jedoch bislang nicht vollständig aufgeklärt. Eine proliferationshemmende Wirkung der gGT gegenüber Lymphozyten wurde bisher in keiner Spezies beschrieben. Sollte sich diese Spezifität bestätigen, würde dies darauf hinweisen, dass die gGT von *H. pylori* im Laufe der Evolution eine neue (Substrat-) Spezifität erlangt hat, die eine neue Funktionalität dieses Enzyms bedingt.

Durch diesen Effekt lassen sich auch die Ergebnisse einer Studie interpretieren, bei der ΔgGT-Mutanten im Mausmodell verglichen mit Wildtyp *H. pylori*-Stämmen eine deutlich geringere Kolonisierung des Magens erzielten (McGovern et al., 2001). Hinweise auf die entscheidende Rolle der Interaktion von HpgGT mit der Immunantwort im Magen wurde durch die Kolonisierung der ΔgGT Mutanten in Rag<sup>-/-</sup> erhalten (F. Anderl, nicht publizierte Daten). In einem ähnlichen Versuchsaufbau konnte gezeigt werden, dass die Cholesterol-alpha-Glucosyltransferase (CHLαGcT) über eine Hemmung der Phagozytose und T-Zell-Aktivierung zur Persistenz der Infektion beiträgt. Während in Wildtyp-Mäusen das Enzym

für eine erfolgreiche Kolonisierung notwendig war, konnten T-Zell-defiziente Rag<sup>-/-</sup>-Mäuse auch von CHL $\alpha$ GcT -defizienten *H. pylori*-Stämmen infiziert werden (Wunder et al., 2006).

Aufgrund der essentiellen Rolle der HpgGT für den Keim bei der Kolonisierung durch *H. pylori* und der Konservierung des Enzyms, stellt dies ein interessantes Ziel zur Entwicklung neuer Antiinfektiva dar.

#### 1.4 Ziel der Arbeit

Die zunehmenden Antibiotika-Resistenzen schränken die Therapiemöglichkeiten von *H.pylori*-Infektionen immer weiter ein, wobei die Entstehung von Kreuzresistenzen als besonders problematisch anzusehen ist. Hieraus ergibt sich ein steigender Bedarf an Spezies-spezifischen Antiinfektiva.

Ziel dieser Arbeit war es, solche neuartigen Substanzen für die *H. pylori*  $\gamma$ -Glutamyl-transpeptidase (gGT) zu identifizieren. Zunächst sollten durch die Untersuchung des katalytischen Zentrums der HpgGT Erkenntnisse über den Wirkmechanismus des Proteins und dessen Rolle als Virulenzfaktor erhalten werden. Durch die enzymatische Charakterisierung und die Analyse der Unterschiede verschiedener gGTs sollte auch der proliferationshemmende Effekt auf die T-Zellen studiert werden. Schließlich sollte durch rationale Mutagenese das katalytische Zentrum näher charakterisiert werden.

Darauf aufbauend sollten, ausgehend von bereits bekannten gGT-Inhibitoren, welche zumeist gegen die humane gGT entwickelt wurden, durch *In Silico* Screenings neue inhibitorische Substanzen identifiziert und so die Grundlagen zur Entwicklung spezifischer Antiinfektiva geschaffen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme, Zelllinien und Plasmide

##### *Expressionsstämme:*

**BL21 (DE3)** (Studier and Moffatt, 1986)

F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>), *dcm*, *gal*,  $\lambda$ (DE3)

DE3 Stämme tragen eine chromosomale Kopie des T7 RNA Polymerase-Gens, welches durch den lacUV5 Promotor kontrolliert wird. BL21 (DE3) Zellen besitzen eine Defizienz in den Lon- und ompT-Proteasen, die zu erhöhten Ausbeuten von intakten rekombinaten Proteinen führt.

**Arctic Express (DE3)** (Ferrer et al., 2004)

F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>), *dcm*, *gal*,  $\lambda$ (DE3), *endA*, Hte [*cpn10cpn60* Gent<sup>r</sup>], Tet<sup>r</sup>

Dieser Stamm koexprimiert die Kälte-angepassten Chaperonine Cpn10 and Cpn60 von *Oleispira antarctica*. Cpn10 und Cpn60 chaperonine besitzen eine Homologie von 74 % und 54 % Identität zu *E. coli* GroEL und GroES und zeigen hohe Protein Rückfaltungsaktivität bei 4 – 12°C.

##### *Klonierungsstämme:*

**DH5 $\alpha$**  (Hanahan, 1983)

$\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>), *supE44*, *relA1*, *deoR*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169, *phoA*

**XL1Blue** (Stratagene, La Jolla USA)

*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>), *supE44*, *relA1*, *lac* [F<sup>+</sup>, *proAB* *lacI<sup>q</sup>* $\Delta$ M15::*Tn10* (tet<sup>R</sup>)]

##### *Zelllinien:*

**Jurkat** (Schneider et al., 1977; ATCC Nummer: TIB-152)

Diese leukämische Zelllinie leitet sich von einem T-Zell-Klon eines Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie ab. Jurkat-Zellen wachsen in Kultur nicht adhärent und haben ein globuläres Erscheinungsbild. Während des Wachstums bilden sich Proliferationsinseln aus, worin Zellen traubenartig zusammenhängen. Selbst nach

einer hohen Anzahl an Passagen ( $> 100$ ) kann eine gute Proliferation beobachtet werden. Die optimale Dichte im Kulturmedium liegt bei ca.  $5 \times 10^5$  Zellen/ml.

**Hep G2** (Knowles et al., 1980; ATCC Nummer: HB-8065)

Diese adhärenzte, immortale Zelllinie wurde initial aus Leber-Gewebe mit differenziertem hepatozellulären Karzinom gewonnen. Hep G2-Zellen verhalten sich morphologisch epithelial und werden in Zellkultur bis zu einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml angezogen. Neben der Sekretion verschiedener Plasmaproteine (Albumin, Transferrin und Plasminogen) enthält diese Zelllinie auch die humane gGT. In Literatur wurde diese Zelllinie bereits für die Isolation von humaner gGT verwendet.

**Huh-7** (Nakabayashi et al., 1982), aus Arbeitsgruppe Prof. Ebert, TU München

Diese ebenfalls adhärenzte, immortale Zelllinie leitet sich ähnlich der Hep G2-Zelllinie aus einem differenzierten hepatozellulären Karzinom ab und wurde 1982 durch Nakabayshi & Sato etabliert. Die Huh-7 Zelllinie produziert ebenfalls die humane gGT und wurde ebenfalls für die native Reinigung in dieser Arbeit verwendet.

**Plasmide:**

**pET Vektoren** (Studier et al., 1990) (NOVAGEN, Bad Soden)

Die Transkription von Genen innerhalb der multiplen Klonierungsstelle (MCS) in pET-Vektoren (NOVAGEN, plasmid for expression by T7 RNA Polymerase) erfolgt durch die RNA-Polymerase des Phagen T7. Die Transkription vom T7-Promotor steht unter der Kontrolle eines Lac-Operators. Die Expression der chromosomal kodierten Polymerase selbst erfolgt unter der Kontrolle eines lacUV5-Promotor-Operators und wird, ebenso wie die des klonierten Gens, durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Der dadurch inaktivierte Lac-Repressor ist auf dem Plasmid kodiert.

**pASK-IBA5plus**, aus Arbeitsgruppe Prof. Skerra, TU München

Der Vektor pASK-IBA5plus beinhaltet als Selektionsmarker das Ampicillin-Resistenzgen *ampR* und einen *upstream* der MCS gelegenen *Strep*-tag. Für die Klonierungen wurden die Restriktionsschnittstellen *NarI* und *HindIII* verwendet, wobei das nach Expression erhaltene Protein den N-terminal fusionierten *Strep*-tag enthielt. Die Proteinexpression steht in diesem Vektor unter der direkten

Transkriptionskontrolle des *tet*-Promotors (Skerra, 1994), welcher im Vergleich zum T7-Promotor-System eine deutlich geringere Basalsynthese des Proteins aufweist.

**E033**, aus Arbeitsgruppe Prof. Gerhard, TU München

Der in unserer Arbeitsgruppe durch Behnam Kalali hergestellte Vektor leitet sich von einem pCag-Venus-Vektor (aus Arbeitsgruppe Prof. Lickert, Helmholtzzentrum München) ab. Die Proteinexpression steht unter der Kontrolle eines *cag*-Promotor-Operators, welcher konstitutive in eukaryotischen Zellen aktiviert ist. Direkt nach der MCS befindet sich der über 2A fusionierte Fluoreszenzfarbstoff Venus (Nagai et al., 2002). Hierbei handelt es sich um eine verbesserte Variante des Yellow fluorescent protein (YFP) mit Absorbtion bei 515 nm und Emission bei 528 nm. 2A ist ursprünglich eine Peptidsequenz, welche erstmals im Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV) identifiziert wurde. Diese Sequenz führt zu einem kurzfristigen Lösen des Ribosoms und zur Unterbrechung der Transkription (Szymczak et al., 2004). Hierdurch ist es möglich, getrennte Proteine aus einem ORF zu produzieren. Der Vektor enthält zusätzlich als Selektionsmarker das Ampicillin-Resistenzgen *ampR* und das Puromycin-Resistenzgen *puroR* für die Herstellung stabiler Klone in eukaryotischen Zellen.

### 2.1.2 Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide für Sequenzierung

Alle hier aufgeführten Primer wurden durch die Firma MWG Eurofins synthetisiert

3' AOX	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
5' AOX	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
HpgGT_screen_f	5'-TGATTAATAAAGCGTATGCCAAAAAG-3'
HpgGT_screen_r	5'-CGGGCATGCCAAACTTTTCAAT-3'
HsgGT_int_r	5'-GCATTCATGAGCCCCACACA-3'
pASK_f	5'-CTCCCTATCAGTGATAGAGA-3'
pASK_r	5'-GCGGTAAACGGCAGAC-3'
pCAG_f	5'-GCAACGTGCTGGTTATTGTG-3'
pDONR_f	5'-TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC-3'
pDONR_r	5'-GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3'
pEGFP_r	5'-CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG-3'

pQE_f	5'-GTATCACGAGGCCCTTTCGTCT-3'
pQE_r	5'-CATTACTGGATCTATCAACAGGAG-3'
SP6	5'-CATTTAGGTGACACTATAG-3'
T7-prom	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7-term	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

### Oligodesoxynukleotide für Mutagenese und PCR

**Tabelle 1:** PCR-Primer; grau-markierte Bereiche in Mutations-Primern zeigen veränderte Codons, wobei ausgetauschte Nukleotide unterstrichen sind.

Name	Zielgen	Vektor	RE	Primer Sequenz 5'→3'	Produkt -größe
<b>gGT Primer</b>					
CjgGToS_f	CjgGT	pET30b	<i>NdeI</i>	AACATATGGCTAATCCACCTATACAAGAT	1633
CjgGT_r	CjgGT	pET30b	<i>XhoI</i>	TTCTCGAGGAATTCCTTTCTGTATCCATA G	
EcgGTFull_f	EcgGT	pET30b	<i>NdeI</i>	AACATATGATGATAAAACCGACGTTTTTA CGTT	1852
EcgGToS_f	EcgGT	pET30b	<i>NdeI</i>	AACATATGGGAAGTTGTTTTAGCGCCGC	1801
EcgGT_r	EcgGT	pET30b	<i>XhoI</i>	TTCTCGAGGTACCCCGCGTTAAATCAT	
FtgGToS_f	FtgGT	pET30b	<i>NdeI</i>	AACATATGACAGGTTATGGTTTTATTCTT ATTCA	1681
FtgGT_r	FtgGT	pET30b	<i>XhoI</i>	TTCTCGAGATAACCTATAGCTAATGCGCT AG	
HpgGTFull_f	HpgGT	pET30b	<i>NdeI</i>	AACATATGAGACGGAGTTTTTTGAAAA	1716
HpgGToS_f	HpgGT	pET30b	<i>NdeI</i>	CATATGGCTAGTTACCCCCCATTAAAAA C	1638
HpgGT_r	HpgGT	pET30b	<i>XhoI</i>	CTCGAGTAAAAATTCCTTTCCTGGATCCG TTG	
HsgGT_oM_f	HsgGT	EO33	<i>NotI</i>	GCGGCCGCATGGCTAGCTGGAGCCAC	1676
HsgGT_r	HsgGT	EO33	<i>AscI</i>	GGCGCGCCGTA GCCGGCAGGCTCC	
HsgGT_oM_p_f	HsgGT	pASK- IBA5plus	<i>NarI</i>	CTGCCCGCGCCTCCAAGGAACCTGAC	1633
HsgGT_p_r	HsgGT	pASK- IBA5plus	<i>HindIII</i>	CAGGTCAAGCTTAGTAGCCGCAAGGCTCC	
<b>Mutationsprimer HpgGT</b>					
T380A_f	HpgGT	-	-	GGAGCAATGCCACGCATTATTCTGT	
T380A_r	HpgGT	-	-	ATAATGCGTGGCATTGCTCCCC	
T380S_f	HpgGT	-	-	GGAGCAATGCCACGCATTATTCTGT	
T380S_r	HpgGT	-	-	ATAATGCGTGGAAATTGCTCCCC	
T380V_f	HpgGT	-	-	GGAGCAATGTGACGCATTATTCTGTAG	

T380V_r	HpgGT	-	-	AATGCGT <u>CAC</u> ATTGCTCCCCTCATG	
E419A_f	HpgGT	-	-	AACAAT <u>GCA</u> ATGGATGATTTTTCC A	
E419A_r	HpgGT	-	-	ATCCATT <u>GCA</u> TGTTCAATAAAAAATC	
E419N_f	HpgGT	-	-	TGAACAATA <u>AAT</u> ATGGATGATTTTTCCATC	
E419N_r	HpgGT	-	-	CCATA <u>ATT</u> ATTGTTCAATAAAAAATCCTGCC	
E419Q_f	HpgGT	-	-	TGAACAAT <u>CAA</u> ATGGATGATTTTTCCATC	
E419Q_r	HpgGT	-	-	CATCCATTT <u>GAT</u> TGTTCAATAAAAAATCCT	
Y433A_f	HpgGT	-	-	CCAATCT <u>CGT</u> GGTTTAGTAGGG G	
Y433A_r	HpgGT	-	-	CTAAACCA <u>GCG</u> AGATTGGGATTCCC	
S451A_f	HpgGT	-	-	CCCTTTA <u>GCT</u> CCATGTCGCCTA	
S451A_r	HpgGT	-	-	GACGTGGA <u>GGC</u> TAAAGGGCGC	
S451/452A_f	HpgGT	-	-	GCCCTTTA <u>GCCG</u> CCATGTCGCCTAC	
S451/452A_r	HpgGT	-	-	GCGACAT <u>GGCG</u> GCTAAAGGGCGCTT	
P471A_f	HpgGT	-	-	GGAAGC <u>GCT</u> GGA GGGTCTAGG	
P471A_r	HpgGT	-	-	CCTCCAG <u>GCT</u> TCCCAACCACC	

### 2.1.3 Enzyme und Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Promega bzw. New England BioLabs bezogen und bei -20°C gelagert. Die Enzyme wurden nach Vorgaben des Herstellers bezüglich der Reaktionstemperatur und der Pufferkompatibilität eingesetzt. Alle verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 2 aufgelistet.

In Tabelle 3 und 4 sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet.

**Tabelle 2:** Restriktionsenzyme, welche in dieser Arbeit verwendet wurden

Name	Schnittstelle	Quelle
<i>AscI</i> (10 U/ $\mu$ l)	GG▼CGCGCC CCGCGC▲GG	<i>Arthrobacter</i>
<i>BamHI</i> (10 U/ $\mu$ l)	G▼GATCC CCTAG▲G	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>EcoRV</i> (10 U/ $\mu$ l)	GAT▼ATC CTA▲TAG	<i>Escherichia coli</i>
<i>HindIII</i> (10 U/ $\mu$ l)	A▼AGCTT TTCGA▲A	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>NarI</i> (5 U/ $\mu$ l)	GG▼CGCC CCGC▲GG	<i>Nocardia argentinensis</i>

<i>NdeI</i> (10 U/ $\mu$ l)	CA▼TATG GTAT▲AC	<i>Neisseria denitrificans</i>
<i>NotI</i> (10 U/ $\mu$ l)	GC▼GGCCGC CGCCGG▲CG	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>
<i>XhoI</i> (10 U/ $\mu$ l)	C▼TCGAG GAGCT▲C	<i>Xanthomonas holcicola</i>

Primäre Antikörper für Western-Blot Analysen:

**Tabelle 3:** Primäre Antikörper

Name	Verwendete Verd.	Hersteller
Anti-Histidine tag (mouse)	1:2000	AbD Serotec (MCA 1396)
Anti- <i>StrepII</i> tag HRP	1:3500	IBA

Sekundäre Antikörper für Western-Blot Analysen:

**Tabelle 4:** Sekundäre Antikörper

Name	Verwendete Verd.	Hersteller
Anti-mouse IgG (H&L) HRP	1:2500	Promega W402B
Anti-rabbit IgG (H&L) HRP	1:2500	Promega W401B

#### 2.1.4 Nährmedien, Lösungen, Puffer und Antibiotika

**Nährmedien:** Zur Sterilisation wurden die Medien zwanzig Minuten bei 121°C und zwei Bar autoklaviert. Bei Selektivmedien wurden die entsprechenden Antibiotika nachträglich in Form von sterilfiltrierten, tausendfach konzentrierten Stammlösungen zugegeben.

##### *Luria-Bertani-(LB)-Medium*

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) NaCl

##### *SOB-Medium*

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

2 % (w/v) Trypton

0,05 % (w/v) NaCl

Nach dem Autoklavieren wurden 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 2,5 mM KCl hinzugefügt.

### ***Agarplatten***

Den entsprechenden Nährmedien wurde 1,5 % (w/v) Bacto-Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

### ***Lösungen und Puffer:***

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Lösungen und Puffer sterilfiltriert und bei RT gelagert. Es wurde MILLIPORE Wasser (Qualitätsstufe Typ III) verwendet.

#### ***Agarose 1 %***

1 % (w/v) Agarose wurden in 0,5 % TAE aufgekocht. Die Lagerung erfolgte bei 50°C.

#### ***Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Stammlösung (10 %)***

100 mg/ml Ammoniumperoxodisulfat wurden in H<sub>2</sub>O gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

### ***Antibiotika-Stammlösungen***

#### ***Ampicillin-Stammlösung***

Es wurden 100 mg/ml Na<sup>+</sup>-Ampicillinsalz in H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

#### ***Chloramphenicol-Stammlösung***

Es wurden 25 mg/ml Chloramphenicol in EtOH gelöst und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

#### ***Kanamycin-Stammlösung***

Es wurden 25 mg/ml Kanamycinsulfat in Wasser gelöst und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

#### ***Puromycin-Stammlösung***

Es wurden 1 mg/ml Puromycin in Wasser gelöst und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### ***Streptomycin-Stammlösung***

Es wurden 100 mg/ml Streptomycin in Wasser gelöst und steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

#### ***Anhydrotetracyclin (aTc) Stammlösung***

2 mg/ml in DMF (Einsatz einer 1:10<sup>4</sup>000 Verdünnung)

**AX 100 Kit- Puffer***S1-Puffer (Resuspendierungspuffer)*

50 mM Tris/HCl, pH 8.0

10 mM EDTA

100 µg RNase A

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

*S2-Puffer (Zellaufschlusspuffer)*

200 mM NaOH

1 % SDS

*S3-Puffer (Neutralisationspuffer)*

2,8 M KAc, pH 5.1

*N2 (Äquilibrationpuffer)*

100 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.3

15 % Ethanol

900 mM KCl

*N3 (Waschpuffer)*

100 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.3

15 % Ethanol

150 mM KCl

*N5 (Elutionspuffer)*

100 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.5

15 % Ethanol

1000 mM KCl

**Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung für SDS Gele**

50 % (v/v) Ethanol (96 %)

10 % (v/v) Essigsäure (100 %)

0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250

Die aufgeführten Chemikalien wurden in H<sub>2</sub>O gelöst und filtriert. Die Lösung wurde lichtgeschützt aufbewahrt.

**DNA-Probenpuffer**

50 % (v/v) Glycerin

0,1 % (w/v) Bromphenolblau

in 100 mM Tris/HCl, pH 8.0 gelöst.

**FACS-Puffer**

10 mM HEPES

150 mM NaCl

5 mM KCl

1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

1.8 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O

Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

**IPTG-Stammlösung**

Die Stammlösung wurde in einer Konzentration von 1 M angesetzt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

**Lösungen für SDS-PAGE**

*Protogel<sup>TM</sup>*

30 % (v/v) Acrylamid, 0,8 % (v/v) Bisacrylamid

*1 x SDS-PAGE Laufpuffer*

0,025 M Tris

0,2 M Glycin

0,1 % (w/v) SDS

*4 x SDS-PAGE Auftragspuffer*

40 % (w/v) Glycerin

5 % (v/v) β-Mercaptoethanol

8 % (v/v) SDS

0,004 % (w/v) Bromphenolblau

0,24 M Tris/HCl, pH 6.8

*SDS-PAGE Sammelgelpuffer*

0,4 % (w/v) SDS

0,5 M Tris/HCl, pH 6.8

*SDS-PAGE Trenngelpuffer*

0,4 % (w/v) SDS

1,5 M Tris/HCl, pH 8.8

**Lösungen für Silberfärbung**

*Fixierlösung:*

30 % Ethanol (techn.)

10 % Essigsäure

*Inkubationslösung:*

- 30 % Ethanol
- 0,5 M NaAcetat pH 6.0 (Eisessig)
- 0,5 % Glutaraldehyd
- 0,2 % Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>

*Silberfärbelösung:*

- 0,1 % AgNO<sub>3</sub>
- 0,02 % Formaldehyd

*Entwicklungslösung:*

- 2,5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 0,01 % Formaldehyd pH ~ 11.5

*Stopp-Lösung:*

- 50 mM EDTA pH 7.3

**Lösungen für Western-Blot***1x TBS:*

- 50 mM Tris pH 7.5
- 150 mM NaCl

*1x TBS-T:*

- 1x TBS
- 0.1 % Tween 20

*Blockpuffer*

- TBST
- 5 % (w/v) Magermilchpulver

*Transferpuffer*

- 20 mM Tris
- 200 mM Glycin
- 20 % Methanol

**1x PBS**

- 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4
- 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O
- 137 mM NaCl
- 2.7 mM KCl

***Propidium-Iodid (PI) Lösung***

Die Stammlösung wurde in einer Konzentration von 250 µg/ml in FACS-Puffer angesetzt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

***TAE-Puffer***

40 mM Tris

20 mM Essigsäure

1 mM EDTA

***TFB I***

100 mM KCl

50 mM MnCl<sub>2</sub>

30 mM KOAc

10 mM CaCl<sub>2</sub>

15 % (v/v) Glycerin

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von Essigsäure auf 5.8 eingestellt. 100 ml der Lösung wurden jeweils frisch hergestellt und nach Sterilfiltration sofort verwendet.

***TFB II***

10 mM Tris/HCl

10 mM KCl

75 mM CaCl<sub>2</sub>

15 % (v/v) Glycerin

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von KOH auf 7.0 eingestellt. 10 ml der Lösung wurden jeweils frisch hergestellt und sofort nach Sterilfiltration verwendet.

**2.1.5 Chemikalien, Standards und Kits**

Die verwendeten Chemikalien besaßen den größtmöglichen Reinheitsgrad und wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

AMERSHAM PHARMACIA Biotech	(Freiburg)
BIORAD LABORATORIES	(München)
BOEHRINGER MANNHEIM	(Mannheim)
FLUKA	(Neu-Ulm)
GIBCO/BRL	(Eggestein)
MERCK	(Darmstadt)
ROCHE DIAGNOSTICS	(Mannheim)

ROTH	(Karlsruhe)
SIGMA-ALDRICH	(Deisenhofen)

### 2.1.6 Geräte

#### ÄKTA-Systeme:

ÄKTA™ purifier	GE Healthcare GmbH (Freiburg)
ÄKTA™ avant 25	GE Healthcare GmbH (Freiburg)

#### Autoklaven:

Provit 2200	Holzner
-------------	---------

#### Brutschränke:

Zellkultur Inkubator, HeraCell, 240	Heraeus, Thermo Scientific
Series II Water Jacket	Forma, Thermo Scientific

#### verwendete Chromatographie-Säulen:

HisTrap FF Crude (1 & 5 ml)	GE Healthcare GmbH (Freiburg)
HiTrap IEX Selection Kit	GE Healthcare GmbH (Freiburg)
StrepTrap HP (1 & 5 ml)	GE Healthcare GmbH (Freiburg)
Superdex 75 HR 10/30	GE Healthcare GmbH (Freiburg)
Superdex 200 HR 10/30	GE Healthcare GmbH (Freiburg)
Superdex 75 HiLoad 16/60 <i>prep grade</i>	GE Healthcare GmbH (Freiburg)

#### Eismaschine

Ziegra GmbH (Isernhagen)

#### Elektrophorese-Kammern:

Agarose Elektrophorese Kammern	Bio-Rad
XCell IITM Blot Module	Invitrogen
XCell SureLock® Mini-Cell	Invitrogen

#### Elektroporator:

GenePulser Xcell™	Bio-Rad
-------------------	---------

#### Fermenter:

Bio Flo 415	New Brunswick Scientific
-------------	--------------------------

#### Geldokumentation:

Entwickler Curix60	AGFA
Laboratory Precision Scale XB120A	Precisa
UV Transilluminator, Eagle Eye Gel Doc	Bio-Rad

## Geltrocknung:

MINI-Set Geltrocknung Roth

## Heizrührer / Schüttler:

Magnetischer Heizrührer IKAMAG RET-G

Innova 2100 Plattenschüttler New Brunswick Scientific

Thermomixer compact Eppendorf

Titramax 100 Heidolph

## Kühl- &amp; Gefrierschränke:

Gefrierschrank (-20°C) Liebherr

HERAFreeze Basic (-86°C) Thermo Scientific

Kühlschrank (4°C) Liebherr

## Mikroskope:

Axiovert 40C Zeiss

mit Neubauer Zählkammer Marienfeld

Fluoreszenz Mikroskop, DMRB Leica

## Netzgeräte:

PowerPac300 Bio-Rad

PowerPac Basic (für SDS Gele) Bio-Rad

## PCR-Geräte:

T3000 Thermocycler Biometra

## pH-Meter:

inLab pH 720 WTW inoLab

## Pipetten:

Einkanalpipette, 0.5-10 µl Corning GmbH (Kaiserslautern)

Einkanalpipette, 2-20 µl Corning GmbH (Kaiserslautern)

Einkanalpipette, 20-200 µl Corning GmbH (Kaiserslautern)

Einkanalpipette, 200-1000 µl Corning GmbH (Kaiserslautern)

Multikanalpipette, 50-300µl Corning GmbH (Kaiserslautern)

## Schüttelinkubatoren:

Multitron II Infors AG

## Spektrophotometer:

LightCycler480 Roche

Mithras LB940 Berthold

NanoDrop 1000 Thermo Scientific

Orion Microplate Luminometer	Berthold
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Thermo Scientific
Ultraschallgerät:	
Sonoplus UW 2070	Bandelin
Vakuumpumpe:	
LABOPORT N811KN18	KNF Neuberger
Waagen:	
Laboratory LC 2200 S	Sartorius
XB120A	Precisa
Wasserbäder:	
Wasserbad Julabo	Julabo Labortechnik GmbH
Wasserbad	GFL
Vortex Genie 2	Schultheiss
Zentrifugen:	
Biofuge Pico Zentrifuge	Heraeus, Thermo Scientific
Biofuge Primo R Zentrifuge	Thermo Scientific
Centrifuge 5415D	Eppendorf
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Thermo Scientific
Micro 200R	Hettich
Sorvall RC 5C Plus	Sorvall Instruments
mit Rotoren SLA-1500, SLA-3000 und SS-34	

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Glaswaren sowie hitzestabile Lösungen wurden zwanzig Minuten bei 121°C und zwei Bar autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden in Stammlösungen angesetzt und je nach Volumen durch einen Membranfilter (SCHLEICHER & SCHUELL, MILLIPORE) der Porengröße 0,2 µm oder durch einen Spritzenvorsatzfilter (Minisart 0.2µm, Sartorius) sterilfiltriert.

### 2.2.2 Anzucht und Lagerung von *E. coli*-Stämmen

*E. coli*-Stämme wurden bei 37°C unter Schütteln (Multitron II Inkubationsschüttler) bei 150 bzw. 200 rpm in LB-Medium inkubiert. Bei plasmidcodierten Antibiotikaresistenzen wurde

das entsprechende Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Chlo-ramphenicol, 25 µg/ml Kanamycin) aus einer tausendfach konzentrierten Stammlösung zugesetzt.

Durch Ausplattieren der Zellsuspension auf Agarplatten und Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden Einzelkolonien angezogen. Für eine dauerhafte Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurde ein Aliquot einer ü.N.-Kultur im Verhältnis 1:1 mit 87 % Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

### **2.2.3 Herstellung hochkompetenter E. coli-Zellen zur Elektrotransformation**

Zur Herstellung hochkompetenter Zellen wurden 400 ml SOB-Medium in einem 1 l-Erlenmeyerkolben mit einer 50 ml ü.N.-Kultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 angeimpft und im Schüttler (Multitron II Inkubationsschüttler) bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,5–0,7 wurden die Zellen für dreißig Minuten bei 4°C abgekühlt, in 50 ml Aliquots aufgeteilt und für 15 Minuten bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5415D). Die Pellets wurden sukzessive mit 50 ml, 20 ml und 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Zellen wurden in 10 ml resuspendiert, in 50 µl Aliquots aufgeteilt und entweder direkt transformiert oder bei -80°C gelagert.

### **2.2.4 Transformation elektrokompenter E. coli-Zellen**

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Bio-Rad GenePulser Küvetten, 0,2 cm) überführt. Es ist unerlässlich, die zur Transformation eingesetzte DNA-Lösung (2-10 µl Ligationsansatz bzw. ~100 ng Plasmid-DNA) vorher zu entionisieren, um einen Kurzschluss zu vermeiden. Die Ligationsansätze wurden deshalb vor der Transformation auf Nitrozellulosefiltern für ein bis zwei Stunden gegen Wasser dialysiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2500 V, 25 µF, 200 Ω (Bio-Rad GenePulser Xcell™). Die Zellen wurden im Anschluss sofort in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C gekurt. Während dieser Zeit erfolgte die Ausbildung der Antibiotikaresistenz. Im Anschluss wurden die Zellen in verschiedenen Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert und ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.5 Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen

Zur Präparation von chemisch kompetenten Zellen wurden 500 ml SOB-Medium in einem 1 l-Erlenmeyerkolben mit Zellen einer ü.N.-Kultur des entsprechenden Stammes angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 – 0,7 angezogen. Die Kultur wurde für 15 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5415D, 4000 rpm, zehn Minuten, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 50 ml eiskalter TFB-I Lösung suspendiert und anschließend erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml eiskalter TFB-II Lösung aufgenommen, Aliquots von 100 µl in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und bei -80°C gelagert.

### 2.2.6 Transformation chemisch kompetenter E. coli-Zellen

Zur chemischen Transformation wurde ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und 2-10 µl Ligationsansatz bzw. ~100 ng Plasmid-DNA hinzugegeben. Nach zehn Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 45 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Nach weiteren fünf Minuten auf Eis folgte die Zugabe von 800 µl LB-Medium ohne Antibiotikum und die Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37°C für 30 – 60 Minuten. Während dieser Zeit erfolgte die Ausprägung der Antibiotikaresistenz. Anschließend wurden 100 - 200 µl der Zellsuspension in verschiedenen Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert und ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.7 Bestimmung der Transformationseffizienz

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde ein Aliquot kompetenter Zellen wie oben beschrieben mit 50 ng Plasmid-DNA transformiert. Nach einer einstündigen Kur wurden je 100 µl einer Verdünnungsreihe auf LB-Medium ausplattiert (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000). Die Transformationseffizienz wurde folgendermaßen berechnet:

$$T_E = \frac{(\text{Anzahl Kolonien} \cdot \text{Verdünnungsfaktor})}{\text{eingesetzte Menge DNA } [\mu\text{g}]} = \text{Anzahl Kolonien pro } \mu\text{g DNA}$$

**Formel 1:** Bestimmung der Transformationseffizienz

### 2.2.8 Produktion rekombinanter Proteine in E. coli

#### 2.2.8.1 Testexpression und Expressionsoptimierung

Zur Analyse der Überexpression wurden mit einer frisch transformierten *E. coli*-Kolonie fünf Milliliter LB Medium mit entsprechenden Antibiotika inokuliert und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Mit dieser Kultur wurden weitere 50 ml LB-Medium angeimpft und bei

37°C bis zum Erreichen einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,6$  inokuliert und anschließend auf zwei Kolben aufgeteilt. In einem Kolben wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert, in dem anderen kein IPTG zugegeben. Nach Inkubation unter verschiedenen Bedingungen (Temperatur: 23 - 37°C, Zeit: vier bis 24 Stunden) wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 g, 10 min, 4°C) pelletiert, in ein Mililiter Aufschlusspuffer resuspendiert und mittels Ultraschall (Amplitude 25 %, 50 Sekunden) aufgeschlossen.

Die Proben wurden in der Tischzentrifuge (12500 g, fünf Minuten, RT) zentrifugiert und der Überstand vollständig in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das erhaltene Pellet mit den unlöslichen Zellbestandteilen (P) wurde in 1 ml Aufschlusspuffer resuspendiert, 100 µl davon in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Zur Untersuchung des löslichen Zellextrakts wurden 100 µl des Überstands in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit gleichem Volumen 2x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt.

Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Aliquots (P und C, jeweils induziert und nicht induziert) wurden per SDS-PAGE (2.5.1) analysiert.

#### 2.2.8.2 *Heterologe Proteinherstellung im präparativen Maßstab*

Ein auf der Basis der analytischen Proteinherstellung ausgewählter Klon wurde, ausgehend von einer 50 ml ü.N.-Kultur, in einer 1 l-Kultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 inokuliert und bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,5 bis 0,6 wurde die Genexpression mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 mM induziert. Die Bakterien wurden über den vorher bestimmten Zeitraum bei entsprechender Temperatur inkubiert.

Nach der Zellernte (Varifuge 20 RS bzw. Sorvall RL5B plus, GS3 Rotor, 4000 rpm, 15 Minuten, 4°C) wurde das Pellet bei -20°C bis zum Aufschluss gelagert.

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien stammen entweder von ATCC oder wurden durch Kooperationspartner zur Verfügung gestellt (siehe 2.1.1). Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf Kontamination mit Mycoplasmen getestet.

#### ***Jurkat-Zellen:***

Für die Anzucht der Jurkat-Zellen wurde als Kulturmedium RPMI 1640 (Gibco) mit 2 mM Glutamin, 1x Penicillin/Streptomycin-Lösung (P/S, Gibco) und 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich) als Quelle von Lipiden und Wachstumsfaktoren verwendet. Neben dem RPMI 1640 Medium wurde auch Medium ohne Zusatz von Phenolrot (RPMI oP) für Versuche zur Identifizierung des Mediators verwendet, um die Beeinflussung der Chromatografien durch die Zusätze zu minimieren. Alle Waschschritte wurden mit sterilem 1xPBS bzw. für die Herstellung elektrokompetenter Zellen mit H<sub>2</sub>O durchgeführt. Die Medien und Lösungen wurden vor Verwendung jeweils auf RT temperiert. Die Anzucht der Zellen erfolgte in RPMI 1640 Medium bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (HeraCell, 240). Das Zellwachstum und die Vitalität wurden täglich mittels Mikroskop überprüft. Ein Mediumswechsel wurde je nach Zellwachstum nach drei bis fünf Tagen durchgeführt. Für Subkultivierung wurden die Zellen bei 1200 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem RPMI-Medium + 10 % FCS + 1x P/S resuspendiert. Die Zellen wurden für die Subkultivierung entweder in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:20 gesplittet oder direkt für Versuche in entsprechender Zelldichte auf Zellkulturplatten im 6- bis 96-well Format ausgesät.

#### ***HEK, Hep G2 & Huh-7:***

Die Zelllinien HEK, Hep G2 und Huh-7 wurden jeweils in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO®) in einem Volumen von 7 ml, 20 ml bzw. 50 ml in 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> bzw. 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde mit 1x Penicillin/Streptomycin-Lösung (P/S, Gibco) und 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich) komplementiert. Die Anzucht der Zellen erfolgte ebenfalls bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Für Subkultivierung der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen in 1xPBS gewaschen und mit 2,5 ml einer 0,25 % Trypsin-EDTA Lösung (Gibco) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für fünf bis zehn Minuten inkubiert. Die Ablösung der adhärenen Zelle wurde makroskopisch überprüft und nach vollständiger Trypsinierung 7,5 ml DMEM + 10% FCS + 1x P/S zugegeben, um das Trypsin zu inaktivieren. Die Medien und Lösungen wurden vor Verwendung jeweils auf RT temperiert. Die Zellen wurden anschließend in ein 15 ml Falcon-Tub überführt und bei 1200 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem DMEM-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden für die Subkultivierung entweder in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:20 gesplittet oder

direkt für Versuche in entsprechender Zelldichte auf Zellkulturplatten im 6- bis 24-well-Format ausgesät. Das Zellwachstum und die Vitalität wurden täglich mittels Mikroskop überprüft. Ein Mediumswechsel wurde je nach Zellwachstum nach drei bis fünf Tagen durchgeführt.

### **2.3.2 Lagerung und In-Kulturnahme der Zelllinien**

Für Langzeitlagerung wurden die Zelllinien in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden Cryotubes (PESKE GmbH) mit je 500 µl 90 % FCS + 10 % DMSO vorbereitet, Zellen trypsiniert und in DMEM bzw RPMI + 10 % FCS + 1x P/S resuspendiert. Die frisch resuspendierten Zellen wurden anschließend in die vorbereiteten Cryotubs gegeben und bei -80°C für 48 bis 72 Stunden gelagert. Anschließend wurden die Zellen für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden dreißig Mililiter Kulturmedium in fünfzig Mililiter Falcon-Röhrchen vorbereitet und auf 37°C temperiert. Zellen wurden durch Inkubation der Cryotubes bei 37°C im Wasserbad kurz angetaut und direkt in das vorbereitete Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in fünf Mililiter neuem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt.

### **2.3.3 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahl in Suspension wurde mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension 1:1 in Trypanblaulösung (Gibco) verdünnt, wodurch lebende und tote Zellen voneinander differenziert werden konnten. Dieser Azofarbstoff kann eine zerstörte, nicht jedoch eine intakte Plasmamembran penetrieren und bindet an zytosolische Proteine. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Mittelwert der Zellzahl aus vier Großfeldern mit  $10^4$  (Zellzahl/ml) und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl musste dieser Wert noch mit dem Resuspensionsvolumen multipliziert werden.

### **2.3.4 Elektroporation und transiente Transfektion von Zellen**

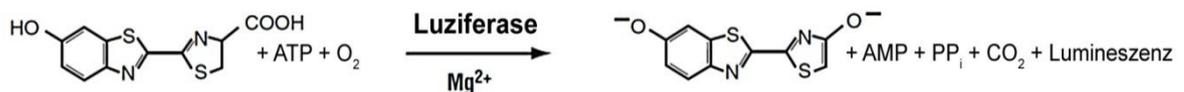
Für die Elektroporation wurden nicht adhärente Zelllinien gezählt und  $1 \times 10^6$  Zellen für das weitere Vorgehen eingesetzt. Die Zellen wurden fünf Minuten bei 1400 g abzentrifugiert und in 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden das Zellpellet in 250 µl Opti-MEM (Gibco) resuspendiert und mit 20 µg der Vektor-DNA (welche zuvor fünf Minuten auf 95°C erhitzt

wurde) für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die eigentliche Elektroporation erfolge in vorgekühlten 4 mm-Küvetten bei 290 V für 20 msec (Bio-Rad Gene Pulser Xcell). Die Zellen wurden im Anschluss sofort in zwei Mililiter RPMI-Medium + 10 % FCS + 1x P/S aufgenommen und in 6-well-Platten überführt.

Für die transiente Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA wurden diese zwölf bis 18 Stunden vor der Transfektion ausgesät. In dieser Arbeit wurden jeweils 6-well Platen verwendet, wobei jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well in drei Mililiter DMEM-Medium verwendet wurden. Für die eigentliche Transfektion wurden 150  $\mu$ l Opti-MEM + 3  $\mu$ l Lipofektamin 2000 (Invitrogen) fünf Minuten unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend mit 2  $\mu$ g Plasmid-DNA, welche in 100  $\mu$ l Opti-MEM aufgenommen wurde, gemischt. Dieser Transfektionsmix wurde nach 25 minütiger Inkubation zu den vorbereiteten Zellen zugegeben. Die Anzucht der Zellen erfolgte bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank über 48 Stunden. Anschließend wurden die Zellen entweder direkt in Versuche eingesetzt oder für die Generierung stabiler Klone in Selektionsmedium (Zusatz von Antibiotika) kultiviert.

### 2.3.5 Bestimmung der Proliferation von eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden in 96-well Platten mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  (Jurkats) bzw.  $5 \times 10^4$  (PBMCs) Zellen in 80  $\mu$ l RPMI + 10% FCS + 1x P/S pro Well ausgesät. Je nach Versuchsaufbau wurden anschließend verschiedene Substanzen in einem Volumen von 20  $\mu$ l zugesetzt. Nach 48 Stunden wurde die Proliferation in Triplikaten mittels Cell-Titer Glo Substrat (Promega) nach Herstellerangaben an einem Mithras LB940 (Berthold) gemessen. Hierbei wird der ATP-Gehalt der Zellen und somit indirekt die Zahl lebender Zellen über ein durch Luziferase-Reaktion entstehendes Lumineszenzsignal (Abbildung 7) bei 405 nm. ermittelt.



**Abbildung 7:** Luziferase-Reaktion bei der Proliferationsmessung mittels Cell-Titer Glo (Promega).

### 2.3.6 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, die für die phenotypische Analyse (z. B. von Oberflächen- bzw. intrazellulärer Proteine) oder auch das Sortieren spezifischer Zellpopulationen (FACS, fluorescence activated cell sorting) verwendet wird. Hierbei werden die zuvor meist Antikörper-Fluoreszenz-markierten Zellen in einem

Flüssigkeitsstrahl, basierend auf dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung, an einem Laser vorbeigeleitet. So können, neben morphologischen Parametern wie Größe (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) des Probenmaterials, auch Informationen aus den durch Anregung der Fluorochrome abgestrahlten Photonen gewonnen werden. Diese optischen Signale werden am Photoelektronenvervielfacher (photomultiplier tubes, PMT) in elektrische umgewandelt, danach verstärkt und an einen Computer weitergeleitet.

Die Analyse des Anteils apoptotischer Zellen in einer Zellpopulation erfolgte in dieser Arbeit mittels AnnexinV-FITC und Propidium-Iodid Färbung. Hierzu wurden die Zellen zunächst in 100 µl eiskaltem 1x PBS gewaschen, abzentrifugiert (fünf Minuten 1200 g) und anschließend in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Der Ansatz wurde mit 1 µl AnnexinV-FITC Lösung und 1µl PI-Lösung gemischt und dann für 15 Minuten lichtgeschützt bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und abschließend am Durchflusszytometer analysiert (Anregung über 488 nm – Detektion AnnexinV FITC (FL1) bzw. PI (FL3)).

Die Durchführung und Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte durch Dr. Florian Anderl. Die Akquise der Zellen erfolgte dabei an einer Cyan™ ADP Lx 9 color (Beckman Coulter Inc., Miami – USA) und die Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der Software FlowJo™ (Treestar, Inc., Ashland – USA) v9.5.3 durchgeführt.

## **2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1 DNA-Isolierung & Reinigung**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden 4 ml einer entsprechenden *E. coli* ü.N.-Kultur bei RT und 4000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Die Isolierung zu analytischen Zwecken erfolgte dann durch das Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System von Promega laut Anleitung des Herstellers. Um größere Mengen an Plasmid-DNA aufzureinigen, wurden 100 ml der entsprechenden *E. coli* ü.N.-Kultur verwendet und mittels PureYield Plasmid Midiprep System (Promega) nach Herstellerangaben gereinigt. Die DNA wurde in 25 bis 40 µl (MiniPrep) bzw. 400-500 µl (MidiPrep) Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen und kurzfristig bei 4°C bzw. längerfristig bei -20°C gelagert.

DNA kann in wässriger Lösung mit verschiedenen Methoden ausgefällt werden. Hierdurch kann eine Reinigung der DNA erreicht werden, wenn die betreffenden Kontaminationen (z.B. Salze, Proteine) unter den gewählten Bedingungen im Überstand bleiben. Durch Lösen der DNA in einem geringeren Volumen Lösungsmittel als das der Ausgangslösung kann eine Konzentrierung erfolgen. Bei der Verwendung von Isopropanol als Fällungsmittel wird die Kopräzipitation von Salzen vermindert. Diese Methode wurde bei der Präparation von Plasmid-DNA in präparativen Mengen benutzt. Dabei wurde die Probe mit 0,7 Vol Isopropanol versetzt und sofort bei 4°C in der Kühlzentrifuge (Centrifuge 5415D, 13000 rpm) für eine Stunde zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Reaktionsgefäße zum Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur offen stehen gelassen, bis sich das Ethanol vollständig verflüchtigt hatte. Die DNA wurde dann in 30 µl Wasser gelöst.

#### **2.4.2 Gelelektrophorese**

Zur Präparation eines Agarosegels wurde 1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Bei einer Temperatur von ca. 60°C wurden 5 µl Roti-Safe (Roth) pro 100 ml Agarose hinzugegeben, die Lösung in eine Gelkammer mit Kamm gegossen und nach dem Aushärten mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Durch das Abkühlen entstand ein vernetztes Gel, in dem die negativ geladene DNA bei Anlegung einer Spannung entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurde. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Vol DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für etwa dreißig Minuten durchgeführt. Mittels UV-Licht der Wellenlänge 302 nm konnten die DNA-Fragmente detektiert werden. Die Gele wurden mit Hilfe des Molecular Imager Gel Doc XR+ System dokumentiert.

Für eine Aufreinigung wurden die DNA-Fragmente mit DNA Pick-tips (SLG) aus dem Agarosegel ausgestanzt und entweder mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean Up Kit (Promega) oder dem Illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) nach Herstellerangaben gereinigt. Die DNA wurde in 20 bis 35 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O eluiert und entweder direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

#### **2.4.3 *In vitro*-Modifizierung von DNA**

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). Sie ermöglicht die selektive

Vervielfachung des DNA-Templates auch aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus. Die Reaktion basiert auf der Anlagerung (*Annealing*) und Verlängerung (*Extension*) zweier Oligonukleotid-Primer, die auf gegenüberliegenden Strängen in entgegengesetzter Richtung die Zielregion einer doppelsträngigen DNA flankieren. Die Reaktion besteht aus aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen, die jeweils durch drei Phasen unterschiedlicher Temperatur charakterisiert sind. In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird die Doppelstrang-DNA durch Erhitzen aufgeschmolzen und somit in Einzelstrang-DNA überführt. Durch das anschließende Absenken der Temperatur in der *Annealing*-Phase kommt es zur Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die komplementären Zielregionen der einzelsträngigen Matrizen-DNA. In der Extensions-Phase werden bei höherer Temperatur die Primer durch eine thermostabile Polymerase komplementär zur Matrize verlängert. In den aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen kommt es zu einer exponentiellen Akkumulation der durch die beiden Primer flankierten DNA-Sequenz.

Die PCR-Bedingungen wurden je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz und dem G/C-Gehalt der jeweiligen spezifischen Primer festgelegt. Die Reaktionen wurden in 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt und enthielten folgende Komponenten: 50 bis 100 ng Matrizen DNA, 50 pmol eines jeden Primers und *FideliTaq* PCR Reaction Mix mit MgCl<sub>2</sub> (USB) nach Herstellerangaben. Durch die *Proof-reading* Aktivität wird gewährleistet, bei der Amplifikation eine reduzierte Fehlerrate zu erhalten.

Die Schmelztemperatur  $T_M$  eines Primers wurde nach einer empirischen Formel, die sowohl den relativen molaren G/C-Gehalt (% GC) als auch die Länge der Oligonukleotide (n) berücksichtigt, berechnet:

$$T_M = 69,3 + 0,41 \cdot (\%GC) - \left(\frac{650}{n}\right)$$

**Formel 2:** Berechnung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids

Die  $T_M$  lag in der Regel zwischen 50 und 65 °C.

Aus den Schmelztemperaturen der beiden Primer ( $T_{M1}$  und  $T_{M2}$ ) wurde die *Annealing*-Temperatur  $T_A$  wie folgt ermittelt:

$$T_A = \left[ \frac{T_{M1} + T_{M2}}{2} \right] - 3^\circ C$$

**Formel 3:** Bestimmung der Annealing-Temperatur in einer PCR-Reaktion

Das Ergebnis der PCR wurde auf einem Agarosegel (1%) analysiert.

#### **2.4.4 Verdau mit Restriktionsendonukleasen**

DNA Fragmente und Plasmide wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen der Firma Promega bzw. New England Biolabs nach Herstellerangaben inkubiert. Der Verdau wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl bis 50 µl durchgeführt. Alle Verdaue wurden anschließend mittels Agarose Gelelektrophorese analysiert.

#### **2.4.5 Ligierung der DNA-Fragmente in Zielvektoren**

Für die Ligierung wurde mit T4 DNA Ligase (Promega; New England Biolabs) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die T4 DNA Ligase verknüpft kompatible DNA Enden, z. B. entstanden durch Restriktionsverdaue bzw. von PCR-Produkten in pGEM-T (Promega) miteinander. Nach der Ligierung wurden die daraus resultierenden Plasmide in chemisch kompetente *E. coli* DH5a transformiert (siehe 2.2.6).

#### **2.4.6 Sequenzierung**

Die Sequenzierung der mutagenisierten und klonierten Genkonstrukte erfolgte durch die Firma MWG Eurofins nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger et al., 1977). Die abgegebenen Proben mit einem Gesamtvolumen von 15 µl enthielten 500-1000 ng DNA und jeweils 30 pmol eines Sequenzierungsprimers, wodurch die DNA linear amplifiziert wurde. Die im TXT Format erhaltenen Sequenzen konnten mit dem Programm Bioedit bzw. WinGene analysiert werden.

### **2.5 Proteinchemische Methoden**

#### **2.5.1 SDS-PAGE**

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und negative Ladungen eingebracht. Hierbei bindet etwa ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäuren. Im SDS-Komplex kann die Eigenladung des Proteins vernachlässigt werden, so dass das Verhältnis von Masse zu Ladung identisch ist und die Auftrennung nach der Größe entsprechend einem Siebeffekt der Polyacrylamidmatrix erfolgt.

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für drei Minuten bei 95°C erhitzt. Nach dem Abzentrifugieren (Centrifuge 5415 D, 13000 rpm, eine Minute bei Raumtemperatur) wurden die Proben aufgetragen.

Standardmäßig wurden zehnpromtente Gele verwendet. Zur Elektrophorese wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer (XCell SureLock Mini-Cell Kammern; Invitrogen) gespannt und der Kamm herausgezogen. Nach Auffüllen mit 1x SDS-Laufpuffer wurden 2,5 bis 15 µl Proben mit einer Hamiltonspritze in die Taschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 170 V und max. 300 mA für sechzig Minuten durchgeführt.

Die Nachweisgrenze der Coomassie Brilliant Blue G250 Färbung liegt bei 0,2 bis 0,5 µg / Bande. Hierzu wurden die Gele 15 Minuten in der Färbelösung geschwenkt und im Anschluss durch wiederholtes Aufkochen in Wasser (Mikrowelle; für 3x zwei Minuten) entfärbt.

Durch eine Silberfärbung können Proteine bis zu einer Nachweisgrenze von 0,05 bis 0,1 ng / Bande detektiert werden. Hierzu wurden die Gele je zweimal 30 min in Fixierlösung und anschließend mindestens dreißig Minuten in Inkubationslösung geschwenkt. Im Anschluss werden die Gele dreimal für mindestens zehn Minuten mit Wasser gewaschen. Die eigentliche Färbung wurde für 15 bis 60 Minuten mit Silberlösung durchgeführt. Zum Abschluss wurden die Gele entwickelt, nach fünf bis zehn Minuten das Entwickeln abgestoppt (sobald deutliche Banden erkennbar waren) und mit Wasser gewaschen.

### 2.5.2 Western-Blot

Der Western-Blot dient der spezifischen Identifikation und Quantifizierung von Proteinen in komplexen Proteingemischen. Dabei können einzelne Proteine aus Gesamt-Zell-Protein oder Gewebe-Lysaten nachgewiesen werden. Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE (2.5.1) werden sie auf eine Membran transferiert, dadurch immobilisiert und mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Der gebundene erste Antikörper und damit das gebundene Protein wird durch einen zweiten Antikörper, der entweder radioaktiv markiert oder an ein Enzym (Peroxidase, Phosphatase etc.) gekoppelt ist, detektiert.

Nach Auftrennung des Proteingemisches mittels SDS-PAGE (2.5.1) erfolgte der Elektro-Blot im XCell II Blot-Modul (Invitrogen) auf eine Nitrozellulose Membran (Whatman) bei 2,5 mA/cm<sup>2</sup> für sechzig Minuten in Transfer-Puffer im *Tank-Blot*-Verfahren. Folgender Aufbau wurde für einen Blot verwendet: Anode, drei Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes und in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier, Membran, SDS-Gel, drei Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes und in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier, Kathode.

Nach Beendigung des Blots wurde die Membran reversibel mit Ponceau S - Lösung angefärbt, um den Transfer der Proteine zu überprüfen und die Banden des Proteinstandards

markieren zu können. Nach Entfärbung durch mehrmaliges Schwenken in Wasser erfolgte das Blockieren freier Bindestellen auf der Membran durch Inkubation in 1x TBS-T mit 5 % Milchpulver für mind. eine Stunde. Nach anschließender Inkubation in 1x TBS-T mit 5 % Milchpulver mit dem ersten Antikörper (1:2000 Verdünnung der Stammlösung) wurde die Membran dreimal für zehn Minuten in je fünf Mililiter 1x TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (1:3500 Verdünnung der Stammlösung) erfolgte in 1x TBS-T für eine Stunde. Abschließend wurde die Membran erneut dreimal für zehn Minuten in 1x TBS-T gewaschen. Die Messung erfolgte durch kurzes Schwenken in ca. zwei Mililiter Pierce ECL Western Blotting Substrat (Thermo Scientific) und anschließender Detektion mittels X-Ray Film (Fujifilm) und dem Entwickler Curix60. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

### 2.5.3 Chromatographische Verfahren

#### 2.5.3.1 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie basiert auf der spezifischen, reversiblen Wechselwirkung von Proteinen mit bestimmten, an der Säulenmatrix gebundenen, chemischen Gruppen, wodurch die Trennung des Proteins aus einer Proteinmischung erreicht wird. Die Elution des Proteins von der Säulenmatrix erfolgt durch die kompetitive Verdrängung des Proteins vom immobilisierten Liganden. Die Chromatographien wurden an der Chromatographie-Anlage ÄKTA purifier bzw. ÄKTA avant 25 (GE Healthcare) durchgeführt.

##### a) Streptavidin-Affinitätschromatographie

Bei der verwendeten StrepTrap HP-Säule der Firma GE Healthcare bindet der an das Protein angehängte *Strep*-tag II (Schlehuber and Skerra, 2001; Schmidt and Skerra, 1993; Skerra and Schmidt, 2000) an das an die Sepharose-Säulenmatrix gebundene *Strep*-Tactin<sup>TM</sup>.

Die Reinigung erfolgte bei 4°C nach folgender Methode:

<b>Flussrate</b>	1 ml/min
<b>Equilibrieren</b>	5 SV SAC <sup>++</sup> -Puffer
<b>Beladen</b>	30-60 ml Proteinlösung in SAC <sup>++</sup> -Puffer mittels Auftragspumpe
<b>Waschen</b>	5 SV SAC <sup>++</sup> -Puffer
<b>Eluieren</b>	Stufe auf 2.5 mM D-Desthiobiotin (IBA) in SAC <sup>++</sup> -Puffer

Die Elution der Proteine wurde über die Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (2.5.1). Zur Regeneration

der Säule wurde diese mit 5 SV 5 mM HABA in SAC<sup>++</sup>-Puffer gespült, wodurch das D-Desthiobiotin von der Säule verdrängt wird. Durch anschließendes intensives Waschen mit SAC<sup>++</sup> kann der Ursprungszustand der Säule wiederhergestellt werden. Nach der Chromatographie wurde die Säule in 20 % Ethanol gelagert.

*b) Metallchelate-Affinitätschromatographie (Immobilized metal affinity chromatography; IMAC)*

An die Säulenmatrix gebundene Übergangsmetallionen fungieren bei der IMAC als Koordinationsstellen für die Histidinseitenketten eines Proteins, die zuvor durch Anfügen eines His-tags N- bzw. C-terminal an das Protein bereitgestellt wurden (Skerra et al., 1991). Die Elution erfolgt durch einen Imidazolgradienten, wobei das Imidazol um die vom Protein besetzten Bindestellen der Säule konkurriert. In dem Auftragspuffer dürfen sich nur geringe Mengen an EDTA und DTT befinden, da EDTA die gebundenen Nickel-Ionen komplexiert und DTT diese zu elementarem Nickel reduziert. Es wurde eine Nickel-Chelat-Säule der Firma GE Healthcare (HisTrap™ FF crude, Säulenvolumen 5 ml, maximaler Druck: 0,3 mPa) verwendet.

Vor jedem Lauf bzw. nach zweimaliger Benutzung wurde die Säule nach folgendem Schema bei einer Flussrate von 10 ml/min mit Nickel-Ionen beladen:

- Auftragschlauch A1 und Säule in H<sub>2</sub>O spülen
- Säule mit 20 ml 0,5 M EDTA spülen, um alte Nickel-Ionen zu entfernen
- Säule mit 100 ml 0,5 M NaCl spülen, um das EDTA abzuwaschen
- Säule mit zwei Säulenvolumen (SV) NiSO<sub>4</sub> spülen
- Säule mit 100 ml 0,5 M NaCl spülen, um ungebundene Nickel-Ionen abzuwaschen
- Equilibrieren der Säule mit Laufpuffer 100 mM KP, pH 7.5, 300 mM KCl

Die Reinigung erfolgte bei 4°C nach folgender Methode:

<b>Flussrate</b>	2 ml/min; für den Auftrag wurde eine verringerte Flussrate von 1 ml/min verwendet
<b>Equilibrieren</b>	2 SV 100 mM Tris; pH 7.5; 500 mM NaCl
<b>Beladen</b>	30-60 ml Proteinlösung in 100 mM Tris; pH 7.5; 500 mM NaCl mittels Auftragspumpe
<b>Waschen</b>	10 SV 100 mM Tris; pH 7.5; 500 mM NaCl
<b>Eluieren</b>	15 SV Gradient von 10-1000 mM Imidazol in 100 mM Tris; pH 7.5; 500 mM NaCl; es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt.
<b>Equilibrieren</b>	2 SV 100 mM Tris; pH 7.5; 500 mM NaCl

Die Elution der Proteine wurde über die Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (2.5.1).

### 2.5.3.2 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung von Proteinen mit einer geladenen Säulenmatrix. Die Matrix eines Kationenaustauschers (cation exchange chromatography, CEX) trägt negativ geladene Seitenketten und eignet sich deshalb für die Reinigung positiv geladener Proteine, während ein Anionenaustauscher (anion exchange chromatography, AEX) aufgrund seiner positiv geladenen Matrix für die Reinigung negativ geladener Proteine gewählt wird. Die Stärke der Bindung hängt dabei von der Nettoladung des Proteins ab. Diese wiederum basiert auf dem spezifischen isoelektrischen Punkt, welcher den pH-Wert wiedergibt, bei dem ein Protein als Ganzes ungeladen ist. Deshalb müssen die Pufferbedingungen für die Chromatographie so gewählt werden, dass eine möglichst gute Trennleistung für das gewünschte Protein gegeben ist. Die Elution erfolgt durch Verdrängung der gebundenen Proteine durch eine steigende Konzentration an im Laufpuffer gelösten Salzionen. Die Chromatographie erfolgte bei 4°C an einem Äkta System (GE Healthcare) unter Verwendung einer Resource S- bzw Q-Säule (GE Healthcare, SV 6 ml). Als Laufpuffer wurde 20 mM MES pH 6.0 bzw. 50mM Tris/HCl pH 7.5, 2 % Triton X-100 verwendet, die Elution erfolgte durch einen linearen NaCl Gradienten. Die Reinigung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

<b>Flussrate</b>	1 ml/min
<b>Equilibrieren</b>	5 SV Laufpuffer
<b>Beladen</b>	10 bis 50 ml Proteinlösung in Laufpuffer mittels Auftragspumpe
<b>Waschen</b>	10 SV Laufpuffer
<b>Eluieren</b>	15 SV Gradient von 0-500 mM NaCl in Laufpuffer; es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt
<b>Hochsalz</b>	2 SV Laufpuffer mit 1 M NaCl
<b>Regeneration</b>	5 SV Laufpuffer

Die Elution der Proteine wurde über die Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (2.5.1).

### 2.5.3.3 Größenausschlußchromatographie

Durch analytische Gelfiltration lässt sich die apparente molare Masse eines Proteins und damit, bei bekannter molarer Masse des Monomers, auch sein Oligomerisierungsgrad abschätzen. Außerdem lässt das Elutionsprofil Aussagen über die Homogenität der Proteinlösung zu. Je

symmetrischer ein Peak, desto homogener ist die Proteinlösung. Es wurde eine Superdex 75 Säule (GE Healthcare) mit einem SV von 24 ml an einer Chromatographie-Anlage ÄKTA Basic 10 better (GE Healthcare) verwendet. Auf die mit 100 mM HEPES, pH 7,0; 140 mM NaCl; 2,5 % (w/v) Sucrose equilibrierte Säule wurden jeweils max. 500 µl einer Proteinlösung der Konzentration 15 µM oder 30 µM über einen Auftragsloop injiziert. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Der Durchfluss der Probe wurde über eine Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt und die aufgefangenen 1 ml Fraktionen entsprechend gepoolt. Bei Unklarheiten, in welcher Fraktion sich das Protein befand, wurde vor dem Pool-Vorgang eine SDS-PAGE durchgeführt. Nach der Gelfiltration wurde die Säule zur Lagerung in Ethanol gebettet.

#### 2.5.4 Protein-Rückfaltung

Bei heterologer Expression in *E. coli* können im Vergleich zu eukaryotischen Expressionssystemen deutlich höhere Ausbeuten an Protein erzielt werden. Ein Nachteil der bakteriellen Produktion liegt in einer möglichen Aggregation in *inclusion bodies* und Inaktivität der so hergestellten Proteine.

Um Proteine wieder in die ursprüngliche enzymatisch aktive Struktur zu überführen, wurden in dieser Arbeit, ausgehend von dem Praktikumsprotokoll von Prof. Skerra, verschiedene Rückfaltungsprotokolle entwickelt. Zunächst wurden die in *inclusion bodies* vorliegenden Proteine durch Lysozym-EDTA- und Ultraschall-Behandlung aus den Bakterien isoliert und über stufenweise Erhöhung der Triton X-100-Konzentrationen angereichert. Anschließend wurden die unlöslichen Proteine aus den *inclusion bodies* vollständig in Harnstoff (8 M mit verschiedenen pH-Werten) bzw. Guanidiniumchlorid (6 M mit verschiedenen pH-Werten) entfaltet und in Lösung gebracht. Für die Rückfaltung wurden im Anschluss verschiedene Techniken eingesetzt:

1. Direkte Verdünnung (*rapid dilution*):

Die aufgefaltete Proteinlösung (max. 5 mg/ml Gesamtprotein) wurde tropfenweise in 500 ml des Rückfaltungspuffers unter ständigem Rühren bei 4°C zugegeben und nach Zugabe der gesamten Proteinlösung für vier Stunden weitergerührt. Anschließend wurde die Lösung mittels Konzentrator konzentriert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (15000 rpm, 4°C, dreißig Minuten) abgetrennt.

2. Dialyse:

Im Unterschied zur direkten Verdünnung erfolgt der Austausch der Detergenzien graduell, wodurch Proteine verschiedene Faltungsstadien

durchlaufen. Diese Methode führt häufiger zu Aggregationsbildung (Gu et al., 2002).

### 3. Chromatographische Methode:

Durch die Bindung der entfalteten Proteine an die Matrix der Säule, z. B. über Affinitäts-tags, können unerwünschte Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Molekülen vermieden und so eine Reduktion der Aggregation erreicht werden. Durch graduellen Austausch des Puffers konnte so die Rückfaltung erzielt und das gefaltete Protein anschließend mittels Elutionspuffer von der Matrix gelöst werden.

## 2.5.5 Bestimmung von Proteinkonzentration

### *Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford*

Der Bradford-Test dient der quantitativen Bestimmung des Proteingehalts von wässrigen Lösungen. Der in der Färbelösung enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 bindet an Proteine, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt (Bradford, 1976). Die Bindung erfolgt vorwiegend an kationische, nichtpolare und hydrophobe Reste. In einem Bereich von 0,2 bis 1,4 mg Protein pro ml Lösung ist die Absorption bei 595 nm annähernd eine lineare Funktion der Proteinkonzentration. Für den Test wurden 800 µl verdünnte Proteinlösung mit 200 µl Biorad-Reagenz versetzt. Nach fünf Minuten Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm gemessen, wobei als Referenz die gleiche Menge Reagenz mit Puffer diente.

Anhand einer Kalibrierungskurve mit Rinderserumalbumin wurde die Proteinmenge nach folgender Gleichung bestimmt:

$$c = \frac{(A_{595} - b)}{m} \quad (1)$$

c: Proteinkonzentration [mg/ml]

$A_{595}$ : Absorption bei 595 nm

b: y-Achsenabschnitt der Kalibrierungsgeraden

m: Steigung der Kalibrierungsgeraden

**Formel 4:** Konzentrationsbestimmung aus Kalibrierungsgerade

### *Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Absorptions-Spektroskopie*

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie Cystine (Disulfidbrücken) absorbieren UV-Licht im Bereich von 250 bis 300 nm. So kann aus der Aminosäuresequenz der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) und daraus, bei bekanntem

Molekulargewicht, der spezifische Extinktionskoeffizient ( $^{0,1\%}A_{280}$ ) berechnet werden (Pace et al., 1995):

$$\epsilon_{280} = 5500 \cdot N_{\text{Trp}} + 1490 \cdot N_{\text{Tyr}} + 125 \cdot N_{\text{Cys}} \quad (2)$$

**Formel 5:** Berechnung des molekularen Extinktionskoeffizienten

$$^{0,1\%}A_{280} = \frac{\epsilon_{280}}{M_R} \quad (3)$$

$\epsilon_{280}$  : molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [ $M^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

$^{0,1\%}A_{280}$  : spezifischer Extinktionskoeffizient [ $\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$ ]

$M_R$  : Molare Masse [g/mol]

**Formel 6:** Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten

Durch Einsetzen in das Lambert-Beersche-Gesetz kann somit die Proteinkonzentration (c) berechnet werden:

$$c = \frac{A_{280}}{^{0,1\%}A_{280} \cdot d} \quad (4)$$

c : Konzentration [mg/ml]

$A_{280}$  : Absorption bei 280 nm

d : Schichtdicke der Küvette [cm]

$^{0,1\%}A_{280}$  : spezifischer Extinktionskoeffizient [ $\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$ ]

**Formel 7:** Lambert-Beersche-Gesetz

Es wurde ein Spektrum von 240 bis 340 nm aufgenommen, wobei sich das Absorptionsmaximum des Proteins bei 280 nm befinden sollte. Der Quotient  $A_{280}/A_{250}$  sollte mindestens 1,8 betragen und es sollte keine Absorption oberhalb von 300 nm auftreten, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch auf Aggregatbildung zurückgehende Lichtstreuung ausschließen zu können. Bei deutlicher Absorption oberhalb von 300 nm wurde als erste Näherung eine lineare Zunahme der Lichtstreuung mit abnehmender Wellenlänge angenommen und die ermittelte Proteinkonzentration entsprechend korrigiert.

Die Proteinkonzentrationen wurden mittels NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) über das Absorptionsspektrum bestimmt. Hierbei war für das Gerät die Eingabe des molaren Extinktionskoeffizienten und der molaren Masse der jeweiligen Proteine nötig, welche online mit Hilfe des Programms ProtParam ([web.expasy.org/protparam/](http://web.expasy.org/protparam/)) ermittelt wurden. Tabelle 5 zeigt diese Werte für die zumessenden Proteine:

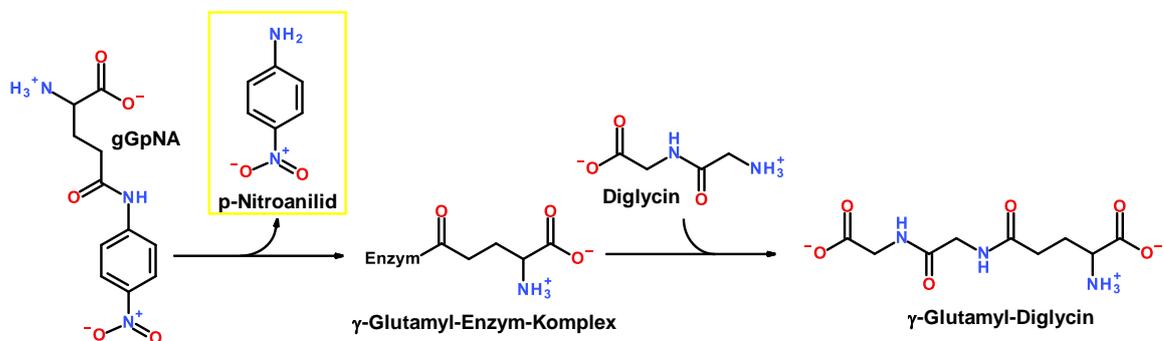
**Tabelle 5:** Molare Masse und Extinktionskoeffizient bei 280nm der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten gGTs

Protein	Molekulargewicht [kDa]	$\epsilon_{280}$ [ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]	$^{0,1\%}A_{280}$ [ $\text{cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ ]
CjgGT	59.67	42290	0.709
EcgGT	61.08	53290	0.872
FtgGT	61.05	46760	0.766
HbgGT	60.31	49280	0.817
HpgGT	59.64	49280	0.826
HsgGT	59.77	47580	0.792

## 2.6 Analytische Methoden

### 2.6.1 Enzymkinetische Analyse

Der hier angewandte Aktivitätsassay (Meister et al., 1981) diente dazu, die gGT- katalysierte enzymatische Reaktion zu testen. So konnten nicht nur die Unterschiede der verschiedenen gGTs, sondern auch der inhibitorische Effekt potentieller Inhibitorikandidaten analysiert werden, welche die gGT vermittelte Transpeptidierung hemmen. Die gGT katalysiert eine Reaktion, bei der eine  $\gamma$ -Glutamylgruppe eines Substrates auf eine Aminosäure, oder in diesem Fall, auf ein Dipeptid übertragen wird. Hierbei wurde das Donorsubstrat L- $\gamma$ -Glutamyl-p-Nitroanilid (gGpNA) (G6133, Sigma-Aldrich) verwendet, dessen  $\gamma$ -Glutamylrest auf das Co-Substrat Glycyl-Glycin (Diglycine, Gly-Gly) (G1002, Sigma-Aldrich) übertragen wurde, wobei die Menge des frei werdende p-Nitroanilid über das Absorptionsspektrum bei 405 nm gemessen werden konnte (Abbildung 8).

**Abbildung 8:** Reaktionsschema des verwendeten enzymatischen Aktivitätsassays. Freisetzung des p-Nitroanilids durch die Übertragung eines  $\gamma$ -Glutamylrestes von gGpNA auf Diglycine

Für die Durchführung wurden in einer 96-well Flachboden-Platte verschiedene gGpNA Konzentrationen in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Es wurden Anfangs-

geschwindigkeiten in Abhängigkeit von der gGpNA-Konzentration gemessen. Aus den resultierenden Sättigungskurven wurden die Michaelis-Konstante  $K_M^{gGpNA}$  und die Maximalgeschwindigkeit  $v_{max}$  ermittelt, wobei die Normierung von  $v_{max}$  auf die Konzentration an aktiven Zentren ( $[E_0]$ ) die Wechselzahl

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E_0]}$$

**Formel 8:** Bestimmung der Wechselzahl  $k_{cat}$ .

ergab. Die Messungen erfolgten jeweils in Duplikaten. Als Referenz wurden dieselben Ansätze ohne HpgGT gemessen, um die Hintergrundfärbung durch Hydrolyse der Donorsubstanz bestimmen zu können. Zunächst wurden für alle Ansätze im Allgemeinen die verschiedenen gGpNA-Konzentrationen vorgelegt und mit 0,1 M Tris/HCl pH 8.0 auf 50  $\mu$ l aufgefüllt und anschließend pro *well* 100  $\mu$ l Akzeptorlösung (20 mM Gly-Gly in 0,1 M Tris/HCl) hinzugegeben. Die Reaktion wurde direkt vor der Messung durch Zugabe der entsprechenden gGT-Verdünnung in 50  $\mu$ l Volumen gestartet. Gemessen wurde über einen Zeitraum von fünf bis dreißig Minuten bei 37°C im Spektrometer Mithras LB940 (Berholds).

### 2.6.2 Inhibitor-Analyse

Zur Bestimmung der inhibitorischen Wirksamkeit der identifizierten Kandidaten wurde in dieser Arbeit der bereits erwähnte enzymatische Aktivitätsassay (2.6.1) verwendet. Zunächst wurden für alle Ansätze in einem Volumen von 50  $\mu$ l verschiedene Konzentrationen an Inhibitor mit definierten Mengen an gGT gemischt. Hierbei wurde neben der Löslichkeit der Substanzen auch der Einfluss des Lösungsmittels auf die Aktivität des Enzyms untersucht. Das Inhibitor-Enzym-Gemisch wurde für dreißig Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde direkt vor der Messung durch Zugabe von 150  $\mu$ l Reaktionslösung (15  $\mu$ M gGpNA, 10 mM Gly-Gly in 0,1 M Tris/HCl) gestartet. Gemessen wurde über einen Zeitraum von fünf bis dreißig Minuten bei 37°C im Spektrometer Mithras LB940 (Berholds).

#### *Endpunktbestimmung*

Eine Standardmethode zur Analyse enzymatischer Reaktionen ist die Endpunktbestimmung, bei der die Reaktion über einen definierten Zeitraum vollständig abläuft. Für die photometrische Analyse wird zunächst die Anfangsabsorption ( $A_0$ ) und abschließend die finale Absorption ( $A_f$ ) des frei werdenden p-Nitroanilids bestimmt. Bei dieser Methode ergibt sich das Problem, dass die Differenz in Absorption zwischen  $A_0$  und  $A_f$  auch durch die Eigenabsorption des eingesetzten Inhibitors beeinflusst wird. Im Rahmen dieser Arbeit

wurde die Absorptionsänderung nach dreißig Minuten bestimmt. Wurden hier Kandidaten mit inhibitorischem Effekt identifiziert, so wurde diese Substanz für weitere kinetische Analysen eingesetzt.

*Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte und des K<sub>i</sub>-Wertes (Cheng and Prusoff, 1973)*

Bei dieser Messmethode wird das zu messende Substrat in niedrigen Konzentrationen um den K<sub>m</sub>-Wert des Substrates eingesetzt. Die Umsatzrate des gelabelten Substrates wird über einen breiten Bereich an Substratkonzentration in Anwesenheit verschiedener inhibitorischer Moleküle bestimmt. Hier kann bereits aus den kompetitiven Inhibitionskurven der IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt werden, welcher die Konzentration der inhibitorischen Substanz, bei der eine 50%ige Reduktion der enzymatischen Aktivität erzielt wird, wiedergibt. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden durch den Auftrag der Aktivitätshemmung gegen die Inhibitorkonzentration grafisch dargestellt und mittels Graphpad Prism ausgewertet. Die so bestimmten IC<sub>50</sub>-Werte lassen sich anschließend über die Cheng-Prusoff-Gleichung in die absolute inhibitorische Konstante K<sub>i</sub> umwandeln:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

**Formel 9:** Bestimmung des K<sub>i</sub>-Wertes

Hier stellt K<sub>i</sub> die Bindeaffinität des Inhibitors, IC<sub>50</sub> die Wirksamkeit der Substanz unter den jeweilig verwendeten Assay-Bedingungen dar, [S] steht für die Substratkonzentration. Für den Spezialfall, dass [S] = K<sub>m</sub>, ergibt sich hieraus folgende Formel für die Bestimmung des K<sub>i</sub>-Wertes:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{2}$$

### 2.6.3 Dünnschicht-Chromatographie

Bei der Dünnschicht-Chromatographie wird als stationäre Phase eine dünne, mit Kieselgel beschichtete Glas- oder Metallplatte verwendet. Als mobile Phase wurden in dieser Arbeit verschiedene Laufmittel - meist jedoch Butanol / Essigsäure / H<sub>2</sub>O (8/1/1) - eingesetzt.

Die Proben werden parallel zueinander im unteren Bereich der Platte mittels Glaskapillare aufgetupft und getrocknet. Anschließend wird die Platte in einen mit Laufmitteln gesättigten Container inkubiert. Hierbei steigt das Laufmittel langsam durch Kapillarkraft in der Kieselgel-Platte aufwärts und trennt so die aufgetragenen Substanzen.

Im Anschluss wird das Chromatogramm getrocknet und der  $R_f$  –Wert für die einzelnen Substanzen nach folgender Formel zur besseren Vergleichbarkeit bestimmt:

$$R_f = \frac{\text{Laufstrecke der Substanz}}{\text{Laufstrecke der Lösungsmittelfront}}$$

**Formel 10:** Bestimmung des  $R_f$ -Wertes

Nach der vollständigen Trocknung der Platten wurden die Aminosäuren mittels einer Ninhydrin-Lösung angefärbt.

#### 2.6.4 Massenspektrometrie

Elektrospray Ionisation (ESI) basiert auf der Dispersion einer Lösung in viele kleine geladene Tröpfchen und ist die Methode der Wahl, um Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie zu verbinden. In dieser Arbeit wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Sieber (TUM) eine UltiMate 3000 HPLC (Dionex) gekoppelt an die LTQ-FT Ultra (Thermo) verwendet. Die Entsalzung der in Lösung befindlichen Vollängenproteine wird direkt über in-line Kartuschen (MassPREP online desalting cartridge; Waters) durchgeführt.

Die angelegte Ladung und die damit verbundene Trennung der Ionen ist für die entstehende Ladung in den erzeugten Tröpfchen ( $\approx 10^5$  Ladungen pro Tröpfchen) verantwortlich. Durch diese hohe Konzentration an Ladung befinden sich die Tröpfchen an ihrer Stabilitätsgrenze (Rayleigh-Limit). Hierbei gleicht die Ladung  $Q$  die Oberflächenspannung  $\gamma$  aus:

$$Q^2 = 64\pi^2 \varepsilon_0 \gamma r^3$$

$\varepsilon_0$ : Dielektrizitätskonstante

$r$ : Radius des Tröpfchens

**Formel 11:** Rayleigh-Gleichung

Durch Überschreitung des Rayleigh-Limits entstehen im Anschluss freie Gasphasen-Ionen, die massenspektrometrisch analysiert werden. Um Strukturinformation zu erhalten, können die Vorgänger-Ionen von interessanten Massen ausgewählt und in einer Kollisionszelle weiter untersucht werden. Die Bruchstück-Ionen können dann durch einen zweiten Massenanalysator eines Tandem-Massenspektrometer-Systems (Triple-Quadrupol) analysiert werden. Das erhaltene Massenspektrum ist eine grafische Anzeige des Verhältnisses der Ion-Signale von Masse zu Ladung ( $m/z$ ). Die Spektren wurden von 600 bis 2000  $m/z$  auf dem LTQ-FT Ultra (Thermo) mit einer Auflösung von 200000@400 $m/z$  aufgenommen. Für die Auswertung der Massenanalysen wurde die Software ProMass mit Standardeinstellungen für große Proteine verwendet.

## 2.7 Computerprogramme und Datenbanken

<i>Adobe Photoshop</i>	Version 10.0, Adobe Systems Incorporated, 2007
<i>Bioedit</i>	Version 7.0.0, IBIS Therapeutics, 2004
<i>Expasy</i>	<a href="http://expasy.org/">http://expasy.org/</a>
<i>GraphPad Prism5</i>	Version 5.01, GraphPad Software 2007 <a href="http://www.graphpad.com">http://www.graphpad.com</a>
<i>ISIS DRAW</i>	Version 5.5: public version
<i>NEBcutter</i>	Version 2.0, New England BioLabs ( <a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/">tools.neb.com/NEBcutter2/</a> )
<i>Oligocalc</i>	Version 3.26, Northwestern University, 2010 <a href="http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html">http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html</a>
<i>Phyre<sup>2</sup></i>	Web Server <a href="http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/">http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/</a>
<i>Promass</i>	Version 2.8 (Thermo)
<i>Pubmed</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>
<i>PyMol</i>	Version 1.4.1 ( <a href="http://www.pymol.org">http://www.pymol.org</a> )
<i>Serial Cloner</i>	Version 2.5, Serial Basics 2012
<i>Scwrl</i>	Version 3.0 ( <a href="http://dunbrack.fccc.edu/SCWRL3.php">http://dunbrack.fccc.edu/SCWRL3.php</a> )
<i>Swiss PDB Viewer</i>	Version 4.0.4 ( <a href="http://au.expasy.org/spdbv/">http://au.expasy.org/spdbv/</a> )
<i>Tcoffee</i>	Web Server ( <a href="http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi">http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi</a> )
<i>TMPred</i>	Web Server <a href="http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</a>
<i>Uniprot</i>	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>
<i>WinGene</i>	Version 231 <a href="http://www.igw.agrl.ethz.ch/~lhennig/wingene.html">http://www.igw.agrl.ethz.ch/~lhennig/wingene.html</a>

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vergleich und Analyse rekombinanter Formen der gGT aus verschiedenen Spezies

Die Herstellung und funktionelle Charakterisierung der  $\gamma$ -Glutamyltranpeptidase-Proteine aus verschiedenen Organismen stellt die Grundlage für die weitere Untersuchung des Wirkmechanismus der gGT auf die Proliferation von Lymphozyten und der Entwicklung Spezies-spezifischer Inhibitoren dar.

##### 3.1.1 Sequenzvergleich verschiedener gGTs

Neben den bereits beschriebenen möglichen Funktionen verschiedener gGTs wurde insbesondere der Effekt auf die Prolifertation untersucht. Während die gGT aus *H. pylori* die Proliferation von Lymphozyten *in vitro* blockiert, ist das humane Homolog dazu nicht in der Lage (siehe Anhang). Um diejenigen Reste in der *H. pylori* gGT zu identifizieren, die für die funktionellen Unterschiede in Substratspezifität, Hydrolyse und Transpeptidierung verantwortlich sein könnten, wurde ein multiples Sequenzalignment erstellt (Abbildung 9).

		R103		T380
<i>H. pylori</i>	...	H-LANGENVALDFREKAPLKA...	--	HEGSNTTHYSVAD...
<i>H. bilis</i>	...	H-LANGENITLDFREKAPLKA...	NHKEGNH	THYSVAD...
<i>C. jejuni</i>	...	H-LANGENTLDFREMAPLKA...	--	HEGHNTTHYSVLD...
<i>E. coli</i>	...	R-SKNGNTTAIDFREMAPAKA...	--	YESNQTTHYSVVD...
<i>H. sapiens</i>	...	YNSTTRKAEVINAREVAPRLA...	---	DDGGTAHLSVVA...
<i>F. tularensis</i>	...	HLQDGNKNIAINYREKAPAKA...	--	HEKLTTHFSIID...
<i>B. subtilis</i>	...	YDGKTKDTTIIDSRERAPAGP...	KDKVEGQ	THFTVAD...
		N400		E419
<i>H. pylori</i>	...	AVSVTTYTINASYGS...	IDGAGFLLNNEMD	FSIKPGNP...
<i>H. bilis</i>	...	AVSVTTYTINASYGA...	VEGAGFLLNNEMD	FSIKPGVA...
<i>C. jejuni</i>	...	AVSITYTINASYGS...	VEGAGFLLNDEMD	FSIKPGVP...
<i>E. coli</i>	...	AVAVTTYTLNITFTGT...	AGESGILLNNEMD	FSAKPGVP...
<i>H. sapiens</i>	...	AVSATSTINLYFGS...	SPVSGILFNNEMD	FSS-PSIT...
<i>F. tularensis</i>	...	MVSNTYTLNYSYGS...	VPGTGIFLNNEMD	FAAKVGEA...
<i>B. subtilis</i>	...	VVSYTTTIEQLFGT...	VPDYGVILNNELT	FDIAPGG...
		Y433	S451/452	P471
<i>H. pylori</i>	...	NLYGLVGG...	KRPLSSMSPTIVL...	LVVGSFPGGSRII...
<i>H. bilis</i>	...	NLYGLVGG...	KRPLSSMSPTIIL...	MVVGSPGGARII...
<i>C. jejuni</i>	...	NLYGLVGG...	KRPLSSMSPTIIL...	MVVGSPGGARII...
<i>E. coli</i>	...	NVYGLVGG...	KRPLSSMSPTIVV...	LVTGSPGGARII...
<i>H. sapiens</i>	...	NETGVPPS...	KQLSSMCPTIMV...	MVVGAAAGGTQIT...
<i>F. tularensis</i>	...	NVFGLVQG...	KRPLSSMTPTIVL...	LATGSPGGARII...
<i>B. subtilis</i>	...	---	KRPLSSMTPTILF...	LTVGSFPGGATII...

**Abbildung 9:** Multiples Sequenzalignment mehrerer gGT-Proteine. Rot hinterlegt: Reste, die direkt im aktiven Zentrum der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen beteiligt sind (innerhalb von 3Å der Bindetasche). Zur besseren Übersicht werden nur Bereiche in direkter Umgebung des aktiven Zentrums und Lücken bzw. Deletionen in der Aminosäuresequenz mittels Bindestriche dargestellt. Die im Alignment dargestellten Spezies sind: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*, Q84DD1), *Helicobacter bilis* (*H. bilis*, PRK09615), *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*, Q683Y3), *Escherichia coli* (*E. coli*, P18956), *Homo sapiens* (*H. sapiens*, P19440), *Francisella tularensis* (*F. tularensis*, CAJ79205) und *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*, AFH41843). Das Alignment wurde mit dem Programm T-coffee (2.7) erstellt.

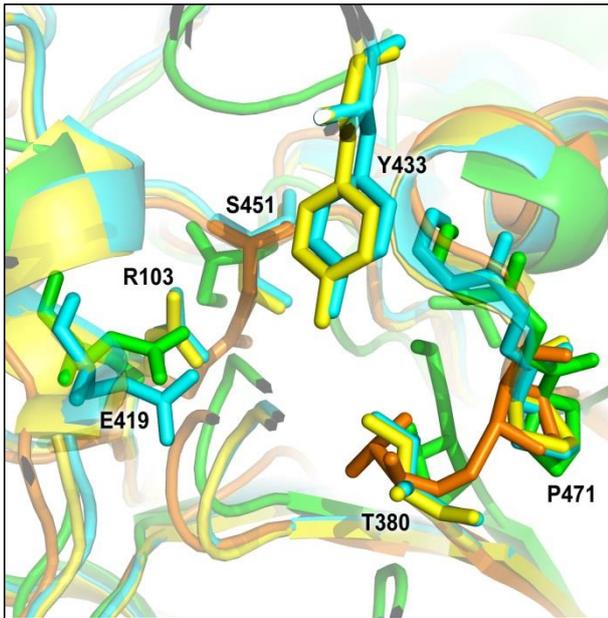
Das Alignment umfasst neben der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase von *H. pylori* und dem humanen Homolog, Sequenzen bekannter gGTs mehrerer Organismen. Darunter auch gGTs mit bereits vorhandener Röntgenkristallstruktur, wie zum Beispiel der gGT aus *Escherichia coli* (2DBW) oder *Bacillus subtilis* (3A75). Außerdem sind die gGT-Proteine aus *Campylobacter jejuni*, *Francisella tularensis* und *Helicobacter bilis* mit aufgeführt. Aus Abbildung 9 wird deutlich, dass die bakteriellen gGTs, insbesondere die aus *H. pylori* gGT, im Vergleich zu dem humanen Homolog im aktiven Zentrum mehrere Unterschiede in essentiellen Resten aufweisen. Die Unterschiede in den Aminosäuren Tyr433 und Pro471 wurden näher betrachtet, da sich diese Aminosäuren strukturell hervorheben. Diese Reste befinden sich im Eingangsbereich der Bindetasche und könnten so mitverantwortlich für unterschiedliche Substratspezifitäten der einzelnen  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen sein. Tyr433 ist gerade bei dem humanen Homolog durch ein Phenylalanin und das sterisch unflexible Pro471 durch ein Alanin ersetzt.

Um die mögliche Relevanz dieser Unterschiede genauer zu analysieren, wurden neben dem direkten Vergleich der gGT-Proteine aus verschiedenen Organismen auch verschiedene Mutanten der *H. pylori* gGT untersucht.

### 3.1.2 Strukturelle Modellierung von gGTs

Phyre (Protein Homology/ Analogy Recognition Engine) ist ein Programm, das aus einer vorgegebenen Proteinsequenz eine 3D-Struktur vorhersagt (Kelly et al., 2009). Hierzu greift es auf die in der SCOP (structural classification of proteins)-Datenbank (Yu et al., 2006) abgelegten Proteinstrukturen zurück, auf welche die Eingabesequenz gefädelt („*Threading*“) wird. Der über das Internet zugängliche Server (siehe 2.7) überprüft, mit welcher Struktur aus der Datenbank die Eingabesequenz am besten kompatibel ist und erstellt auf der Basis dieser Struktur ein Modell.

Hierzu wird zunächst ein sequenzbasiertes Profil (**P**osition **S**pezifische **S**coring-**M**atrix, PSSM) mit dem Programm PSI-BLAST erstellt und mit den Sequenzprofilen der in der SCOP-Datenbank abgelegten Proteine verglichen. Zusätzlich werden Profile zur Sekundärstruktur und Lösungsmittelzugänglichkeit der Reste der Eingabesequenz erstellt und Vergleiche mit denen der Bibliothek durchgeführt. Die Ergebnisse der Profilvergleiche werden anschließend zu einem Gesamtscore zusammengefasst, welcher die Ähnlichkeit zwischen der Eingabe- und Referenzsequenz widerspiegelt (Kelley et al., 2000).



**Abbildung 10:** Darstellung der Reste mit direkter Beteiligung am aktiven Zentrum: HpgGT (blau, 2NQQ), CjgGT (grün, Phyre-Modell), EcgGT (gelb, 2DBU) und HbgGT (orange, Phyre-Modell). Das Fitting wurde mittels Pymol durchgeführt.

Das Vorhandensein mehrerer Referenzstrukturen für  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase-Proteine macht es möglich, für bakterielle gGTs Proteinstrukturen mit hoher Genauigkeit durch Phyre modellieren zu lassen. Bei dem humanen Homolog hingegen ergab sich das Problem, dass es bislang keine veröffentlichte Struktur einer eukaryotischen gGT gibt. Aus diesem Grund ist das Modell der humanen Proteinstruktur nur mit Einschränkungen zu verwenden.

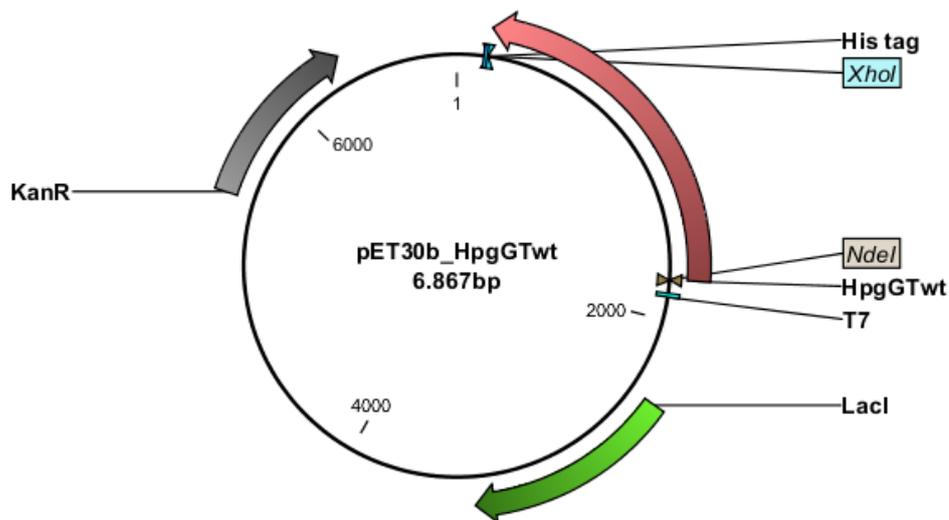
Bei der Überlagerung der Strukturen des aktiven Zentrums der verschiedenen bakteriellen gGTs (Abbildung 10), fallen

insbesondere Unterschiede in der Orientierung des nukleophilen Thr380 und Glu419 auf. Des Weiteren konnte durch die Flexibilität der Loop-Region um Tyr433 keine Übereinstimmung in den Phyre-Modellen zu den bereits publizierten Kristallstrukturen für *H. pylori* gGT und *E. coli* gGT gefunden werden. Trotz der begrenzten Aussagekraft der Modelle, konnten so durch Sequenz- und Strukturvergleiche verschiedene Reste im aktiven Zentrum identifiziert werden, die in biochemischen Analysen der gGT Proteine aus verschiedenen Organismen und verschiedenen Mutanten der *H. pylori* gGT im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden.

### 3.1.3 Heterologe Produktion bakterieller gGTs aus verschiedenen Spezies

Für die Klonierung der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase-Proteine wurde genomische DNA direkt aus den Zielorganismen isoliert. Als Vorlage für die PCR-Amplifikation wurde für *E. coli* die genomische DNA des Expressionstammes BL21DE3, für *C. jejuni* der Stamm 81176 und für *F. tularensis* der Referenzstamm holarctica LVS verwendet. Als Vorlage für die *H. pylori* gGT diente das von Christian Schmees im Rahmen seiner Dissertation klonierte Konstrukt pQETri-HpgGTwt (Schmees, 2006). Für die rekombinante Herstellung der *H. bilis* gGTs wurden die Expressions-Konstrukte im Rahmen einer Kooperation von Dr. Mirko Rossi (Universität Helsinki) zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe der Primer HpgGTFull\_f und HpgGT\_r (siehe Tabelle 1) wurde die komplette Gensequenz für *H. pylori* ggt, sowie mit

den Primern EcgGTFull\_f und EcgGT\_r für *E. coli* ggt amplifiziert und jeweils am 3'-Ende der Genfragmente die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *XhoI*, und am 5'-Ende für *NdeI* angehängt. Um die Löslichkeit und spätere Ausbeute der produzierten Proteine zu erhöhen, wurden zusätzliche Konstrukte hergestellt, die die vorhergesagte Signalsequenz der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen in den amplifizierten Genfragmenten aussparen. Da es sich hierbei nur um einer Verkürzung des 5'-Endes der Gene handelt, konnten für die PCR-Amplifikation die bereits hergestellten reversen Primer für HpgGT und EcgGT verwendet werden. Als Primer wurden für die Genfragmente der *H. pylori* gGT ohne die Aminosäuren Met1 - Ala26 (um 78 Nukleotide verkürzt) die Primer HpgGToS\_f und HpgGT\_r, für *E. coli* gGT ohne die Aminosäuren Met1 - Ser17 (um 51 Nukleotide verkürzt) die Primer EcgGToS\_f und EcgGT\_r, für *C. jejuni* gGT ohne die Aminosäuren Met1 - Ala17 (um 51 Nukleotide verkürzt) die Primer CjgGToS\_f und CjgGT\_r, sowie für *F. tularensis* ggt ohne die Aminosäuren Met1 - Pro46 (um 138 Nukleotide verkürzt) die Primer FtgGToS\_f und FtgGT\_r verwendet. Die PCR-Produkte wurden isoliert, in einem Zwischenschritt direkt in pGEM-T Vektor ligiert und in DH5 $\alpha$  transformiert. Für jedes Konstrukt wurden jeweils acht Klone mit Hilfe einer Screening-PCR mit den Primern T7Prom bzw. SP6 und des jeweiligen reversen Primers der *ggt* analysiert und aus drei positiven Klonen die Plasmid-DNA isoliert. Die Identität des enthaltenen Genfragments wurde durch die Sequenzierung mit den Primern T7Prom und SP6 bestätigt. Nach erfolgtem Restriktionsverdau über die in den Primern vorhandenen Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *XhoI* wurden die Genfragmente (HpgGT: 1638 bp, EcgGT: 1801 bp, CjgGT: 1633 bp, FtgGT: 1681 bp) isoliert und in die Multiple Cloning Side (MCS) des ebenfalls mit *NdeI* und *XhoI* verdauten Vektors pET30b(+) ligiert. Die so erhaltenen Plasmide wurden abschließend mittels einer Restriktionsanalyse überprüft und jeweils ein korrektes Plasmid als pET30b-Konstrukt in der Plasmid-Datenbank hinterlegt.



**Abbildung 11:** Exemplarische Darstellung des Vektors pET30b\_HpgGT. Das bakterielle HpgGT-Gen mit C-terminalem 6x His-Tag befindet sich unter der Transkriptionskontrolle des T7-Promotors. Durch den auf dem Plasmid kodierten *lac* Repressor (*lacI*) und dessen Bindung an den *lac* Operator, kommt es zu einer Unterdrückung der Expression. Als weitere Elemente befinden sich eine Kanamycin-Resistenz und der Replikationsursprung F<sub>1</sub>ori und ColE1 ori der pUC-Plasmidfamilie auf dem Vektor.

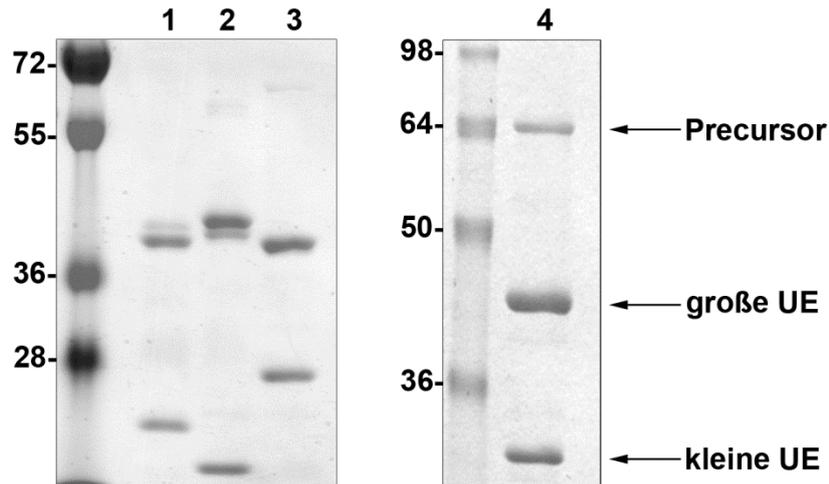
In Abbildung 11 ist exemplarisch der konstruierte Expressionsvektor für die *H. pylori* gGT dargestellt. In den Plasmiden (HpgGT: 6867 bp, EcgGT: 7018 bp, CjgGT: 6850 bp, FtgGT: 6898 bp) steht das Gen unter der Transkriptionskontrolle des T7-Promotors, welcher durch die Zugabe von IPTG direkt induziert wird. Des Weiteren enthalten die pET30b-Konstrukte neben einer Kanamycin-Resistenz zur Selektion auch einen C-terminalen 6xHis-Tag, wodurch die Reinigung und der immunchemische Nachweis der rekombinanten Proteine vereinfacht werden. Durch die Verwendung der Plasmid-vermittelten Kanamycin-Resistenz, im Gegensatz zur Verwendung von Ampicillin zur Selektion, soll eine stabilere Proteinproduktion erreicht werden (Fiedler & Skerra, 2001).

Die verschiedenen bakteriellen gGT-Proteine wurden durch heterologe Genexpression hergestellt. Hierfür wurden mit den zuvor hergestellten Expressions-Konstrukten BL21(DE3) Zellen transformiert und von drei Klonen jeweils Test-Expressionen durchgeführt (Abschnitt 2.2.8). Die Genexpression der in den pET30b-Konstrukten unter der Kontrolle des T7-Promotor stehenden gGT-Proteine wurde durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und die Proteinproduktion nach vier Stunden bei 37°C mittels SDS-Page überprüft. Für die Expression der Volllängen-Proteine konnte auch durch Variation der Expressionsbedingungen nur ein sehr geringer Anteil von ca. fünf bis zehn Prozent an löslichem Protein generiert werden. Im Gegensatz hierzu befanden sich 60 bis 80 % der verkürzten Proteine in der Analyse mittels SDS-Page im löslichen Teil des Zellextraktes.

Aus diesem Grund wurde im Folgenden ausschließlich mit den verkürzten gGTs gearbeitet. Von jeweils einem Klon mit der besten Induktion der Produktion wurden Glycerin-Kulturen angelegt und bei -80°C gelagert.

Die Produktion der bakteriellen gGTs wurde im 6 Liter-Maßstab, wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben, durchgeführt. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 28°C wurden die Zellen geerntet. Die OD<sub>600nm</sub> bei Ernte lag zwischen 1,3 und 1,6.

Alle Proteine bis auf HbgGT TypII, welches im unlöslichen Teil des Zellextraktes vorlag, wurden nach dem Zellaufschluss mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (Abschnitt 2.5.3.1) gereinigt, wobei der C-terminale His-tag verwendet wurde. Auf eine enzymatische Abspaltung des Tags wurde in dieser Arbeit verzichtet, da aus der Literatur keine Beeinflussung des Tags auf die enzymatische Aktivität im Vergleich zu den hier gereinigten Proteinen festgestellt werden konnte. Nach einer Dialyse gegen den Gelfiltrationspuffer (100 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 2,5 % Saccharose) über Nacht zum Entfernen des Imidazols, wurde als zweiter Reinigungsschritt eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Für HbgGT TypII wurde durch Rückfaltung (siehe Abschnitt 2.5.4) lösliches Protein erhalten, wobei keine Autoprozessierung und enzymatische Aktivität detektiert werden konnte. Um ein Rückfaltungsartefakt auszuschließen, wurden zusätzlich mit dem rekombinant hergestellten Protein polyklonale Antikörper in der Maus hergestellt (durchgeführt von Florian Anderl) und die native Situation in *Helicobacter bilis* im Rahmen dieser Arbeit mittels Westernblot-Analyse untersucht (Rossi et al., 2012). Hierbei konnten im bakteriellen Lysat mit den Antikörpern gegen HbgGT TypI die Autoprozessierung des Proteins nachgewiesen werden, wohingegen HbgGT TypII keine Autoprozessierung aufwies. Im Folgenden wurden alle Experimente nur mit HbgGT TypI durchgeführt. Bei allen Reinigungen wurde eine Reinheit der Proteine von 85 bis 95% erreicht, welche mittels SDS-Analyse abgeschätzt wurde (Abbildung 12).



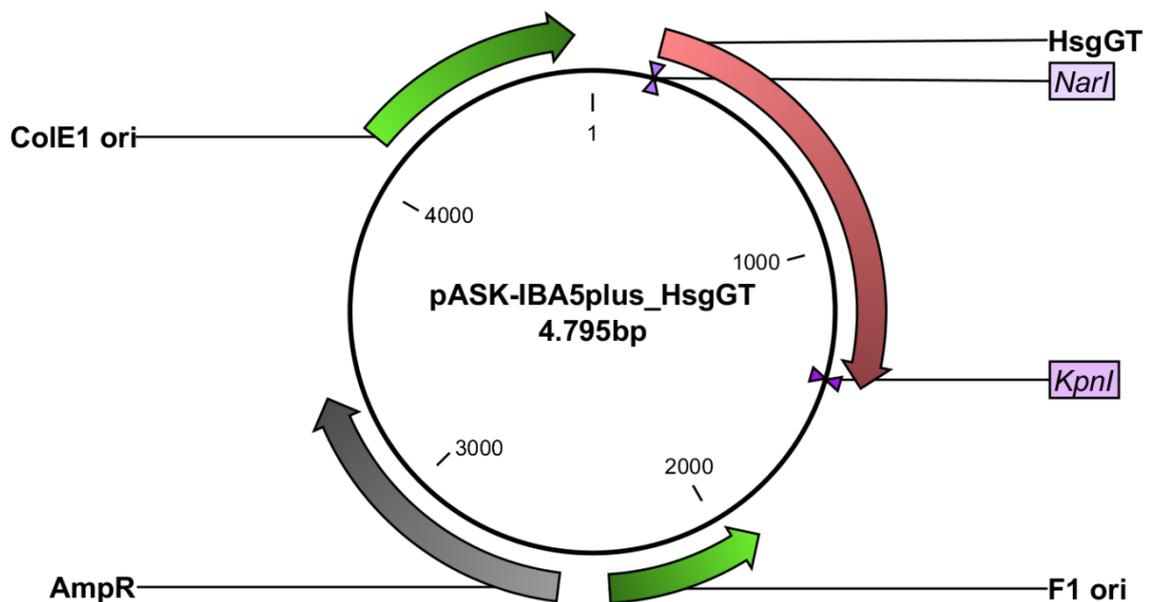
**Abbildung 12:** SDS-Page Analyse der Reinheit der rekombinant hergestellten gGTs. Aufgetragen wurden je Spur 1  $\mu$ g CjgGT (1), FtgGT (2), EcgGT (3) und HpgGT (4)

Für die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase aus *C. jejuni* und *F. tularensis* wurde in einigen Reinigungen eine schwache Doppelbande im Bereich der großen Untereinheit der Proteine detektiert. Nachdem diese Bande nur in einigen Chargen auftrat und mit der Dauer der Reinigung bis zur Analyse korrelierte, liegt der Schluss nahe, dass es sich bei diesen Banden um Abbauprodukte des Proteins handelt. Für die produzierten Proteine wurde die Konzentration sowohl photometrisch als auch mittels BCA-Assay ermittelt und die enzymatische Aktivität bestimmt. Im Einzelnen betragen die Ausbeuten für die Proteine HpgGT 10 mg, für HbgGT TypI 2.0 mg, für CjgGT 1,4 mg, für EcgGT 2,5 mg und für FtgGT 1,8 mg pro Liter Expressionskultur. Die Proteine wurden anschließend aliquotiert und entweder direkt in Versuchen verwendet oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert.

### 3.1.4 Konstruktion der Expressions-Vektoren, heterologe Produktion und Reinigung der humanen gGT

Um eine differenzielle Betrachtung des Mechanismus der bakteriellen gGTs zu erhalten und um im weiteren Verlauf dieser Arbeit Spezies-spezifische Inhibitoren identifizieren zu können, wurde zusätzlich die *H. sapiens* gGT kloniert und gereinigt. Für die Klonierung der humanen  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase TypI wurde zunächst die genomische DNA aus humanen Zelllinien isoliert. Als Template für die anschließende PCR-Amplifikation wurde die aus der humanen Hepatoma-Zelllinie Huh7 hergestellte cDNA verwendet. Da es sich bei dem humanen Enzym um ein Membranprotein handelt, wurden die Primer so gewählt, dass das Genfragment ohne den vorhergesagten Membrananker zwischen Met1 - Ser28 (-84 bp) amplifiziert wird.

Für die bakterielle Produktion der humanen  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase wurden mittels der Primer pASK\_HsgGT\_f und pASK\_HsgGT\_r das entsprechende Genfragment amplifiziert und die Restriktionserkennungssequenzen für *NarI* am 5'-Ende und für *HindIII* am 3'-Ende angefügt. Über den bereits beschriebenen Zwischenschritt in pGEM-T und die Analyse der erhaltenen Klone, wurden der bestätigte Klon 8 das Genfragments und der Zielvektor pASK-IBA5plus mit den Restriktionsenzymen *NarI* und *HindIII* verdaut, isoliert und ligiert. Die Transformation wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  durchgeführt. Es wurden acht Klone mittels PCR auf korrekte Ligierung durch die Verwendung der Primerpaare T7Prom und pASK\_HsgGT\_r, sowie T7Prom und T7term getestet und von drei korrekten Klonen die Plasmid-DNA isoliert. Diese wurde anschließend mittels Restriktionsverdau analysiert und ein Klon mittels Sequenzierung überprüft. Dieses Konstrukt (4795 bp), welches als pASK\_HsgGT bezeichnet ist (Abbildung 13), wurde in *E. coli* BL21 transformiert. Das Gen der gGT mit angehängtem *Strep*-tag steht in diesem Konstrukt unter der direkten Transkriptionskontrolle des *tet*-Promotors (Skerra, 1994b), welcher im Vergleich zum T7-Promotor System eine deutlich geringere Basalsynthese des Proteins aufweist.

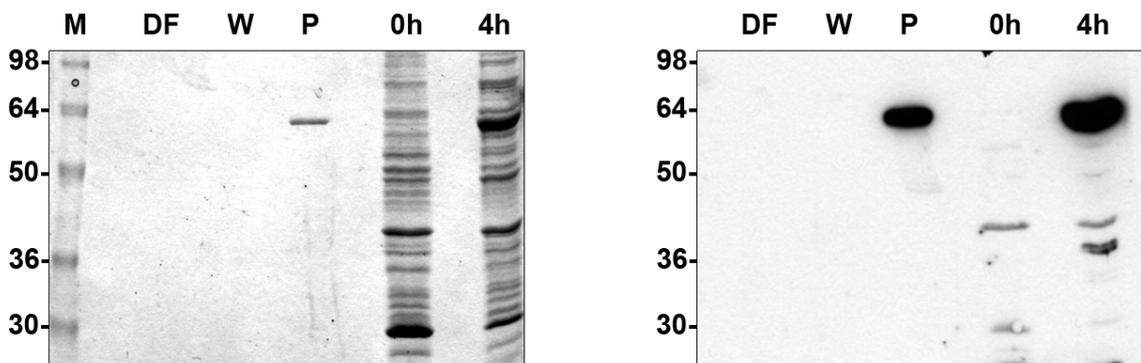


**Abbildung 13:** Darstellung des Vektors pASK-IBA5plus\_HsgGT. Das humane *ggt*-Gen mit N-terminalem *Strep*-tag II befindet sich unter der Transkriptionskontrolle des *tet*-Promotors. Als weitere Elemente befinden sich eine Ampicillin-Resistenz und der Replikationsursprung F1 ori und ColE1 ori der pUC-Plasmidfamilie auf dem Vektor.

Es wurden fünf Klone auf Produktion der humanen gGT in einer Testexpression überprüft. Hierbei lag die gGT im unlöslichen Teil des Zellextraktes vor, welches durch Variation der Kulturbedingungen (Temperatur und Induktion) nicht verbessert werden konnte. Von Klon 1 wurden Glycerin Kulturen angelegt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Produktion der humanen  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase in *E. coli* BL21 wurde im sechs Liter Maßstab, wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben, durchgeführt. Induziert wurde die Proteinproduktion durch die Zugabe von aTc mit einer Endkonzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  bei  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,5. Nach vierstündiger Inkubation bei 28°C wurden die Zellen geerntet und die Pellets bis zum Aufschluss und der Reinigung bei -20°C gelagert.

Da bei der Produktion zwar eine deutliche Induktion nach vier Stunden beobachtet wurden, jedoch das gesamte Protein in *inclusion bodies* vorlag, wurden der Aufschluss und die Rückfaltung, wie in Abschnitt 2.5.4 beschrieben, vorgenommen. Nach Rückfaltung der gGT wurde eine Streptavidin-Affinitäts- mit anschließender Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Die jeweiligen Fraktionen und das gereinigte Protein wurde mittels SDS-Page und Western-Blot analysiert (Abbildung 14). Für die bakteriell hergestellte humane gGT konnten sowohl im Western-Blot als auch auf dem SDS-Gel nur das Vorläufer-Protein mit einer Größe von 59.8 kDa, jedoch keine durch Autoprozessierung des *Precursors* entstandenen Untereinheiten (erwartete Größe: 39.8 kDa & 20.0 kDa) detektiert werden.



**Abbildung 14:** Analyse der HsgGT-Reinigung nach Streptavidin-Affinitätschromatografie mittels SDS-Gel (links) und Western-Blot (rechts): M: Protein-Marker, DF: Durchfluss, W: Waschfraktionen, P: gereinigtes Protein nach Gelfiltration, 0 h: Zelllysate vor Induktion und 4 h: Zelllysate nach Induktion mit aTc.

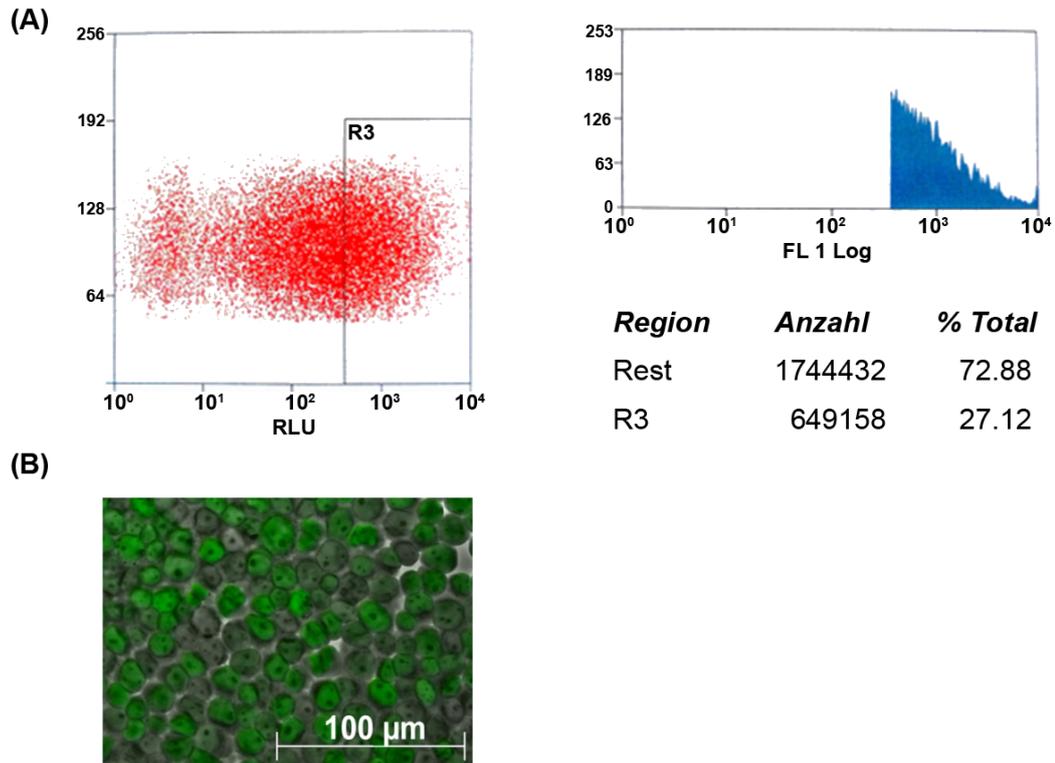
Zwar konnte die Autoprozessierung auch nicht durch Verwendung unterschiedlicher Rückfaltungsprotokolle erzielt werden, jedoch konnte bei der Optimierung der Rückfaltung die Aktivität von 0,05 U/mg auf 5,2 U/mg erhöht werden (siehe Tabelle 6). Die Konzentration des Proteins wurde photometrisch bestimmt und die HsgGT anschließend aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

**Tabelle 6:** Optimierung der HsgGT-Rückfaltung. Mit \* markierte Pufferbedingungen führten zur höchsten gGT-Aktivität und wurden für weitere Experimente verwendet

<i>Denaturierung</i>	
<i>1*</i>	6.0 M GuaCl pH 3.0
2	3.0 M GuaCl pH 4.0, 10 mM EDTA, 10 mM NaAc
<i>Rückfaltung</i>	
1	1x PBS pH 7.4
2	100 mM Tris/HCl pH 8.0, 400 mM L-Arginin, 2 mM EDTA, 0.5 mM oxid. Glutathion, 5 mM red. Glutathion
<i>3*</i>	100 mM HEPES pH 8.0, 10 % Glycerol, 250 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub>

Nachdem auch mittels Rückfaltung keine Aktivierung des Proteins etabliert werden konnte, wurde das Expressionssystem gewechselt. Um der Problematik fehlender Glykosylierung bei bakterieller Produktion zu begegnen, wurde ein Plasmid zur rekombinanten Expression in humanen Zelllinien generiert. Die Besonderheit bei diesem Konstrukt ist die Produktion equimolarer Mengen des Zielproteins und des Fluoreszenz-Markerproteins Venus, welche über eine 2A-Sequenz getrennt werden. Bei der Amplifikation des Genfragments (identisch zu dem Fragment des bakteriellen Konstrukts) wurden über das Primerpaar E033\_HsgGT\_f und E033\_HsgGT\_r die Restriktionsschnittstellen *NotI* (5'-Ende) und *AscI* (3'-Ende) angehängt. Als Template wurde das bereits bestätigte Konstrukt pASK\_HsgGT verwendet und durch den Primer E033\_HsgGT\_f zusätzlich zum *ggt* Gen der N-terminale *Strep*-tag II des pASK-IBA5plus Vektors eingefügt. Durch die Verwendung der Restriktionsschnittstellen *NotI* und *AscI*, welche kompatibel zur *MluI* Schnittstelle des Vektors E033 ist, konnte das Genfragment in der MCS C-terminal direkt vor die bereits vorhandene 2A-Sequenz und das *venus* Gen fusioniert werden. Die Ligation wurde zur Plasmid-Amplifikation in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und aus 5 Klonen Plasmid-DNA isoliert. Zur Analyse der Plasmide wurden ein Restiktionsverdau mit *BamHI* und *EcoRV* durchgeführt und Klon 2 mittels Sequenzierung mit den Sequenzierprimern pCAG\_f und EGFP\_N\_r sowie den Klonierungsprimern bestätigt. Dieser Vektor wurde als E033\_HsgGT(Strep) (9278 bp) bezeichnet (Abbildung 15).

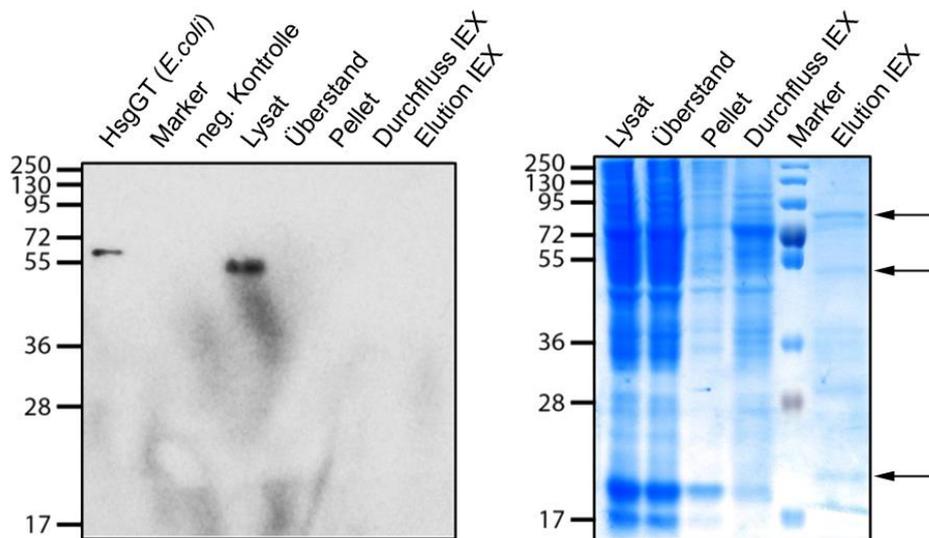




**Abbildung 16:** (A) FACS Sortierung der transient transfizierten Jurkats mit dem Plasmid E033\_HsgGT(Strep). Detektion der Fluoreszenz bei Anregung von 515 nm und Emission bei 528 nm. (B) Aufnahme mittels Fluoreszenzmikroskop.

Neben der FACS-Analyse wurden die transfizierten Zellen mittels Western-Blot und Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Unter dem Mikroskop kann eine starke Fluoreszenz der Zellen durch das zur HsgGT äquimolar produzierte Venus beobachtet werden, die in der Kontroll-Zelllinie fehlt (Abbildung 16). Im Western-Blot wurde eine deutliche Bande auf der erwarteten Höhe von 60 kDa über das angehängte *Strep*-tag II mittels Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat detektiert (Abbildung 17).

Für die Reinigung der rekombinant hergestellten HsgGT wurden die transfizierten Jurkat-Zellen geerntet und nach Aufschluss (siehe 2.2.8) mittels einer Streptavidin-Affinitätschromatographie über den an das Protein N-terminal angehängten *Strep*-tag II gereinigt. Jedoch konnte bei diesem Chromatographie-Schritt keine Bindung des Proteins an das Säulenmaterial erreicht werden. Die enzymatische Aktivität wurde im Auftrag und im Durchfluss detektiert, nicht jedoch im Eluat. Aus diesem Grund wurde als Capture-Schritt eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Die jeweiligen Fraktionen wurden mittels SDS-Page und Western-Blot analysiert (Abbildung 17) und auf enzymatische Aktivität untersucht.



**Abbildung 17:** Analyse der Reinigung mittels Western-Blot (linke Abbildung) und SDS-PAGE (rechte Abbildung)

Bislang konnte keine deutliche Überexpression der HsgGT in den verwendeten Zelllinien erreicht und keine Anreicherung bzw. Reinigung etabliert werden. Die Produktion rekombinanter humaner gGT wird im Anschluss an diese Arbeit fortgeführt.

Als Alternative wurde neben den rekombinant hergestellten Proteinen auch native humane  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase aus der humanen Hepatoma-Zelllinie Huh-7 isoliert und gereinigt (adaptiert von Selvaraj et al. 1985). Hierzu wurde das Membranprotein mit Natriumdeoxycholat solubilisiert, gegen den IEX-Puffer (50mM Tris/HCl pH 7.5, 2 % Triton X-100) über Nacht mit zweifachem Pufferwechsel bei 4°C dialysiert und anschließend in einem ersten Reinigungsschritt mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Die erhaltenen Fraktionen wurden sowohl mittels SDS-Page, als auch auf enzymatische Aktivität analysiert (siehe Anhang). Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und der Membran-Anker durch einen partiellen Papain-Verdau abgetrennt. Hierdurch verbesserte sich die Löslichkeit des Proteins und die anschließenden Reinigungsschritte konnten ohne Detergenz durchgeführt werden. Abschließend wurden eine analytische Gelfiltrationschromatographie durchgeführt und aktive Fraktionen erneut vereinigt.

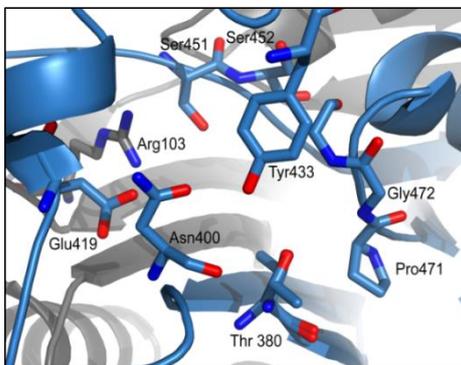
Beim Vergleich der verschiedenen Expressions- und Reinigungsmethoden sind die Ausbeuten im bakteriellen System mit ca. 0,5 mg pro Liter Kultur deutlich besser als in den humanen Zellen (Transfektion mit E033\_HsgGT: 0,2 mg aus  $5 \times 10^{10}$  Zellen; nativ aus Huh-7: 0,1 mg aus  $1 \times 10^{12}$  Zellen). Jedoch findet keine Autoproteolyse der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase bei bakterieller Produktion statt, welche für die enzymatische Aktivität des Proteins wichtig ist. Auf diesen Aspekt wird in Abschnitt 3.1.6 näher

eingegangen. Die Reinheit der Proteine wurde über SDS-Page abgeschätzt und lag bei den rekombinanten Proteinen bei mehr als 90 % (*E. coli*) bzw. bei weniger als 20 % (Jurkat), bei der nativen Reinigung aus Huh-7 Zellen wurde eine Reinheit von ca. 80 % erreicht.

### 3.1.5 Präparierung von Punktmutanten der *Helicobacter pylori* gGT

Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung der Bedeutung einzelner Aminosäuren im aktiven Zentrum der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen, zum Vergleich der bakteriellen und der humanen gGT, verschiedene Punktmutationen der *H. pylori* gGT hergestellt.

Hierzu wurde anhand des multiplen Alignements (Abbildung 9) und der bereits gelösten Kristallstruktur (PDB: 2NBQO) Reste identifiziert, die durch ihre räumliche Anordnung und besondere Merkmale, z. B. der Ladung oder sterischen Hinderung, für eine detaillierte Analyse interessant erschienen. Für die Mutationsanalyse wurden die Aminosäuren Thr380, P471, Tyr433, Glu419 und Ser451 ausgewählt (Abbildung 18). Bei Thr380 handelt es sich um den nukleophil angreifenden Rest im aktiven Zentrum, der eine essentielle Rolle in der Autoprozessierung und der katalytischen Aktivität der gGT übernimmt. Anstelle des Pro471 weist das humane Homolog ein Alanin auf, welches eventuell für unterschiedliche Spezifitäten und Aktivitäten der Enzyme verantwortlich sein könnte. Um den Einfluss räumlicher Orientierung bzw. sterischen Hinderung und Ladung auf die enzymatische Aktivität und den hemmenden Effekt auf die T-Zell-Proliferation genauer zu untersuchen, sollten die Mutanten Thr380Ala (Entfernen der gesamten Seitenkette), Thr380Ser (Veränderung der Ladungspositionierung) und Thr380Val (Entfernen der Ladung), sowie Pro471Ala hergestellt werden.

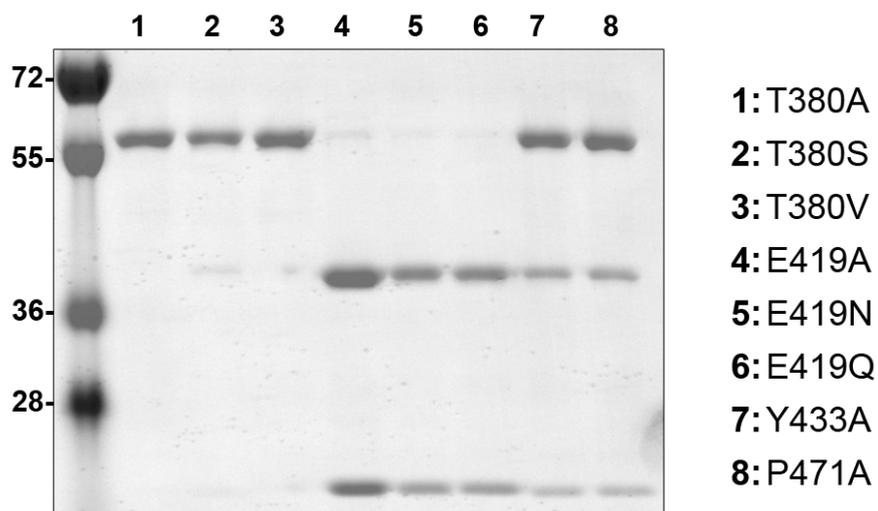


**Abbildung 18:** Darstellung des aktiven Zentrums der *H. pylori* gGT anhand der Kristallstruktur 2NBQO

Die Aminosäure Glu419 in einer Region mit hoher Flexibilität identifiziert. Hinzu kommt, dass sich an dieser Stelle bei *E. coli* gGT eine Punktmutation zu Asp befindet, welche eventuell zu einer Veränderung in der Spezifität bzw. Aktivität führen könnte. Um die Bedeutung dieser Aminosäure genauer

Thr380Ser (Veränderung der Ladungspositionierung) und Thr380Val (Entfernen der Ladung), sowie Pro471Ala hergestellt werden. Die Aminosäure Tyr433 befindet sich in einer flexiblen Loop-Region im aktiven Zentrum und könnte bezüglich der enzymatischen Aktivität eine wichtige Rolle spielen. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, sollte die Mutante Tyr433Ala hergestellt werden. Bei der Analyse der Kristallstruktur der gGT aus *H. pylori* wurde die Aminosäure Glu419 in einer Region mit hoher

zu untersuchen, sollten die Mutanten Glu419Ala, Glu419Asn und Glu419Asp hergestellt und analysiert werden. Für Ser451 und Ser452 existiert bereits eine Doppelmutante, die im Rahmen einer Dissertation (Schmees, 2006) in diesem Labor hergestellt wurde. Da diese Mutante eine starke Reduktion der Aktivität und keine Hemmung der T-Zell-Proliferation aufweist, sollte nun der Effekt einer einzelnen Punktmutation (Ser451Ala) untersucht werden. Für die Klonierung der Punktmutanten wurde das in der Dissertation klonierte Konstrukt pQETri-HpgGTwt (Schmees *Dissertation*, 2006) als Vorlage verwendet. Zunächst wurden alle Konstrukte im Gateway-System hergestellt und dann zur besseren Vergleichbarkeit in der Produktion und der nativen gGT, welche sich bereits in pET-Vektoren befanden, auf das pET-System umgestellt. Durch den Transfer konnten zusätzlich die durch das Gateway-System angehängten Aminosäuren eliminiert werden. Hierzu wurden für die einzelnen Punktmutanten, wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben, Quickchange-PCRs zum Einfügen des jeweiligen Austausches einer Aminosäure durchgeführt. Anschließend wurde in einer zweiten PCR das jeweilige Genfragment mit dem Primerpaar HpgGTtoS\_f und HpgGT\_r amplifiziert und die Restriktionsschnittstellen *Nde*I (5'-Ende) und *Xho*I (3'-Ende) angehängt.



**Abbildung 19:** SDS-Page basierte Reinheitsanalyse der rekombinant hergestellten Punktmutanten der *H. pylori* gGT.

Sowohl bei den Konstrukten im Gateway-System im Vektor pDEST17 als auch im finalen Vektor pET30b wurde an die Genfragmente ein C-terminaler 6xHis-Tag fusioniert. Die erste Anreicherung der rekombinant hergestellten Punktmutanten der HpgGT wurde so mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (Abschnitt 2.5.3.1) durchgeführt, wobei auf eine enzymatische Abspaltung des Tags verzichtet wurde. Nach Dialyse gegen den Gelfiltrationspuffer wurde als zweiter Reinigungsschritt eine Gelfiltrations-

chromatographie durchgeführt, die zu einer Reinheit aller Proteine von 85 bis 95 % führte (mittels SDS-Analyse abgeschätzt; Abbildung 19). Hierbei ist zu beachten, dass für die Punktmutanten von Threonin380 (T380A: 0%, T380S: 15% und T380V: 10% Prozessierung), sowie von Tyrosin433 und Prolin471 (Y433A: 40% und P471A: 40% Prozessierung) keine bzw. stark verminderte Autoprocessing beobachtet wurde. Diese Beobachtungen decken sich auch mit in der Literatur beschriebene fehlende Autoprocessing der Punktmutante Threonin380A. Für die Punktmutanten von Glutamat419 wurde vollständige Autoprocessing erreicht. Die Konzentration der hergestellten Proteine wurde photometrisch und die enzymatische Aktivität mittels gGpNA-Assay bestimmt. Hierbei konnten Ausbeuten von 0,4 bis 5 mg pro Liter Expressionskultur erzielt werden. Die Proteine wurden anschließend aliquotiert und entweder direkt in Versuchen verwendet oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.1.6 Funktionelle und enzymkinetische Charakterisierung der gGTs

Um die katalytische Aktivität, die für die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen beschrieben ist, zwischen den einzelnen Enzymen zu vergleichen, wurden zunächst die kinetischen Parameter der Transpeptidase-Reaktion detailliert untersucht.

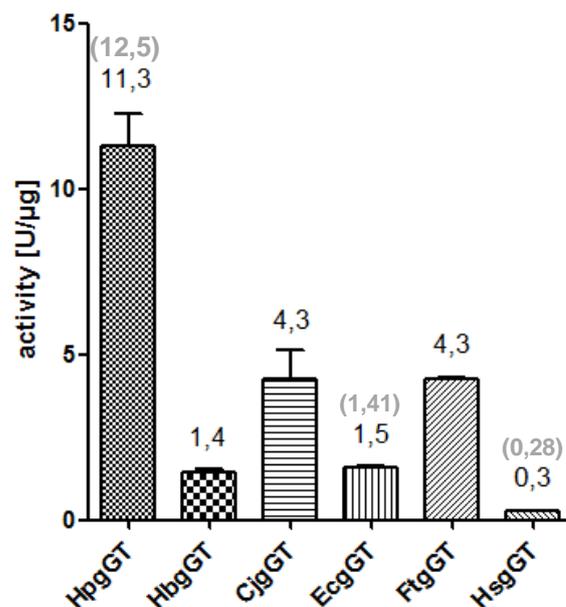
In der Transpeptidase-Reaktion kann die Abspaltung und Übertragung des  $\gamma$ -Glutamyl-Restes des Modell-Substrats  $\gamma$ -Glutamyl-*p*-Nitroanilids (gGpNA) photometrisch gemessen werden. Für die Kinetiken wurde die Reaktion bei  $37^{\circ}\text{C}$  und pH 8.0 für dreißig Minuten gemessen und anschließend mittels Michaelis-Menten-Modell die kinetischen Parameter bestimmt (siehe Abschnitt 2.6.1). Die Darstellung und Berechnung wurde mittels der integrierten Funktion zur Auswertung enzymatischer Kinetiken in GraphPad Prism durchgeführt (siehe Anhang). Aus diesen Messungen ergaben sich die in Tabelle 7 aufgeführten Parameter für die unterschiedlichen Enzyme.

**Tabelle 7:** Kinetische Parameter der gGTs verschiedener Spezies

gGT	$K_m^{\text{gGpNA}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}$ [ $10^2 \text{ min}^{-1}$ ]	$\frac{k_{\text{cat}}^{\text{HpgGT}}}{k_{\text{cat}}^{\text{gGT}}}$
<i>H. pylori</i>	$9,8 \pm 1,5$	$17,4 \pm 0,5$	-
<i>H. bilis</i>	$7,7 \pm 1,2$	$1,1 \pm 0,03$	15,8
<i>C. jejuni</i>	$18,6 \pm 2,7$	$2,8 \pm 0,1$	6,2
<i>E. coli</i>	$5,7 \pm 1,5$	$0,76 \pm 0,08$	22,9
<i>F. tularensis</i>	$396 \pm 170$	$3,5 \pm 0,5$	5,0
<i>H. sapiens</i>	$678 \pm 231$	$0,14 \pm 0,02$	124,3

Vergleicht man nun die Aktivität der gGTs mit der des Enzyms aus *Helicobacter pylori*, so fällt insbesondere der Unterschied zwischen HpgGT und der humanen gGT von über zwei  $\log_{10}$ -Stufen im  $k_{\text{cat}}$  und dem deutlich erhöhten  $K_m$  für das Substrat gGpNA bei FtgGT und HsgGT auf.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zu den bereits publizierten Werten zu erhalten, wurden aus den bereits beschriebenen  $k_{\text{cat}}$ -Werten sowie als Vorversuch für alle Inhibitorstudien, aus der Umsatzrate des gGpNAs die spezifische Aktivität für die gGTs berechnet und in Abbildung 20 grafisch dargestellt.



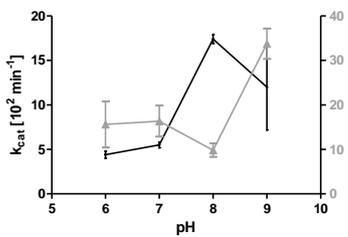
**Abbildung 20:** Vergleich der enzymatischen Aktivität der gGTs aus verschiedenen Spezies. Die Kinetiken der gGpNA-Umsetzung wurden bei 37°C über 15 Minuten am Mithras LB 940 aufgenommen. Die schwarzen Zahlen repräsentieren die gemessenen spezifischen Aktivitäten in U/µg. Die grauen Zahlen sind publizierte Werte für HpgGT (Boanca et al., 2006), EcgGT (Suzuki et al., 1986) und die humane gGT (West et al., 2011).

Die spezifischen Aktivitäten der gGTs lagen zwischen 0,3 U/µg für die humane gGT und 11,3 U/µg für die HpgGT. Vergleicht man die für die HpgGT (Boanca et al., 2006b), EcgGT (Suzuki et al., 1986) und die humane gGT (West et al., 2011) publizierten Werte mit den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Parametern, so konnten für alle drei gGTs übereinstimmende Werte ermittelt werden.

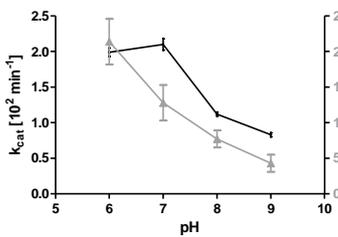
Da der hier verwendete enzymatische Assay für die kinetische Analyse der humanen gGT etabliert wurde (Meister et al., 1981) und somit nicht davon ausgegangen werden konnte, dass die Reaktionsbedingungen dieser Methode für die unterschiedlichen gGTs optimal sind, wurde zunächst eine Untersuchung der pH-Optima durchgeführt. Der bereits in den

bisherigen kinetischen Analysen beschriebene Assay wird in 100 mM Tris/HCl pH 8.0 durchgeführt. Für die Analyse der pH-Abhängigkeit der gGT-Aktivität wurde der Assay nun in einem pH-Bereich zwischen pH 6.0 und pH 9.0 durchgeführt. Um die Pufferkapazität zu erhalten, wurden hierbei für den pH-Bereich zwischen pH 6.0 und 7.5 HEPES und für den Bereich zwischen pH 7.5 und pH 9.0 Tris als Puffersubstanz verwendet.

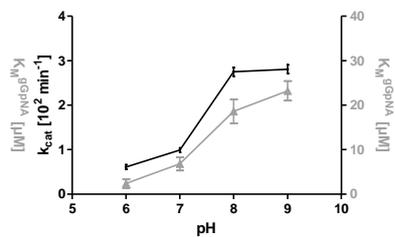
(A) HpgGT



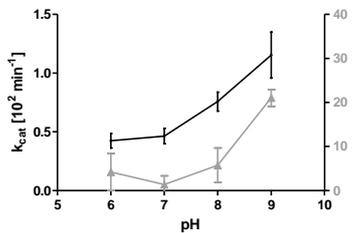
(B) HbgGT



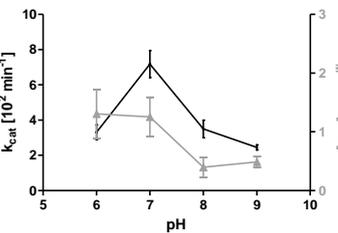
(C) CjgGT



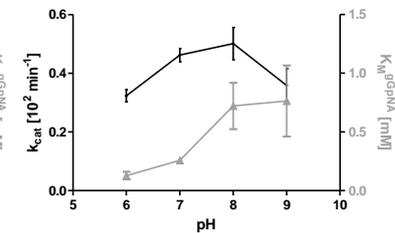
(D) EcgGT



(E) FtgGT



(F) HsgGT

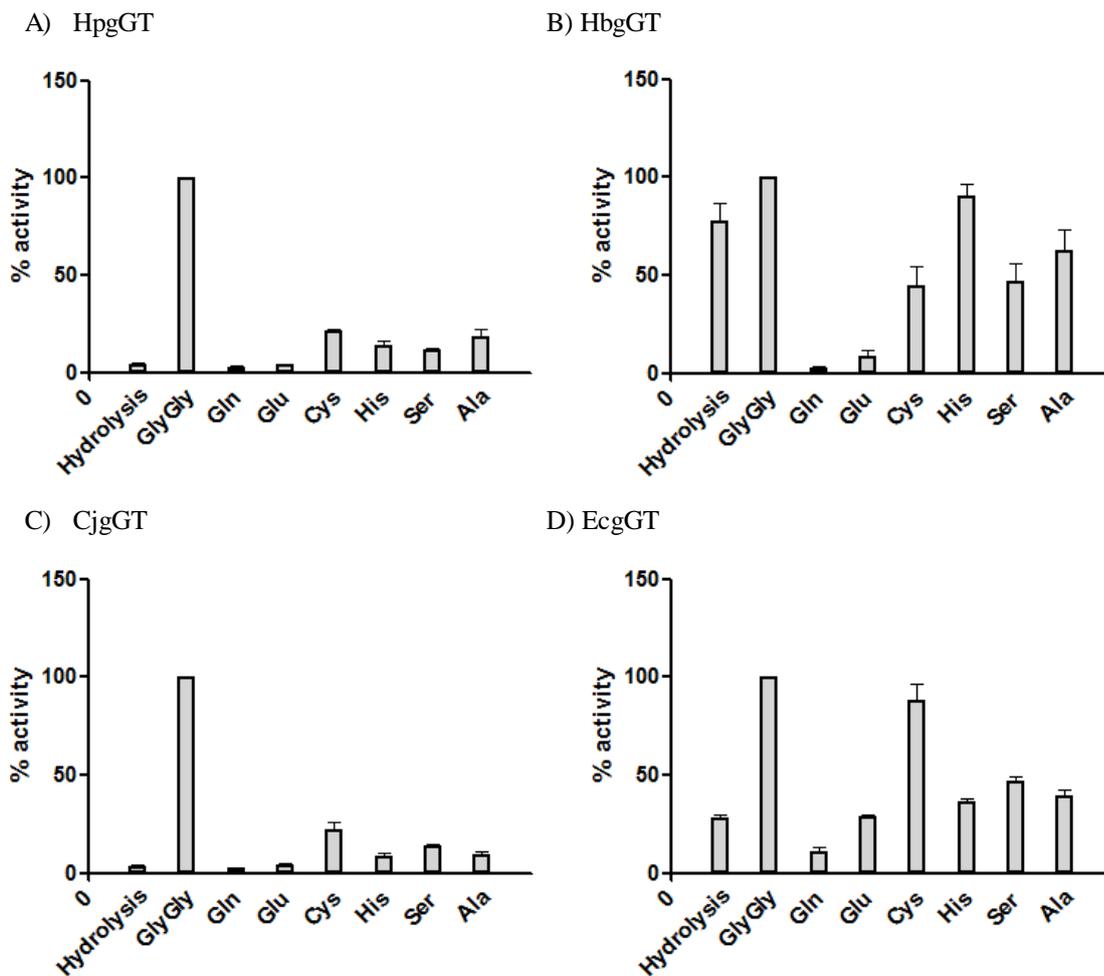


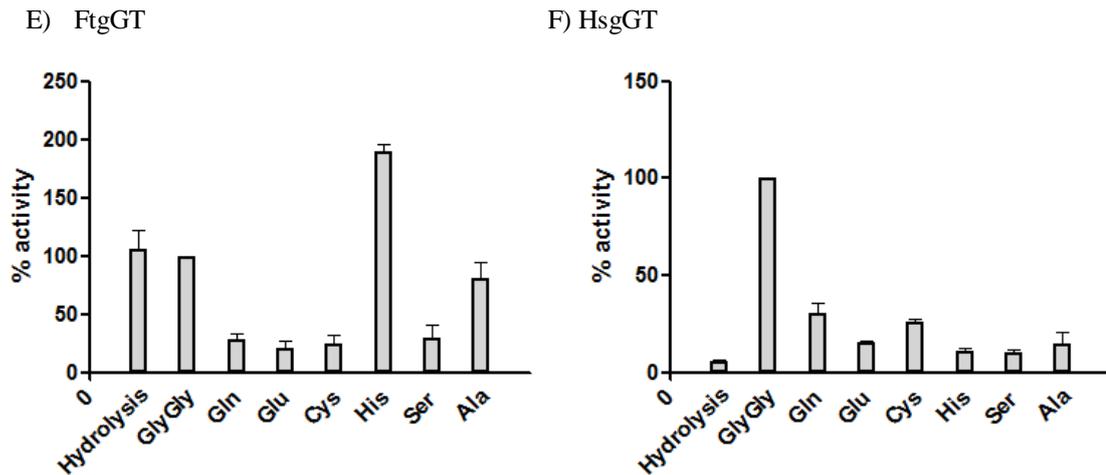
**Abbildung 21:** Analyse der gGT-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes und Vergleich der verschiedenen Spezies. Für den Aktivitäts-Assay wurden jeweils 25 ng HpgGT (A), 200 ng HbgGT (B), 200 ng CjgGT (C), 500 ng EcgGT (D), 200 ng FtgGT (E) und 1000 ng HsgGT (F) eingesetzt und die kinetischen Parameter mittels Graphpad Prism analysiert.

Für HpgGT konnte eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 4 im basischen und eine damit verbundene Erhöhung des  $K_m^{\text{gGpNA}}$ -Wertes von 10  $\mu\text{M}$  auf über 30  $\mu\text{M}$  bei pH 9.0 beobachtet werden. Die bislang verwendeten Reaktionsbedingungen bei pH 8.0 ergaben hierbei die höchste Aktivität. Eine ähnliche Abhängigkeit der Aktivität konnte für CjgGT und EcgGT gemessen werden, wobei der  $K_m^{\text{gGpNA}}$ -Wert (CjgGT: 5 bis 25  $\mu\text{M}$  und EcgGT: 2 bis 20  $\mu\text{M}$ ) mit zunehmendem pH kontinuierlich ansteigt. Im Gegensatz dazu weisen die Enzyme HbgGT ( $k_{cat}$ -Werte 2.0 von bei pH 6.0 auf  $1.0 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$  bei pH 9.0) und FtgGT ( $k_{cat}$ -Werte von 20 bei pH 6.0 auf  $6 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$  bei pH 9.0) eine um den Faktor von mehr als zwei verminderte Aktivität im basischen Milieu auf. Der  $K_m^{\text{gGpNA}}$ -Wert der HbgGT sinkt kontinuierlich ab; für FtgGT dagegen kann nur zwischen saurem und basischem Milieu eine Veränderung des  $K_m^{\text{gGpNA}}$ -Wertes um den Faktor Zwei beobachtet werden. Für die HsgGT wurde eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor

Vier ( $k_{\text{cat}}$ -Werte 0.07 von bei pH 6.0 auf  $0.27 \times 10^2 \text{ min}^{-1}$  bei pH 9.0) im basischen gemessen. Parallel zu dieser Zunahme konnte eine Erhöhung des  $K_m^{\text{GpNA}}$ -Wertes von 0.2 mM auf über 1.0 mM bei pH 9.0 beobachtet werden (Abbildung 21).

Im Weiteren wurde die Akzeptor-Spezifität der verschiedenen gGTs miteinander verglichen. In dem Standard-Assay wird das Dipeptid Diglycin (GlyGly) in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 20 mM verwendet. Da für die gGTs verschiedene biologische Funktionen zur Diskussion stehen und auch Unterschiede im katalytischen Zentrum auf unterschiedliche Spezifitäten hindeuten, wurden verschiedene Aminosäuren als Akzeptor-Substanzen kinetisch untersucht.



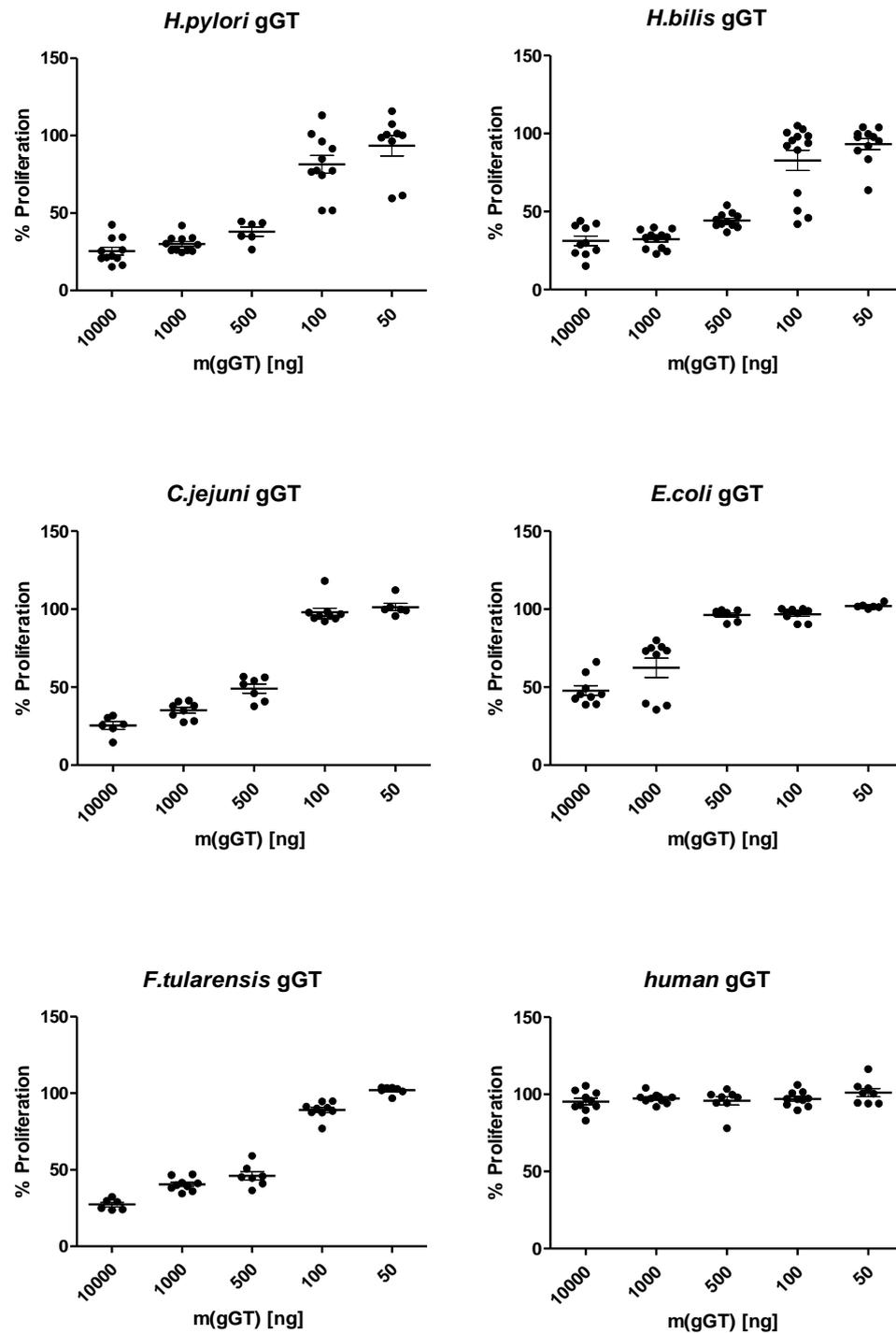


**Abbildung 22:** Vergleich der enzymatischen Aktivität der gGTs unter Verwendung unterschiedlicher Akzeptor-Moleküle. Die Kinetiken der gGpNA-Umsetzung wurden bei 37°C über 15 Minuten am Mithras LB 940 aufgenommen. Alle Umsatzraten wurden auf GlyGly normiert und in Graphpad Prism dargestellt.

Für die gGTs von *H. pylori*, *C. jejuni* und das humane Enzym zeigen bei der Transpeptidierungs-Reaktion die besten Umsatzraten mit GlyGly (Abbildung 22). Alle Umsatzraten wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf GlyGly normiert. Bei diesen drei gGTs findet außerdem ohne ein Akzeptor Molekül kaum Hydrolyse statt (HpgGT: 4,4 %, CjgGT: 3,4 % und HsgGT: 6,0 % der GlyGly-Aktivität). Für EcgGT steigt bereits die Hydrolyse-Aktivität des Enzyms auf 28,1 % an, wobei bei HbgGT und FtgGT kein Unterschied zwischen der Hydrolyse und der Transpeptidierung gemessen werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass diese Enzymklasse auch Hydrolase-Aktivität besitzt, bei der als Akzeptor ein Wassermolekül dient bzw. eine Autotranspeptidierung, die bei hohen Substrat-Konzentrationen auftreten kann. Diese beiden alternativen Reaktionswege wurden in dieser Arbeit für den kinetischen Vergleich der gGTs nicht weiter untersucht, da es sich bei der Hydrolyse-Reaktion der HpgGT um eine vernachlässigbare Nebenreaktion handelt. Des Weiteren konnte eine vergleichbare gGpNA-Umsatzrate für EcgGT bei Verwendung von Cystein (88,5 % der GlyGly-Aktivität) und eine deutlich gesteigerte Umsatzrate durch den Einsatz von Histidin bei der FtgGT (189,8 % der GlyGly-Aktivität) erzielt werden. Für EcgGT kann eine Rolle des Enzyms in der Glutathion-Biosynthese diskutiert werden, welche durch die hier gezeigte Affinität unterstützt wird.

Alle bakteriellen gGTs zeigen eine gewisse Hemmung der Lymphozyten-Proliferation, die jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Dieser Effekt ist abhängig von der gGT-Aktivität und kann durch Inaktivierung der enzymatischen Aktivität aufgehoben werden, wie bereits durch die Doppelmutante S451/452A gezeigt werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Vergleich der bakteriellen gGTs mit dem humanen Enzym zunächst nicht

durchgeführt werden, da die vorliegenden Proteinproben in hohen Verdünnungen in den Zelllinien Lyse induzierten. Dies konnte auf geringe Restkonzentrationen des in der Reinigung verwendeten Triton X-100 zurückgeführt und durch eine erneute Reinigung und Dialyse behoben werden. Um die Vergleichbarkeit des Effekts auf die Proliferation zu gewährleisten, wurden in dem hier verwendeten Proliferations-Assay (siehe Abschnitt 2.3.5) jeweils auf die gGT-Menge bzw. die gGT-Aktivität normiert. Es wurden gGT-Mengen von 50 bis 10'000 ng und gGT-Aktivitäten von 50 bis 1000 mU pro Ansatz verwendet und die Proliferation von Jurkat Zellen nach 48 Stunden mittels CellTiter-Glo-Assay analysiert. Vergleicht man den Effekt der Proliferations-Hemmung zwischen den gGTs der verschiedenen Bakterien, sind deutliche Unterschiede zu beobachten. Insbesondere die gGTs der *Helicobacter* und naher Verwandter zeigen hier eine deutliche Hemmung der Proliferation (Abbildung 23). Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei der FtgGT, jedoch nicht bei EcgGT, bei der der Effekt erst bei höheren Konzentrationen beginnt, und HsgGT beobachtet werden. Bei Betrachtung der Proliferationshemmung bezogen auf gGT-Aktivität, zeichnet sich jedoch eine andere Reihenfolge der Effektivität ab. Besonders auffallend ist hierbei der geringe Effekt bei 1000 mU eingesetzter enzymatischer Aktivität der *H. pylori* gGT mit einer Reduktion der Proliferation um 25 % und die bereits deutliche Hemmung der EcgGT bei 100 mU um 50 % (siehe Anhang). Die erhaltenen Daten wurden mittels GraphPad Prism5 durch eine Analyse der sigmoidalen Dosis-Abhängigkeit ausgewertet und folgende Werte berechnet: Für HpgGT wurde erst bei über 1000 mU, für HbgGT bei 280 mU, für CjgGT bei 315 mU, für EcgGT bei 100 mU und für FtgGT bei 700 mU eine 50 % Hemmung der T-Zell-Proliferation erreicht.



**Abbildung 23:** T-Zell-Proliferation-Experimente zur Untersuchung des Effekts der gGTs aus verschiedenen Spezies (HpgGT, HbgGT, CjgGT, EcgGT, FtgGT und HsgGT). Es wurden jeweils  $5 \times 10^3$  Jurkat-Zellen mit den entsprechenden Mengen an gGT über 48 Stunden in Zellkulturmedium (RPMI1640, 10% FCS, P/S) im 96-Well-Format im Brutschrank inkubiert und mittels CellTiter-Glo-Assay analysiert. Die Darstellung der Messwerte wurde mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt.

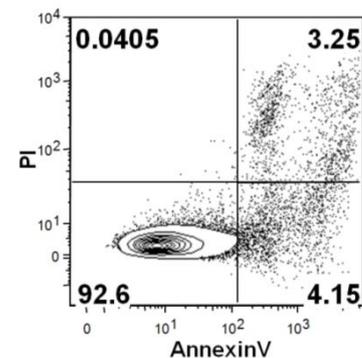
Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich zu den gGTs der verschiedenen Spezies Punktmutanten der HpgGT untersucht, um Rückschlüsse auf die Rolle einzelner am katalytischen Zentrum beteiligter Aminosäure-Resten zu erhalten. Hierzu wurden sowohl

kinetische Parameter, als auch die Hemmung der T-Zell-Proliferation der Mutanten untersucht. Für die Kinetiken wurde die Reaktion bei 37°C und pH 8.0 für dreißig Minuten gemessen und aus der Steigung die Umsatzrate des gGpNAs (siehe Abschnitt 2.6.1) bzw. die spezifische Aktivität berechnet. Hierbei ist zu erwähnen, dass die gemessenen Aktivitäten nur die Umsetzung des Modell-Substrates gGpNA widerspiegeln und nicht mit dem tatsächlichen physiologischen Substrat des Enzyms übereinstimmen müssen. Die Punktmutationen des aktiven Nukleophils Thr380 weisen eine stark verminderte enzymatische Aktivität auf, wobei der Austausch zu Serin den geringsten Effekt auf die Enzymaktivität macht. Hierbei ist zu beachten, dass durch die Punktmutationen sich auch die Kinetik der Autoprocessing verändert (siehe Abschnitt 3.1.5), wodurch insbesondere die Mutanten des Thr380 hauptsächlich als inaktives Vorläufermolekül vorliegen, was das Fehlen der enzymatischen Aktivität sowohl im biochemischen Assay wie auch in der T-Zellproliferation erklären kann. Die Beobachtung der verminderten Aktivität und des Verlusts der Hemmung wurde ebenfalls mit der Doppelmutante Ser451/452Ala gemacht. Für die Mutanten des Glu419 zeigt sich ein differenziertes Bild: Die spezifische Aktivität nimmt durch den Austausch von Glutamin mit 7,13 U/µg bis zu Alanin mit 0,29 U/µg ab. Jedoch korreliert der Grad der Hemmung der Proliferation nicht mit diesem Effekt. Insbesondere weist die Mutante Glu419Ala eine kaum verminderte Hemmung von über 45 % auf die T-Zell-Proliferation, verglichen mit dem Wildtyp-Enzym von 65 %, auf. Dieser Vergleich der Aktivität und Proliferation kann für diese Mutanten gezogen werden, da die Enzyme jeweils vollständig prozessiert vorliegen. Im Gegensatz hierzu kommt es zu einer starken Abnahme dieses Hemmeffekts im Vergleich zur Aktivität bei den Mutanten Tyr433Ala (20 % Hemmung bei 0,57 U/µg) und Pro471Ala (keine signifikante Hemmung bei 0,98 U/µg) – wobei hier dieselbe Problematik der verminderten Autoprocessing beachtet werden muss. Dies deutet auf eine wichtige Rolle der Reste Tyr433 und Pro471 für den Effekt der Hemmung sowie eine Rolle des Glu419 für die Lokalisierung eines möglichen Substrates und der damit verbundenen Spezifität hin. Eine Zusammenfassung der kinetischen und zellulären Daten (siehe Anhang), sowie eines Vergleichs mit der Wildtyp-HpgGT findet sich in Tabelle 8.

**Tabelle 8:** Vergleich der HpgGT-Punktmutanten bezüglich der gGT-Aktivität (500  $\mu$ M gGpNA pH 8.0) und der Hemmung der T-Zell-Proliferation ( $5 \times 10^3$  Zellen pro well; jeweils 500 ng gGT)

HpgGT Mutanten	Kinetische Parameter		Proliferations-Hemmung		Relative Hemmung /Aktivität (% Hemmung / U)
	$v_{\max}$ [U/ $\mu$ g]	Ratio $v_{\max}$ (wt/mut)	% Prolif.	Ratio gGT Effekt (wt/mut)	
<i>Wildtyp</i>	11,3	1,0	41	-	5,2
<i>T380A</i>	0,06	190	97	-	0
<i>T380S</i>	0,13	90	100	-	0
<i>T380V</i>	0,07	160	100	-	0
<i>E419A</i>	0,29	40	59	0,69	<b>141,4</b>
<i>E419N</i>	2,09	5,5	46	0,89	<b>25,8</b>
<i>E419Q</i>	7,13	1,6	44	0,93	7,9
<i>Y433A</i>	0,57	20	82	0,50	<b>31,6</b>
<i>S451A</i>	8,27	1,4	45	0,91	6,7
<i>S451/452A</i>	0,03	380	100	-	0
<i>P471A</i>	0,98	12	94	0,44	6,1

Um einen toxischen Effekt insbesondere bei der Proliferationshemmung durch die Punktmutante E419A auszuschließen, wurde zusätzlich zu der Analyse des Proliferations-Assay mittels CellTiter-Glo die Apoptose der Jurkat-Zellen in der FACS-Analyse untersucht (siehe Abschnitt 2.3.6). Hierzu wurden die Zellen gegen AnnexinV FITC und Propidiumiodid (PI) gefärbt. Dabei konnte zwischen der unbehandelten Kontrolle und den vermessenen Mutanten im Rahmen der Messungenauigkeit kein Unterschied im Verhältnis zwischen apoptotischen und vitalen Jurkat-Zellen gemessen werden (Abbildung 24). Durch dieses Ergebnis konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der beobachteten Hemmung der T-Zell-Proliferation um eine Apoptose-bedingte Reduktion der Zellzahl handelt und der Effekt durch die enzymatische Aktivität der gGTs erzeugt wird.



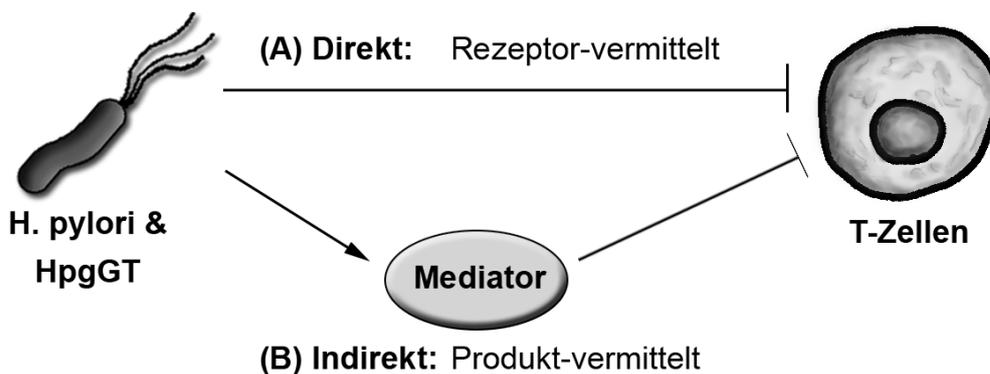
**Abbildung 24:** exemplarische durchflusszytometrische Analyse der HpgGT Mutante E419A

### 3.2 Untersuchung des immunsuppressiven Effektes der *H. pylori* gGT

Durch die Untersuchung des Wirkmechanismus der *H. pylori* gGT auf die Proliferation von Lymphozyten sollen wichtige Erkenntnisse über die allgemeinen Mechanismen der Immunevasion, sowie für die gezielte Entwicklung Spezies-spezifischer Inhibitoren gewonnen werden. Durch das sezernierte Enzym gGT ist es dem Keim vermutlich möglich, die Immunantwort zu umgehen und dabei die T-Zell-Proliferation zu hemmen. Dieser Effekt ist vergleichbar mit der Wirkung von Cortisol-Präparaten und könnte durch die Identifizierung des Wirkmechanismus in einer immunsuppressiven Applikation resultieren.

#### 3.2.1 Analyse des Einflusses der HpgGT auf die T-Zell-Proliferation

Die durch die HpgGT vermittelte Hemmung der T-Zell-Proliferation wird über verschiedene Adaptermoleküle unter Aktivierung des phosphatidylinositol 3-hydroxykinase (PI3K/Akt) Signalweges, sowie NFAT und der Destabilisierung von p27 hervorgerufen (Lenferink et al., 2001). Der genaue Ansatzpunkt der HpgGT in diesem Mechanismus der Zellzyklusblockade wurde bislang nicht aufgeklärt. Die grundlegende Fragestellung hierbei ist, ob die HpgGT direkt strukturell über einen Rezeptor oder indirekt über ein enzymatisch entstandenes Molekül mit den T-Zellen interagiert (Abbildung 25).

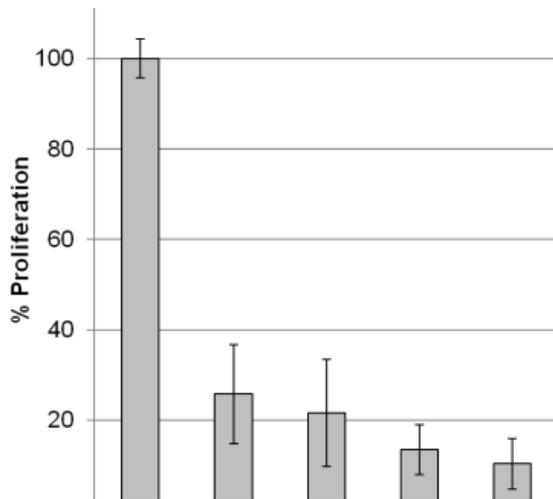


**Abbildung 25:** Darstellung der Fragestellung des Wirkmechanismus der HpgGT auf die T-Zell-Proliferation.

Um den Wirkmechanismus der HpgGT genauer zu untersuchen, wurde Zellkulturmedium (RPMI 1640, 10 % FCS, P/S) mit 2 µg/ml HpgGT für vier Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend die Proliferation von Jurkat Zellen nach 48 Stunden Inkubation in diesem vorbehandelten Medium gemessen. Neben der reinen Vorinkubation wurde das Enzym zusätzlich mittels Ultrafiltration über eine 3kDa-Membran abgetrennt (UF) bzw. das Enzym bei 95°C inaktiviert (HI). Das so behandelte Medium verlor gegenüber dem Kontrollmedium nicht den Effekt der Proliferations-Hemmung (Abbildung 26). Das Ergebnis deutet darauf

hin, dass durch die enzymatische Aktivität der HpgGT ein Produkt / Mediator entsteht, welcher hitzestabil, kleiner als 3 kDa ist und einen hemmenden Effekt auf T-Zellen ausübt.

Um eine Analyse und Identifizierung des entstandenen Produkts zu ermöglichen, wurden Versuche mit definierten Medien durchgeführt. Hierbei konnten keine T-Zell-Proliferations-



**Abbildung 26:** Untersuchung des Wirkmechanismus der HpgGT auf die Proliferation von T-Zellen. Jurkat-Zellen mit unterschiedlich behandeltem Medium wurden über 48 Stunden im Brutschrank inkubiert und mittels CellTiter-Glo-Assay analysiert. 1: unbehandeltes Medium, 2: vorinkubiertes Medium (PIM, 4 h 37°C mit 10 µg/ml HpgGT), 3: PIM nach HI, 4: PIM nach UF, 5: PIM nach HI + UF.

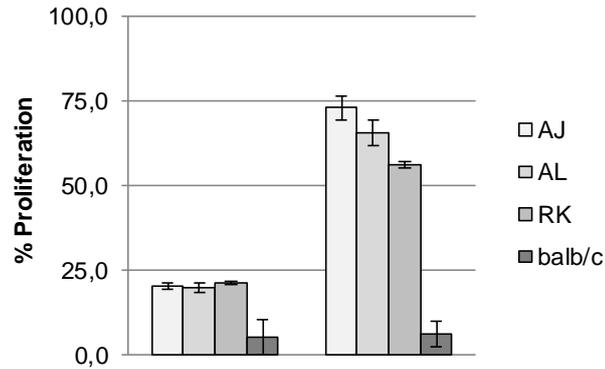
Hemmung beobachtet werden. Die Inkubation der HpgGT in einem Mix aus verschiedensten Aminosäuren führte zum Verlust des Effektes und wurde im Weiteren nicht weiter verfolgt. Ebenfalls wurde festgestellt, dass der hier beobachtete Effekt der Hemmung FCS-abhängig ist: Zum einen wird die enzymatische Aktivität der HpgGT durch Zugabe geringer Mengen an FCS gesteigert (Daten nicht gezeigt), zum anderen wird eine Komponente des FCS für die katalytische Produktion des Mediators benötigt, da in definiertem Medium der Effekt verloren geht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene FCS-Chargen für die Inkubations-Experimente verwendet. Hierbei stellte sich heraus, dass der beobachtete Effekt und insbesondere die Stabilität des Mediators, welcher die T-Zell-Proliferations-Hemmung vermittelt, von der verwendeten FCS-Charge abhängt. Hierzu wurden neben 13 verschiedenen FCS-Chargen (Daten nicht gezeigt) auch verschiedene humane Seren getestet. Die hier verwendeten Seren wurden zunächst steril filtriert und anschließend nach Hitzeinaktivierung in einer Konzentration von 10 % im Medium verwendet. In **Abbildung 27** sind neben dem Serum-Pool von balb/C-Mäusen nur die humanen Seren dargestellt, die nach Inkubation mit der HpgGT einen deutlichen Effekt auf die T-Zell-Proliferation aufweisen und diese

**Abbildung 27:** Vergleich des Effekts der Proliferationshemmung in vorinkubiertem Medium (PIM) mit verschiedenen Seren (human: AJ, AL & RK, murin: balb/c). Jurkat-Zellen mit so behandeltem Medium wurden über 48 Stunden im Brutschrank inkubiert und mittels CellTiter-Glo®-Assay analysiert. **Links:** unbehandeltes PIM; **rechts:** hitzeinaktiviertes PIM.

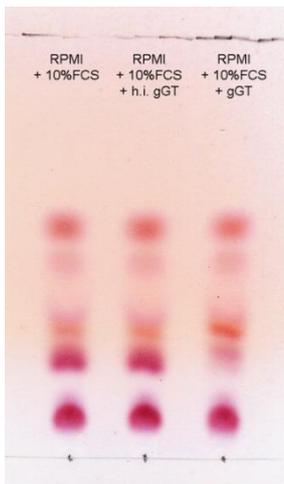
Hemmung nicht nach Hitzeinaktivierung (HI) verlieren. So konnte nach Vorbehandlung mit 10 µg/ml HpgGT für das Serum AJ eine Hemmung von  $79,1 \pm 0,1$  % und nach HI von  $27,2 \pm 3,6$  %, für AL eine Hemmung von  $20,3 \pm 1,5$  % und nach HI von  $34,6 \pm 3,9$  %, für RK eine Hemmung von  $78,9 \pm 0,3$  % und nach HI

von  $44,0 \pm 0,9$  % und für einen Pool aus Mausserum balb/c eine Hemmung von  $95,0 \pm 5,1$  % und nach HI von  $93,8 \pm 3,8$  %, gemessen werden.



Die folgenden Experimente wurden mit dem initial verwendeten FCS bzw. dem humanen Serum RK durchgeführt, da nicht ausreichende Mengen an Mäuseserum balb/c akquiriert werden konnten.

### 3.2.2 Versuche zur Identifizierung des immunsuppressiven Enzymprodukts der HpgGT



**Abbildung 28:** Analyse des gGT-Effekts mittels Dünnschicht-Chromatographie.

Um den Effekt der gGT-Aktivität auf die Zusammensetzung des Mediums zu analysieren, wurde zunächst eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Hierbei wurde unterschiedlich behandeltes Medium aufgetragen und mittels Ninhydrin-Lösung die Aminogruppen der Aminosäuren angefärbt (siehe Abschnitt 2.6.3).

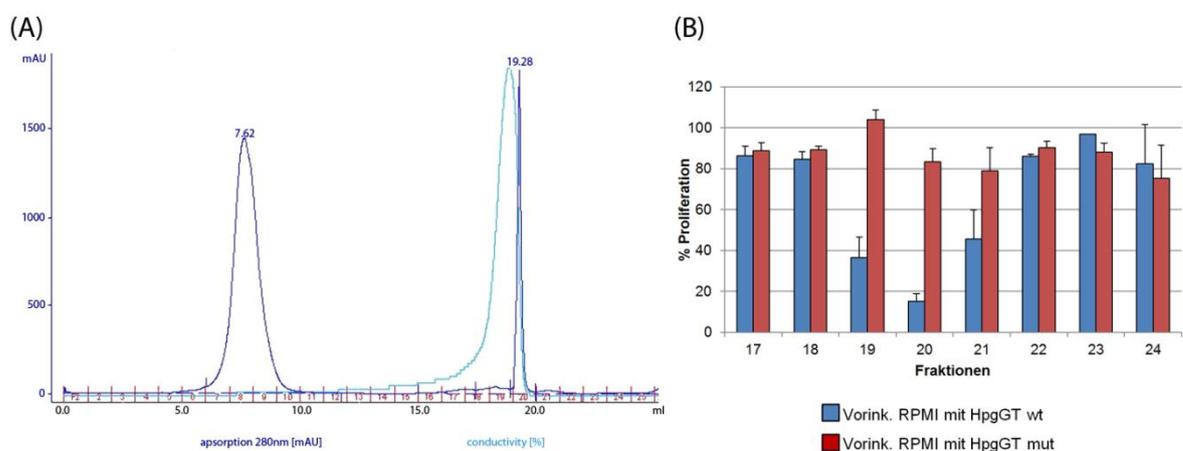
Bereits mit dieser initialen Trennung wurden deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung des Mediums zwischen dem mit inaktivierter gGT und aktiver gGT behandelten RPMI beobachtet. Insbesondere fallen hier die Abnahme der Bande mit einem  $R_f$ -Wert (Ratio of fronts) von 0,23, und die Zunahme der Bande mit einem  $R_f$ -Wert von 0,30 bei dem mit aktiver HpgGT vorbehandelten

Medium auf (Abbildung 28).

Die Massen-Analyse dieser Banden ergab aufgrund des zu hohen Hintergrunds durch das Kieselgel und die schlechte Auftrennung der Probe kein auswertbares Ergebnis. Die direkte Analyse des vorbehandelten Mediums war ebenfalls nicht möglich, da in diesen Proben der Salzgehalt zu hoch und dadurch die Ionisierung in der Massenspektrometrie stark vermindert

war. Da der vermutete Mediator kleiner als 3 kDa ist, konnte zur Reduktion der Salzkonzentration keine Dialyse verwendet werden.

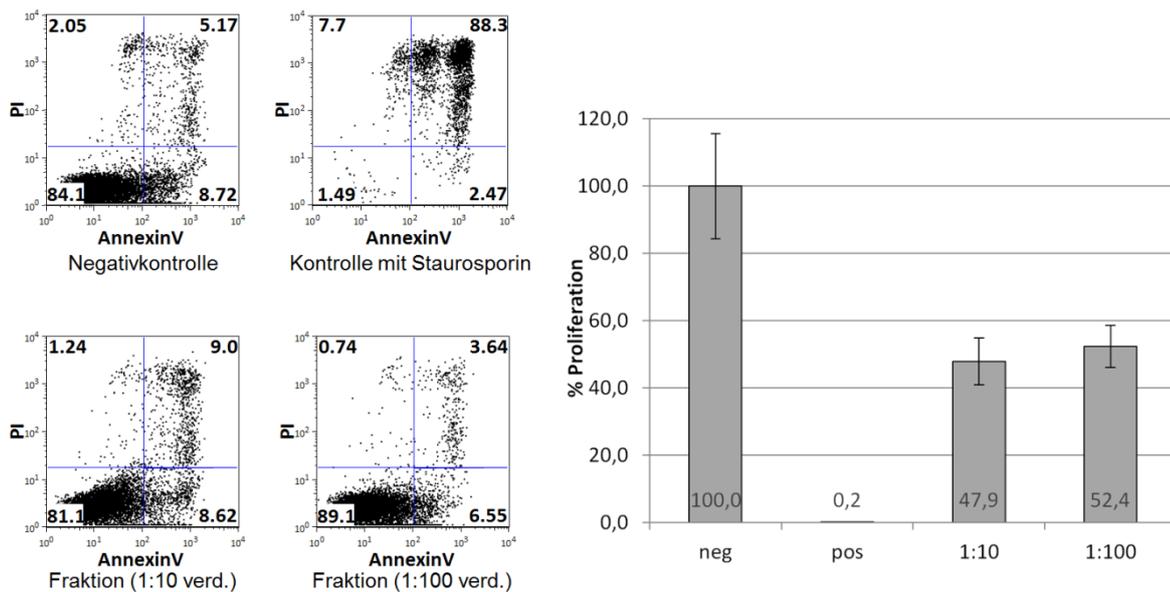
Um dieser Problematik zu begegnen, wurden verschiedene Chromatographie-Methoden getestet (Entsalzungs-Säule, Ionenaustauscher und Gelfiltration). Die besten Resultate konnten durch Gelfiltration mit einer analytischen Superdex75-Säule bzw. im späteren Verlauf der Arbeit mit einer Superdex Peptide erzielt werden. Hierbei wurde als Laufmittel H<sub>2</sub>O verwendet, es wurden wiederholte Läufe bei einer Flussrate von 0,3 ml/min an einem Äkta Purifier System bei 4°C durchgeführt. Das mit HpgGT (10 µg/ml) vorbehandelte Medium wurde vor der Applikation auf die Säule sterilfiltriert, aber nicht hitzeinaktiviert. Neben dem aktiven HpgGT Wildtyp-Protein wurde als Kontrolle die Doppelmutante S451/452A mit stark verringerter gGT-Aktivität eingesetzt, um so durch das reine Medium bzw. durch Verunreinigungen der eingesetzten Proteine auftretende Effekte auf die T-Zell-Proliferation auszuschließen. Für die Gelfiltration wurden je Chromatographie-Lauf jeweils ein Auftragsvolumen von einem Milliliter verwendet und das Eluat in ein Milliliter Fraktionen gesammelt. Anschließend wurden die Fraktionen der repetitiven Gelfiltrations-Läufe gepoolt und über Nacht lyophilisiert. Die so erhaltenen Fraktionen wurden in einem Zehntel des Ausgangsvolumens resuspendiert und 1:10 verdünnt in den Proliferationsassay mit Jurkat-Zellen eingesetzt. Die Fraktionen 19 bis 21 des mit aktiver gGT behandelten Mediums zeigen im Vergleich zu der Mutante eine deutliche Hemmung der Proliferation um bis zu 83 % (Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Chromatographische Auftrennung des vorinkubierten Mediums mittels Superdex75-Gelfiltrationssäule. Als Laufmittel wurde H<sub>2</sub>O bei einer Flussrate von 0.3 ml/min verwendet. (A) Elutionsprofil der Gelfiltration; (B) Proliferationsassay der Fraktionen, rot: PIM mit HpgGTwt, blau: PIM mit HpgGT S451/452A

Für die weitere Auftrennung und Analyse des Mediators wurde Fraktion 19 verwendet, da bei Fraktion 20 die Indikator-Substanz des Mediums eluiert und so ein hoher Hintergrund erzeugt wurde.

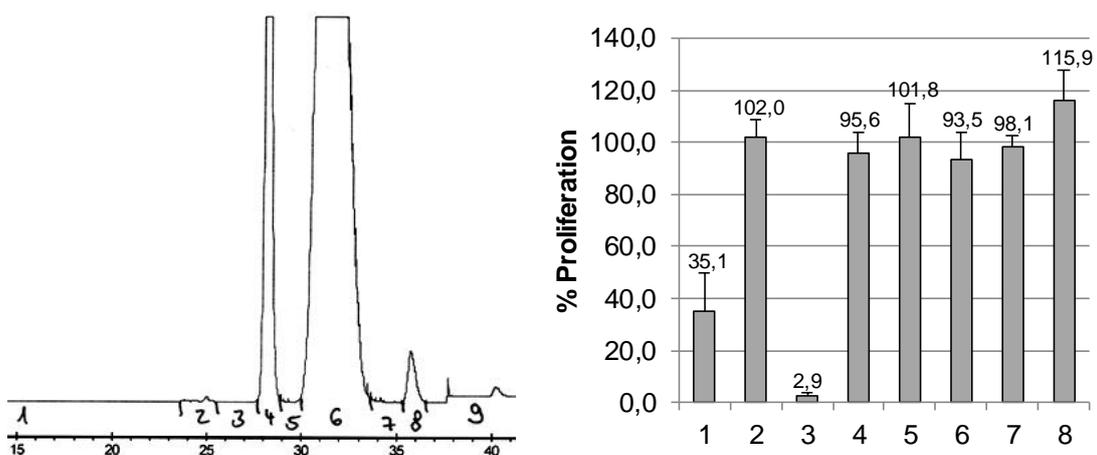
Um apoptotische Effekte in den Fraktionen auszuschließen, wurde neben der Analyse der Proliferation mittels CellTiter-Glo-Assay die Apoptose mittels AnnexinV- und PI-Färbung im FACS untersucht. Als Kontrollen wurden, neben den unbehandelten, auch mit Staurosporin behandelte Jurkat-Zellen als Positivkontrolle für die Apoptose untersucht. Bei der Negativkontrolle wurden die analysierten Zellen nur zu einem geringen Anteil von 5,17 % AnnexinV und PI positiv gefärbt, wohingegen 84 % der Zellen für beide Substanzen negativ waren. Für Staurosporin verschob sich dieses Verhältnis dahingehend, dass 88,3 % der Zellpopulation apoptotisch war. Die eingesetzten Verdünnungen der Fraktionen zeigten selbst bei einem Verhältnis von 1:100 einen deutlichen hemmenden Effekt von 47,6 % auf die T-Zell-Proliferation, wobei das Verhältnis zwischen den Zellpopulationen mit einem Anteil von 3,64 % apoptotischer Zellen der Negativkontrolle ähnelte (Abbildung 30). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt der Inhibition der T-Zell-Proliferation auf Apoptose der Jurkat-Zellen zurückzuführen ist.



**Abbildung 30:** Durchflusszytometrische Analyse (**links**) und Proliferations- (**rechts**) Analyse des inhibitorischen Effekts der T-Zell-Proliferation auf Apoptose. Populations-Bestimmung über Fluoreszenzintensität bei 515 nm (AnnexinV) bzw. > 560 nm (PI). Jurkat-Zellen mit Verdünnungen der Fraktion 19 wurden über 48 Stunden im Brutschrank inkubiert und mittels FACS bzw. CellTiter-Glo-Assay analysiert.

Um den Mediator weiter zu isolieren und eine anschließende Identifizierung zu erleichtern, wurde die aktive Fraktion mittels präparativer HPLC durch eine hydrophile

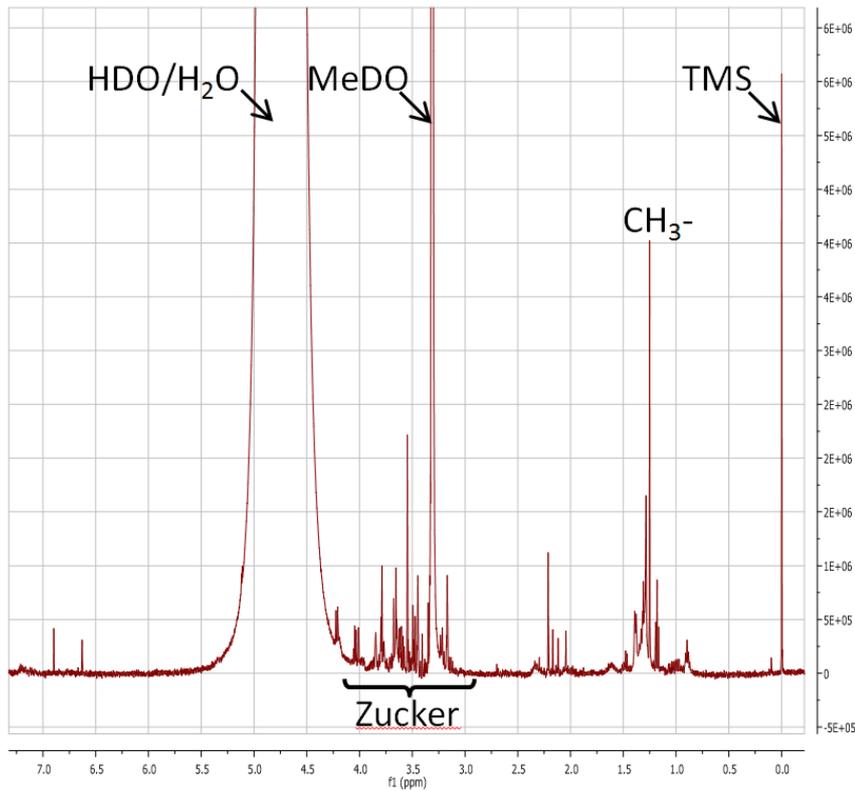
Interaktionschromatografie (HILIC) weiter aufgetrennt. Zur Elution wurde ein Gradient von 65 % ACN, 0.1 % Ameisensäure auf 0 % ACN bei einer Flussrate von 6 ml/min gefahren und das Elutionsprofil über ELSD (**e**vaporation **l**ight **s**cattering **d**etection) aufgezeichnet. Durch die erhöhte Sensitivität dieser Methode ist es möglich, auch UV-inaktive Substanzen zu detektieren. Bei der Chromatographie wurden neun Fraktionen gesammelt, welche im Anschluss mittels Gefriertrocknung konzentriert und im Proliferationsassay auf die biologische Funktionalität getestet wurden. Bei der Chromatographie wurde der Großteil der detektierbaren Substanzen in Fraktion 4 und 6 eluiert, wobei im Proliferationsassay für diese Fraktionen kein Hemmeffekt der Proliferation beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde in Fraktion 3 mit der vorhandenen Detektions-Sensitivität kein Signal erkannt, jedoch zeigt sich im Proliferationsassay ein starke Inhibition von 97,1 % der Proliferation der Jurkat-Zellen. Ebenfalls konnte in der Fraktion 1 ein geringerer Effekt von 64,9 % Hemmung gemessen werden (Abbildung 31).



**Abbildung 31:** Auftrennung mittels HILIC-HPLC mit einer Amide-800 Säule (Tosoh) durch einen ACN-Gradienten von 65 bis 0 % über 35 Minuten (**links**) und Testung des inhibitorischen Effekts auf die T-Zell-Proliferation mittels CellTiter-Glo-Assay (**rechts**).

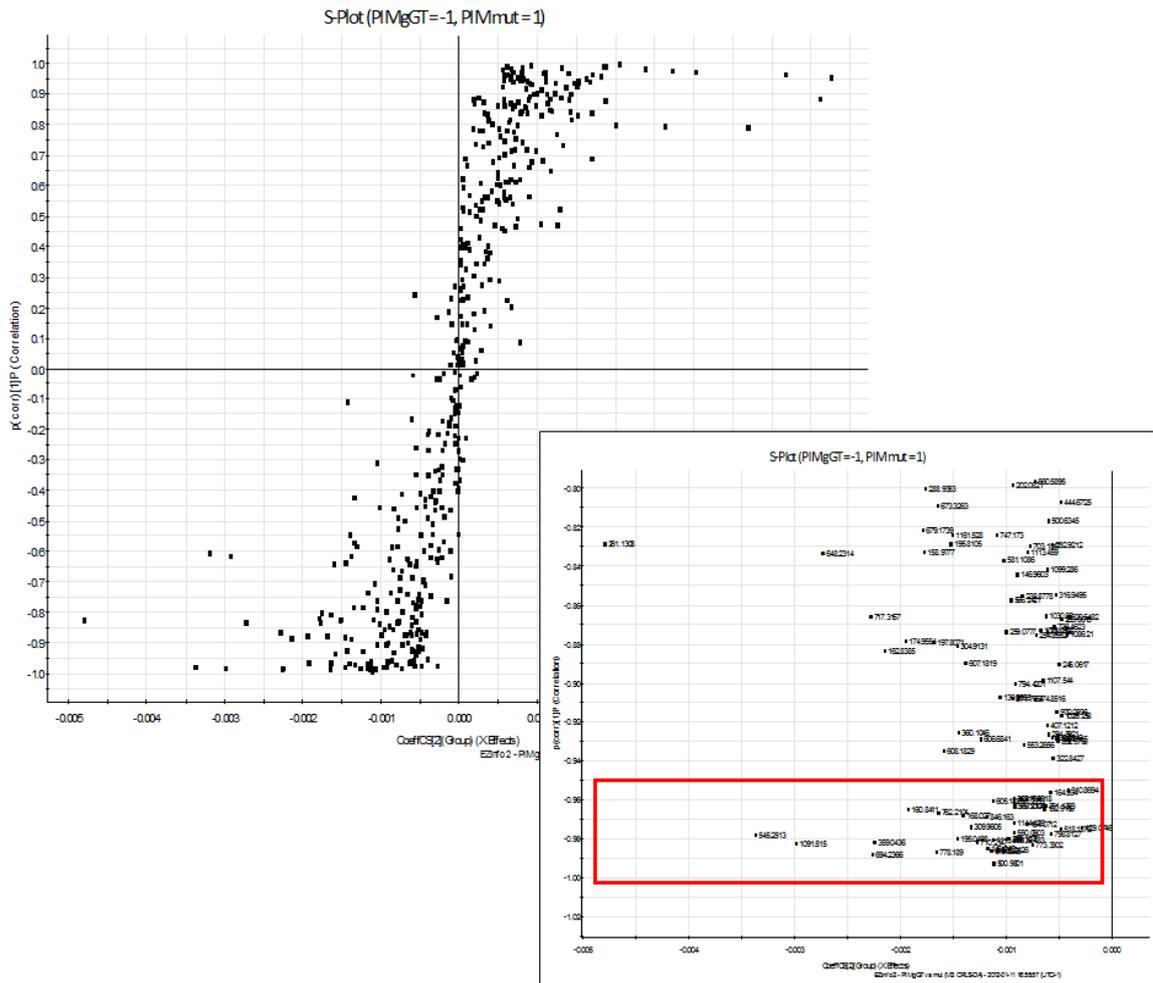
Für die Analyse mittels NMR wurde die Fraktion 3 unverdünnt eingesetzt. Die Messung und Analyse wurde in Kooperation mit Timo Stark durchgeführt. Bei den Messungen ergab sich das Problem, dass die Konzentration der Substanzen in der entsprechenden Probe für eine Identifizierung der Bestandteile zu niedrig war. In den aufgenommenen<sup>^</sup> Spektren dominiert das Lösungsmittelsignal, wodurch alle anderen Signale an der Grenze der Messsensitivität liegen. Im  $^1\text{H}$ -NMR wurden für die Probe Signale mit einer chemischen Verschiebung ( $\delta$ ) im Bereich von 3.0 bis 4.0 ppm detektiert. Ein mögliches Signal für anomere Protonen bei  $\delta$  4.4 –  $\delta$  5.5 wird durch das Signal des Lösungsmittels überdeckt. Ein Signal für Methyl-Gruppen konnte bei  $\delta$  1.2 detektiert werden (Abbildung 32). Die

Auswertung der 2D-NMR Daten mittels HMBC (**h**eteronuclear **m**ultiple **b**ond **c**orrelation) brachte hierbei keine weiteren Erkenntnisse. Aus den Spektren kann angenommen werden, dass es sich bei den enthaltenden Substanzen um ein Molekül mit Zucker-Komponente handelt.



**Abbildung 32:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Fraktion aus der HILIC-Chromatographie.

Da die Produktion dieser Fraktionen in größeren Mengen mit dem hier beschriebenen Verfahren technisch nicht umsetzbar war, wurde eine weitere Analysemethode getestet. Hierzu wurde nur der erste Schritt der Fraktionierung durchgeführt und nach der Gelfiltration direkt die Proben gemessen. Hierzu wurden die Proben nochmals über eine 3 kDa-Membran filtriert und anschließend die Unterschiede zwischen dem Referenzmaterial (PIM mit HpgGT S451/452A) und der Probe (PIM mit HpgGTwt) in der Masse mittels S-plot analysiert. Hierbei werden die identifizierten Massen über die Signifikanz des Unterschieds der beiden Proben aufgetragen. Dadurch werden Massen, die nur in einer Probe vorkommen, entsprechend weit vom Zentrum des Graphen entfernt positioniert. Der für die Analyse interessante Teil der Massen befindet sich also im Bereich der höchsten Signifikanz bei der Probe, die mit HpgGTwt behandelt wurde (Abbildung 33).



**Abbildung 33:** Darstellung des Ergebnisses der Differenzial-Spektren zur Analyse des Mediators im vorinkubierten Medium mittels S-Plot.

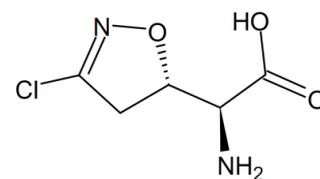
Betrachtet man den Bereich der höchsten Signifikanz, wurden die dort befindlichen Massen genauer untersucht. Nach der in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese, dass es sich bei dem enzymatisch erzeugten Produkt um ein Molekül mit Zuckercomponenten und Aminosäuren (Glutamyl-Rest) handelt, wurden die erhaltenen Massen mittels einer Datenbank nach Übereinstimmungen mit verschiedensten Kombinationen dieser Substanzklassen verglichen. Bisher konnte keine Übereinstimmung gefunden werden. Die abschließende Analyse konnte zwar im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, wird jedoch im Anschluss weiter verfolgt.

### 3.3 Identifizierung und Validierung von selektiven Inhibitoren der *H. pylori* gGT

Klassische Ansätze zur Entwicklung von Antiinfektiva zielen auf generelle zelluläre Komponenten ab, die für das Überleben von Mikroorganismen notwendig sind. Dadurch werden alle sensitiven Keime abgetötet, was zu Nebenwirkungen und zunehmender Resistenzentwicklung führt. Eine stetig wachsende Anzahl an *H. pylori*-Stämmen können mit einer herkömmlichen Antibiotika-Therapie nicht mehr eradiziert werden. Bereits 27 % der Keime besitzen eine Resistenz gegen Metronidazol (De Francesco et al., 2010), einem Bestandteil der standard Triple-Antibiotika-Therapie. Um diesem Problem zu begegnen, werden neue Medikamente benötigt, die idealerweise spezifisch gegen einzelne Krankheitserreger gerichtet sind. Idealer Angriffspunkt hierbei sind bakterielle Proteine wie z. B. die gGT, die für das Überleben der Bakterien und die Etablierung einer Infektion im Menschen essentiell sind. Ziel dieser Arbeit war es, Ansatzpunkte für neue Antiinfektiva gegen die weit verbreitete bzw. chronische Infektion durch *H. pylori* zu entwickeln. Die Identifizierung neuer spezifischer Inhibitoren gegen die *H. pylori* gGT könnte die Grundlage für neue Antiinfektiva schaffen, die die Infektion bekämpfen, wobei sowohl Nebenwirkungen sowie Resistenzbildung reduziert werden.

#### 3.3.1 Untersuchung von Acivicin als Referenzinhibitor für gGTs

Als Grundlage für die weiteren Analysen und die Identifizierung neuer Inhibitoren für HpgGT wurde zunächst die Inhibition der enzymatischen Aktivität durch den gGT-Inhibitor Acivicin untersucht (Stole et al., 1994) (Abbildung 34).

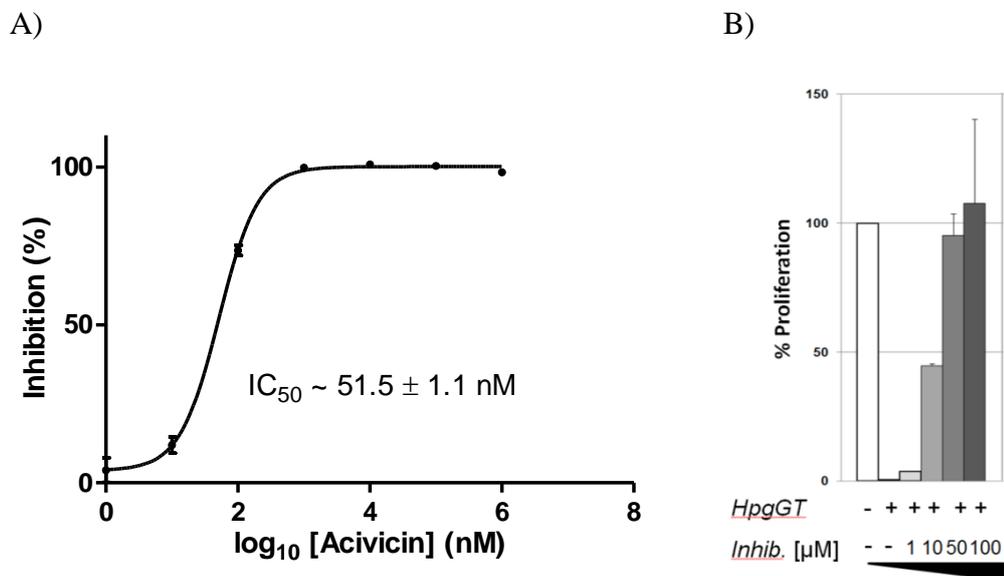


**Abbildung 34:** Chem. Struktur von Acivicin (CAS 42228-92-2).

Zur Bestimmung des inhibitorischen Effekts des Acivicins auf die HpgGT wurden sowohl Endpunktbestimmungen gemacht, als auch Enzym-Kinetiken aufgenommen. Der *in vitro* Assay wurde unter Verwendung des HpgGT-Wildtyp-Enzyms, welches dreißig Minuten mit dem Inhibitor vorinkubiert wurde, und Detektion des gGpNA-Umsatzes (siehe 2.6.1) bei 405 nm mit unterschiedlichen Acivicin-Konzentrationen zwischen 1 nM und 1 mM bei 37°C über 15 Minuten gemessen. Die Absorptionsänderung und die daraus errechnete Umsatzrate für gGpNA wurden in prozentualer Inhibition der gGT-Aktivität umgewandelt und gegen die Log<sub>10</sub> umgerechnete Konzentration des Acivicins aufgetragen. Aus den Messungen ergab sich einen sigmoidaler Verlauf der Inhibition und ein in GraphPad Prism berechneter IC<sub>50</sub>-Wert von 51,5 ± 1,1 nM (siehe Abbildung 35). Der IC<sub>50</sub>-Wert wurde anschließend über die Cheng-Prusoff-Gleichung

(Cheng and Prusoff, 1973) in die Inhibitions-Konstante  $K_i$  umgewandelt (siehe 2.6.2). In den hier durchgeführten Messungen wurde so ein  $K_i$ -Wert von  $25,8 \pm 0,5$  nM ermittelt.

Um die Inhibition der gGT-Aktivität auch auf zellulärer Ebene nachzuweisen, wurde der Effekt des mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors vorinkubierten Enzyms auf die Proliferation von Lymphozyten untersucht. Bei steigender Acivicin-Konzentration trat eine Rekonstitution der Zell-Proliferation ein. Für die Analyse des *in vivo* Assays wurde prozentuale Anteil an proliferierenden Zellen gegen die  $\text{Log}_{10}$  umgerechnete Konzentration des Acivicins aufgetragen. Daraus ergab sich ein in GraphPad Prism berechneter  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $10\mu\text{M}$  (siehe Abbildung 35). Dies ist ein Unterschied von knapp drei  $\text{Log}_{10}$ -Stufen verglichen mit dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert der kinetischen Analyse. Der deutliche Unterschied kann z. B. durch eine reduzierte Wirksamkeit des Inhibitors im verwendeten komplexen Medium durch Konkurrenz mit möglichen gGT-Substraten erklärt werden.



**Abbildung 35:** Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes für Acivicin mittels Aktivitäts-Assay (A): Für die Analyse der Inhibition wurde die gGT-Aktivität in  $10\mu\text{M}$  gGpNA und  $10\text{mM}$  Gly-Gly bei  $405\text{nm}$  bei  $37^\circ\text{C}$  für 15 Minuten gemessen. ( $n=3$ ); Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes für Acivicin mittels der Rekonstitution der Proliferation von Lymphozyten (B):  $1\mu\text{g}$  HpgGT wurde mit Acivicin dreißig Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  vorinkubiert und anschließend auf Jurkat-Zellen gegeben. Diese wurden über 48 Stunden in Zellkulturmedium im Brutschrank inkubiert und mittels CellTiter-Glo-Assay analysiert.

Um die Interaktion des Acivicins mit der HpgGT im Detail aufzuklären, wurde in Zusammenarbeit mit *Proteros biostructures GmbH* die Kristallstruktur ermittelt. Die Kristallisationsbedingungen wurden ausgehend von den bereits publizierten Bedingungen  $200\text{mM}$  HEPES pH 7.5, 25% PEG2000 Monomethylether der Kristallisation von HpgGT (Boanca et al., 2007) durch *Proteros biostructures GmbH* optimiert und Protein mit einer

Konzentration von 5 mg/mL eingesetzt. Zusätzlich wurde Acivicin zu den Kristallisationsansätzen beigefügt, um Kokristallisation des Liganden mit dem Protein zu erreichen. Die daraus resultierenden Kristalle zeigten eine Röntgenstrahlbeugung bis zu einer Auflösung von 1.49 Å an der SWISS LIGHT SOURCE (SLS, Villigen, Schweiz).

**Tabelle 9:** Statistik der Datensammlung und Verfeinerung für Acivicin

<b>Ligand</b>	<b>Acivicin</b>
Auflösung [Å]	91.85 – 1.49
Anzahl der Reflektionen (worki/test)	170766 / 4718
R <sub>cryst</sub> [%]	14.4
R <sub>free</sub> [%] <sup>1</sup>	18.4
Anzahl der Atome	
Protein	8285
Wasser	961
Ligand	20
1,2-Ethandiol	172
Verteilung für ideale Geometrie:	
Bindungslängen [Å]	0.008
Bindungswinkel [°]	1.22
Bindungs B's [Å <sup>2</sup> ] <sup>3</sup>	2.1
Ramachandran plot: <sup>4</sup>	
Bevorzuge Regionen	90.5
Erlaubte Regionen	9.1
Verbotene Regionen	0.4

<sup>1</sup> Test-Set beinhaltet 2.7 % der gemessenen Reflektionen

<sup>2</sup> Berechnung mittels MOLEMAN

<sup>3</sup> Berechnung mittels PROCHECK

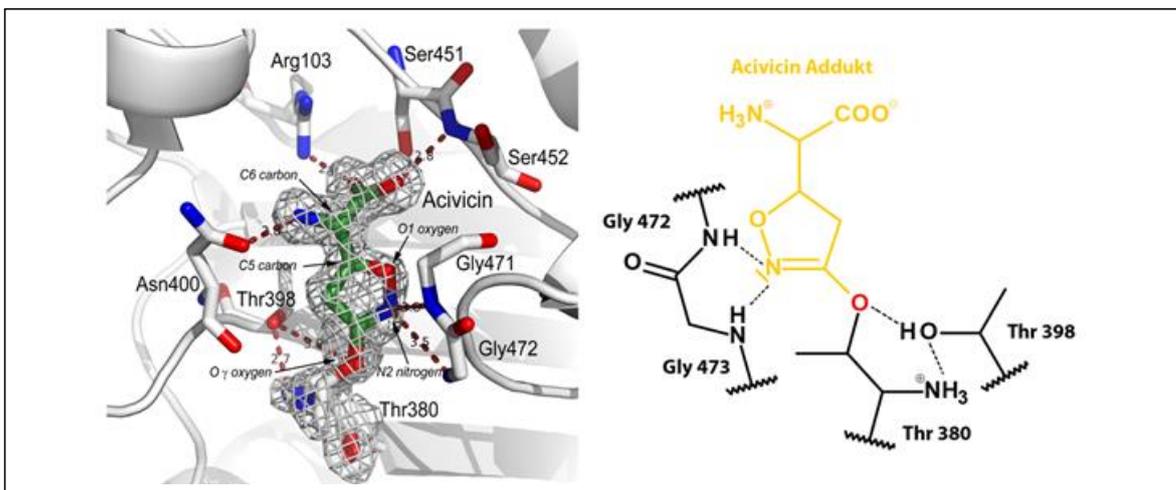
Durch Anpassen der Modell-Parameter (Koordinaten und B-Faktor) des Röntgenstrahlbeugungsmusters mittels REFMAC5 konnte eine weitere Verringerung des R-Werts und eine Erhöhung der Qualität des Beugungsmusters erzielt werden. Der R-Wert steht für die Übereinstimmung des berechneten Modells mit den experimentell ermittelten Parametern.

Der R-Wert der verfeinerten Struktur betrug 14,4 % und der freie R-Wert R<sub>free</sub> = 18,4 %. Für einen Datensatz von 1.49Å Auflösung sind diese Werte in einem Bereich, der in bislang

publizierten Strukturen wiedergefunden wird (Kleywegt and Jones, 2002). Der R-Wert liegt hierbei ungefähr um den Faktor Zehn über der Auflösung, der freie R-Wert weist verglichen mit dem R-Wert eine Erhöhung um einige Prozent auf.

Der Ramachandran-Plot der verfeinerten Struktur zeigte 90,5 % der Aminosäure-Reste in optimalen Regionen, sowie 9,0 % in erlaubten Bereichen. Nur Asn400 und Trp507 (0,4 %) lagen in nicht erlaubten Bereichen.

Anhand der Kristallstruktur wurden der Mechanismus der kovalenten Acivicin-Bindung und die daran involvierten Reste des katalytischen Zentrums genauer untersucht.



**Abbildung 36:** Darstellung der Acivicin-Bindung im Aktiven Zentrum der HpgGT

Ein möglicher Mechanismus der Acivicin-Bindung könnte nach der Lokalisierung des Acivicins in der Bindetasche der gGT über einen nukleophilen Angriff des Thr380 stattfinden (Abbildung 36). Zusätzlich wird der Inhibitor durch die Interaktion über Wasserstoffbrückenbindungen der Reste Arg103, Asn400, Ser451 und Ser452 im katalytischen Zentrum stabilisiert und richtig positioniert. Durch den Angriff der aktivierten Hydroxyl-Gruppe ( $O^{\gamma}$ ) des Thr380 an den Dihydroisoxazol-Ring des Acivicins entsteht eine kovalente Bindung des Inhibitors. Diese Reaktion wird durch die Ausbildung einer katalytischen Thr-Thr Dyade zwischen Thr380 und Thr398 ermöglicht. Hierbei absorbiert Thr398 ein Proton, wodurch der Sauerstoff ( $O^{\gamma}$ ) des Thr380 für den nukleophilen Angriff aktiviert wird. In einer nukleophilen aromatischen Substitution greift die Hydroxyl-Gruppe am C3 des Dihydroisoxazol-Rings des Acivicin an, wodurch es in einem Intermediat zu einer zusätzlichen negativen Ladung im Ring kommt. Der Stickstoff des Dihydroisoxazol-Rings und die dort entstehende negative Ladung wird hierbei direkt über Wasserstoffbrückenbindungen an die NH-Gruppen der Glycine 472 und 473 in einem

Oxyanion-Loch stabilisiert. Durch den Austritt des Chlorid-Ions werden die Reaktion und die damit verbundene kovalente Bindung des Acivicins abgeschlossen. Das Verständnis der Bindung des Acivicins liefert wichtige Erkenntnisse und dient als Grundlage für die Identifizierung weiterer Inhibitoren gegen die HpgGT.

### 3.3.2 Identifizierung und Validierung neuer Inhibitorkandidaten

Im letzten Abschnitt wurden der inhibitorische Effekt und das Bindeverhalten des Acivicins aufgeklärt. Ausgehend von diesen Daten wurden in Kooperation mit *Proteros biostructres GmbH* mehrere Runden *in silico* Screening, bei der auf eine Datenbank mit über drei Millionen Molekülen zurückgegriffen wurde, durchgeführt. Durch dieses iterative Verfahren konnten primäre Hits identifiziert und zur Validierung freigegeben werden. Die so gefundenen Substanzen ähneln strukturell dem natürlichen Substratbestandteil Glutamat bzw. orientieren sich an der Struktur des Acivicins und versuchen so, eine Bindung in das aktive Zentrum zu ermöglichen. Um die Beschaffung der Kandidaten zu erleichtern, wurde bei den verwendeten Molekülen nur auf kommerziell verfügbare Inhibitoren zurückgegriffen.

#### 3.3.2.1 Validierung der gGT-Aktivitäts-Inhibition der Kandidaten auf *H. pylori* gGT und deren Bindeverhalten

Zur Analyse und Validierung des inhibitorischen Potentials der mittels *in silico* Screenings identifizierten 31 Kandidaten auf die HpgGT, wurden analog zu Acivicin zunächst Endpunktbestimmungen gemacht. Für die neun Kandidaten mit inhibitorischem Effekt wurden zusätzlich Enzym-Kinetiken aufgenommen. Hierfür wurde in den *in vitro* Assay das HpgGT Wildtyp Enzym eingesetzt, welches dreißig Minuten mit dem Inhibitor bei 37°C vorinkubiert wurde. Über die Detektion des gGpNA-Umsatzes (siehe 2.6.1) bei 405 nm wurde die gGT-Aktivität bei mit unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen zwischen 1nM und 10 mM bei 37°C über 15 Minuten gemessen. Die Absorptionsänderung und die daraus errechnete Umsatzrate für gGpNA wurden in prozentualer Inhibition der gGT-Aktivität umgewandelt und gegen die  $\text{Log}_{10}$  umgerechnete Konzentration der einzelnen Inhibitoren aufgetragen. Als Kontrolle für die Vergleichbarkeit der Messergebnisse wurde jeweils Acivicin als bekannter gGT-Inhibitor verwendet. Aus den so erhaltenen Daten wurde mittels GraphPad Prism5 über eine sigmoidale Dosis-Abhängigkeit mit variabler Steigung der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der einzelnen Kandidaten bestimmt: Für die Referenzsubstanz Acivicin wurde ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $69.6 \pm 1.1$  nM und somit ein berechneter apparenter  $\text{K}_i$ -Wert von 35 nM bestimmt. Für die 2-Amino-4-[Hydroxy-[4-(trifluoromethyl)-phenoxy]-phosphoryl]-

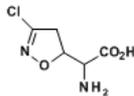
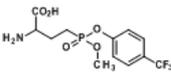
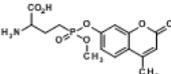
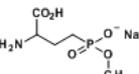
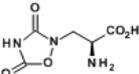
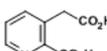
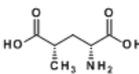
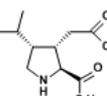
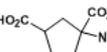
(AHPP), 2-Amino-4-methoxy-(4-methyl-2-oxochromen-7-yl)oxyphosphoryl- (AMOP) und 2-Amino-4-phosphono- (DL-AP4) Buttersäuren, die alle zu der Gruppe der Phosphonoester gezählt werden können, wurden  $IC_{50}$ -Werte von  $37.4 \pm 1.2$  nM,  $154.2 \pm 1.1$  nM und  $1.71 \pm 0.01$   $\mu$ M gemessen. Insbesondere bei AHPP-Buttersäure liegt das inhibitorische Potential über dem des Acivicins. Diese Inhibitoren wurden so modifiziert, dass keine kovalente Bindung zwischen den Substanzen und dem Molekül entsteht (Han et al., 2007). Die beiden Kandidaten Quisqualat, welches in der räumlichen Struktur dem Acivicin ähnelt, und Homoquinolat, einer aromatischen Verbindung mit zwei Carboxy-Gruppen, wiesen einen  $IC_{50}$ -Wert im  $\mu$ M-Bereich mit  $212.9 \pm 1.4$   $\mu$ M und  $291.4 \pm 1.2$   $\mu$ M auf. Diese Substanzen bildeten für weitere *in silico* Screenings die Grundlage zur Identifizierung spezifischer Inhibitoren.

Eine geringe Bindungsaffinität im mM-Bereich konnte bei den verbleibenden vier inhibitorisch wirksamen Kandidaten beobachtet werden. Die hier ermittelten  $IC_{50}$ -Werte für *trans*-1-Aminocyclobutan-1,3-Dicarbonsäure (ACBD) von 1.8 mM, 1-Aminocyclopentan-*cis*-1,3-Dicarbonsäure (ACPD) mit 2.8 mM und (2*S*,4*R*)-4-Methylglutamat mit 5.2 mM deuten auf eine sehr schwache Bindung dieser Inhibitoren hin. Das Einfügen einer zusätzlichen Amino-Gruppe bei ACBD inaktiviert den inhibitorischen Effekt auf die HpgGT. Im Vergleich zu (2*S*,4*R*)-4-Methylglutamat verliert die Substanz 4-Dimethylglutamat, welche eine zusätzliche Methyl-Gruppe an das C4 angehängt hat, das inhibitorische Potential. Eine Veränderung der Position der Methylgruppe von C4 auf C3 in (2*S*,3*R*)-3-Methylglutamat führt zum Verlust der inhibitorischen Wirkung. Selbst die Modifikation der räumlichen Anordnung der Reste reicht bei ACPD aus, den Kandidaten zu inaktivieren.

Für Dihydrokainsäure konnte keine genaue Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes durchgeführt werden, da sich der Bereich der Inhibition bereits an der Obergrenze der Löslichkeit und der einzusetzenden Inhibitor-Konzentration befand. Für diesen Inhibitor konnte nur eine Tendenz eines  $IC_{50}$ -Wertes von über 10 mM angegeben werden. Betrachtet man die Struktur dieses Moleküls näher, fällt eine starke Ähnlichkeit zu dem bereits beschriebenen Homoquinolat auf. Bei Dihydrokainat wurde der aromatische Ring durch ein Pyrrolidin-Ring ersetzt und eine zusätzliche Isopropyl-Gruppe eingefügt. Diese Modifikationen bedingen eine Erhöhung des  $IC_{50}$ -Wertes um zwei Log-Stufen. Ersetzt man zusätzlich die Isopropyl- durch eine Isopropenyl-Gruppe in der Kainsäure, verliert die Substanz ihren inhibitorischen Effekt auf die gGT (siehe Zusammenfassung in Tabelle 10 und Anhang).

Neben der Charakterisierung der enzymatischen Hemmung der Kandidaten wurden die Substanzen im Proliferations-Assay getestet. Hierzu wurden die HpgGT mit verschiedenen Konzentrationen an Inhibitor vorinkubiert und anschließend zu den bereits vorgelegten Zellen zugegeben. Nach einer 48stündigen Inkubationszeit wurde die Proliferation der Zellen mittels CellTiter-Glo®-Assay analysiert: Bei dem Referenzinhibitor Acivicin kommt es, wie bereits in Abbildung 35, zu einer Rekonstitution der T-Zell-Proliferation bei zunehmender Acivicin-Konzentration. Auffällig ist jedoch, dass der in diesem Assay gemessene IC<sub>50</sub>-Wert mit ~ 50 µM um drei Log-Stufen höher liegt als der durch den kinetischen Assay ermittelte Wert. Dieser Effekt kann bei allen inhibitorisch aktiven Substanzen mit einem IC<sub>50</sub>-Wert bis in den µM-Bereich ebenfalls beobachtet werden.

**Tabelle 10:** Substanzen mit inhibitorischem Effekt auf die HpgGT; die apparenten K<sub>i</sub>-Werte wurden mittels Cheng-Prusoff-Gleichung aus den experimentell bestimmten IC<sub>50</sub>-Werten berechnet. Mit \* markierte Substanzen wurden durch Prof. Han zur Verfügung gestellt.

CAS Number	Name	Molekulargewicht	Struktur	app. K <sub>i</sub> für HpgGT
42228-92-2	Acivicin	178.58		35 nM
n.a.*	AHPP-Buttersäure	341.22		19 nM
n.a.*	AMOP-Buttersäure	355.28		77 nM
n.a.*	DL-AP4-Buttersäure	219.11		0.86 µM
52809-07-1	Quisqualat	189.13		106 µM
490-75-5	Homoquinolat	181.15		146 µM
31137-74-3	(2S,4R)-4-Methylglutamat	161.17		5.2 mM
52497-36-6	Dihydrokainat	215.25		~ 10 mM
n.a.	cis-ACPD	173.17		2.6 mM
117488-23-0	trans-ACBD	159.14		0.8 mM

Um das Bindeverhalten der Inhibitoren genauer zu untersuchen, wurde für die Inhibitoren, die in dem *in vitro* Assay eine Bindeaffinität von unter 1mM aufwiesen, eine Massen-analyse

durchgeführt. Hierzu wurde HpgGT mit einem Überschuss an Inhibitor inkubiert und anschließend die Inhibitorbindung mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) bestimmt (siehe Abschnitt 2.6.4). Durch die Verwendung dieser Methode ist es möglich, das intakte HpgGT-Molekül zu untersuchen und gebundene Inhibitoren über einen Massenunterschied zu detektieren. Für das Protein HpgGT wurden Massen von 38063 und 21455 Da in einer prozentualen Verteilung der Intensität von 59 und 32 % detektiert. Vergleicht man nun die Proben mit Inhibitoren konnte für die Referenzsubstanz Acivicin eine zusätzliche Masse von 21597 Da zu 21 % gemessen werden. Dieser Massenunterschied von 142 Da entspricht bis auf ein Da genau dem theoretischen Gewicht, welcher durch die Bindung des Acivicins erwartet wird. Die Bindung findet an die kleine Untereinheit der gGT statt. Bei der Inhibition der HpgGT entsteht, wie bereits in der Kristallstruktur beschrieben, eine kovalente Etherverbindung durch die Substitution des Chlorids zwischen Acivicin und Thr380. Für die anderen im *in vitro* Assay validierten Inhibitoren kann nur bei AMOP-Buttersäure eine Massenzunahme gemessen werden. Die zusätzliche Masse wurde mit 21626 Da bestimmt, was eine Erhöhung um 171 Da entspricht. Für die Massenzunahme verantwortlich kann die Reaktion des Phosphonoesters mit dem nukleophil-aktiven Thr380 sein. Jedoch ergibt sich hier nur eine berechnete Massenzunahme von 165 Da, welche um sechs Da von der gemessenen Masse abweicht. Die Bindung des Inhibitors erfolgt analog zu Acivicin an die kleine Untereinheit der gGT. Alle weiteren vermessenen Inhibitoren weisen keine detektierbare kovalente Bindung an das Protein auf.

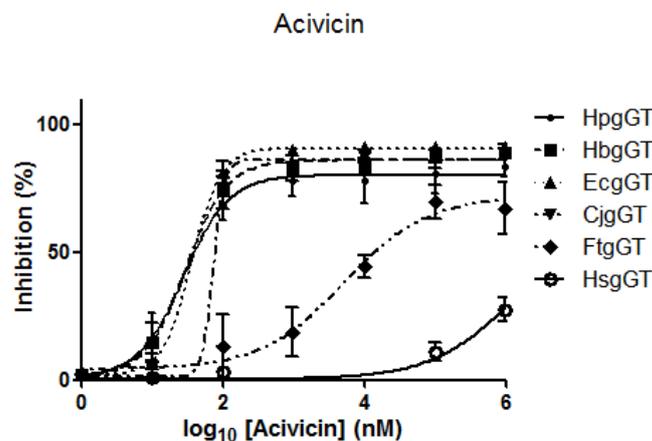
### 3.3.2.2 Analyse der Spezifität auf gGTs unterschiedlicher Spezies der validierten Inhibitorkandidaten

Neben der Bindung und Inhibition der *H. pylori* gGT ist es für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren essentiell, potentielle Kandidaten auch auf ihr inhibitorisches Potential gegen gGTs anderer Spezies zu testen. Aus den bereits im letzten Absatz beschriebenen *in vitro* Assays konnten neun Substanzen identifiziert werden, die gegenüber der HpgGT IC<sub>50</sub>-Werte zwischen 40 nM und 10 mM aufweisen. Für den Vergleich der Kandidaten wurden nur Substanzen verwendet, die bereits für die HpgGT einen IC<sub>50</sub>-Wert im nM- bzw. µM-Bereich aufwiesen. In der Analyse wurden die verschiedenen gGTs dreißig Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor bei 37°C vorinkubiert und anschließend in den *in vitro* Assay eingesetzt. Über die Absorptionsänderung wurde die Umsatzrate des gGpNAs (siehe 2.6.1) gemessen, in prozentuale Inhibition der gGT-Aktivität umgewandelt und gegen die Log<sub>10</sub>

umgerechnete Konzentration der einzelnen Inhibitoren aufgetragen. Im Folgenden wird auf die einzelnen getesteten Inhibitoren näher eingegangen:

a) *Acivicin*

Zunächst wurde Acivicin als Referenzinhibitor auf die gGT-Spezifität untersucht. Für die einzelnen gGTs ergaben sich dabei apparente  $K_i$ -Werte von 25 nM für HpgGT, 50 nM für CjgGT, jeweils 20 nM für EcgGT und HbgGT, 2,5  $\mu$ M für FtgGT und 550  $\mu$ M für die humane gGT (Abbildung 37). Die Abnahme des inhibitorischen Potentials des Acivicins gegenüber FtgGT und HsgGT deutet auf eine veränderte Bindetasche und der damit verbundenen Lokalisation der Substanz hin, wodurch die Ausbildung der kovalenten Bindung zu Thr380 erschwert wird. Ein weiteres Indiz hierfür ist das ähnliche Bindeverhalten bei den bakteriell näher verwandten gGTs von *H. pylori*, *H. bilis*, *C. jejuni* und *E. coli*.

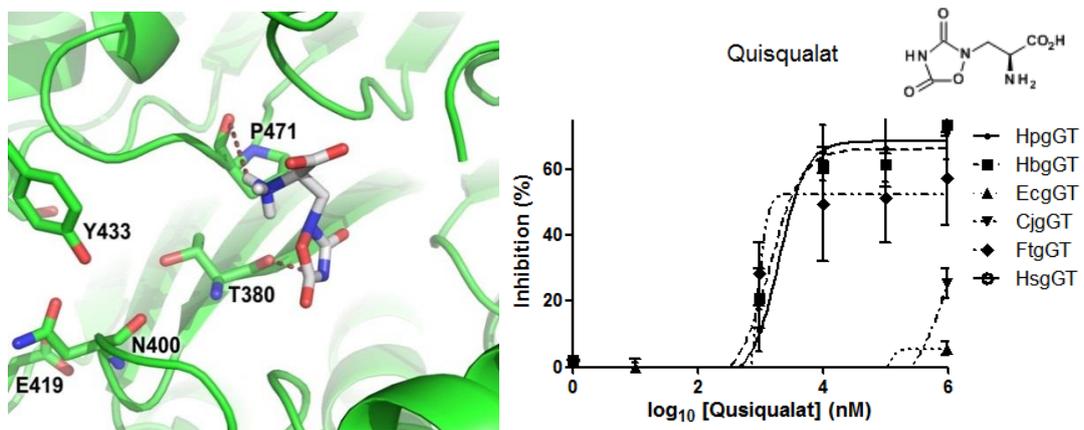


**Abbildung 37:** Darstellung der Spezies-Spezifität des Acivicins für HpgGT (50 ng), HbgGT (1000 ng), CjgGT (250 ng), EcgGT (500 ng), FtgGT (250 ng) und der humanen gGT (1000 ng). Für die Analyse der Inhibition wurde die gGT-Aktivität in 10  $\mu$ M gGpNA und 10 mM Gly-Gly bei 405 nm bei 37°C für 15 Minuten gemessen. (n= 3)

b) *2-Amino-3-(3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidin-2-yl)-Propansäure (Quisqualat)*

Die Substanz Quisqualat weist für die HpgGT einen  $K_i$ -Wert von 106  $\mu$ M auf. Werte in einem ähnlichen Bereich konnten für die gGTs aus *H. bilis* mit 75  $\mu$ M und *F. tularensis* mit 50  $\mu$ M gemessen werden. Für die Enzyme aus *C. jejuni* und *E. coli* wurde erst bei der maximal vermessenen Inhibitor-Konzentration eine Hemmung der gGT-Aktivität messbar, wobei die Unterschiede nicht signifikant waren und die Messwerte so nur eine Tendenz widerspiegeln. Für beide gGTs liegt der  $K_i$ -Wert bei

über 5 mM (Abbildung 38). Die humane gGT wurde durch den Kandidaten nicht gehemmt und stellt somit eine interessante Ausgangssubstanz für die Weiterentwicklung von Inhibitoren dar. Vergleicht man diese Daten mit dem virtuellen Docking, so fallen insbesondere die Wasserstoffbrückenbindung zu Thr380 und die hydrophobe Wechselwirkung mit dem Pro471 in HpgGT auf. Das Fehlen dieses Prolins in der HsgGT kann als Ursache für die Unwirksamkeit des Quisqualats gegen das humane Enzym diskutiert werden.

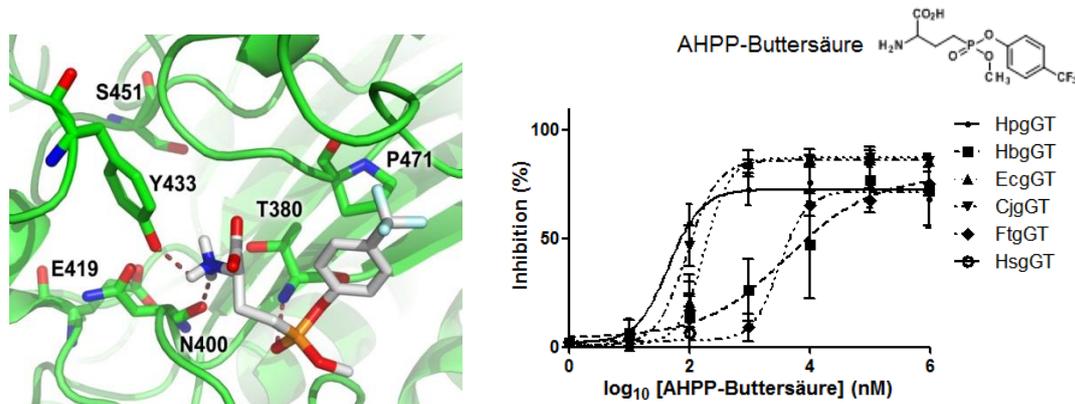


**Abbildung 38:** Darstellung der Spezies-Spezifität des Quisqualats (**rechts**) für HpgGT (50 ng), HbgGT (1000 ng), CjgGT (250 ng), EcgGT (500 ng), FtgGT (250 ng) und der humanen gGT (1000 ng). Für die Analyse der Inhibition wurde die gGT-Aktivität in 10  $\mu$ M gGpNA und 10 mM Gly-Gly bei 405 nm bei 37°C für 15 Minuten gemessen. (n= 3). Darstellung des aktiven Zentrums und virtuelles Docking des Quisqualats (**links**) mittels Molecular Docking Servers basierend auf der Kristallstruktur der HpgGT (2NQO).

c) *2-Amino-4-[Hydroxy-[4-(trifluoromethyl)-phenoxy]-phosphoryl]-Buttersäure (AHPP-Buttersäure)*

Der Kandidat AHPP-Buttersäure, bei dem es sich um einen Phosphonoester<sup>1</sup> handelt, wurde so gewählt, dass die Bindeaffinität gegenüber des Acivicins in EcgGT und HsgGT verstärkt wird (Han et al., 2007). Um die Selektivität der AHPP-Buttersäure zu vergleichen, wurden die Umsatzraten des gGpNAs für die unterschiedlichen gGTs in Anwesenheit der Substanz bestimmt: Für HpgGT ergab sich ein  $K_i$ -Wert von 25 nM, für CjgGT 50 nM, für EcgGT 90 nM, für HbgGT 2,1  $\mu$ M und für FtgGT ein Wert von 1,5  $\mu$ M. Für die humane gGT konnte jedoch im Gegensatz zu Acivicin keine Hemmung gemessen werden (Abbildung 39).

<sup>1</sup>Prof. Han, Kyoto University, Japan

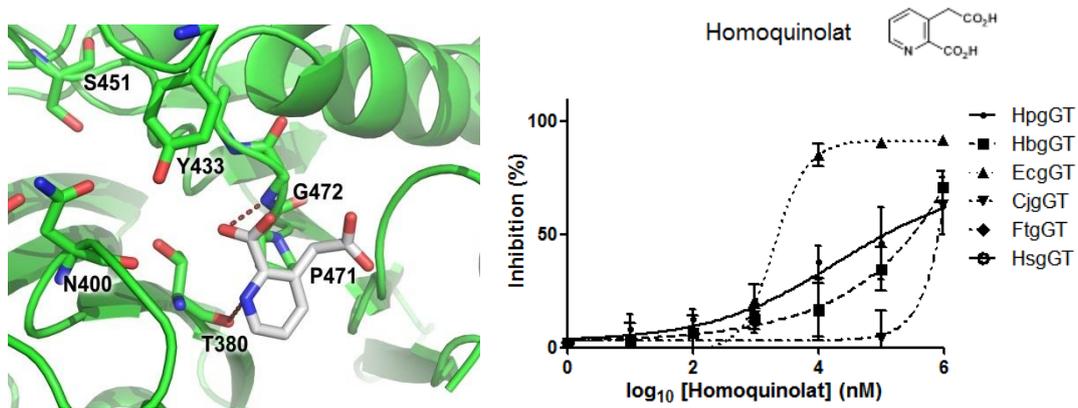


**Abbildung 39:** Darstellung der Spezies-Spezifität des AHPP-Buttersäure (**rechts**) für HpgGT (50 ng), HbgGT (1000 ng), CjgGT (250 ng), EcgGT (500 ng), FtgGT (250 ng) und der humanen gGT (1000 ng). Für die Analyse der Inhibition wurde die gGT-Aktivität in 10  $\mu$ M gGpNA und 10 mM Gly-Gly bei 405 nm bei 37°C für 15 Minuten gemessen. (n= 3). Darstellung des aktiven Zentrums und virtuelles Docking (**links**) mittels Molecular Docking Servers basierend auf der Kristallstruktur der HpgGT (2NQO).

Von besonderem Interesse ist der Unterschied der Bindeaffinität von zwei Log-Stufen zwischen HpgGT und HbgGT. Betrachtet man die berechneten Wechselwirkungen des Inhibitors mit der gGT, werden ionische Wechselwirkungen mit Tyr433 und Wasserstoffbrückenbindungen mit Thr380, Asn400 und Tyr433 vorhergesagt. Diese Bindungen erklären nicht den Unterschied zwischen den beiden gGTs. Jedoch kann die Wechselwirkung mit Tyr433, welches in den gGTs von *F. tularensis* und *H. sapiens* durch ein Phenylalanin ersetzt ist, eine mögliche Erklärung für das verminderte bzw. verlorengegangene inhibitorische Potential der AHPP-Buttersäure liefern.

#### d) Homoquinolat

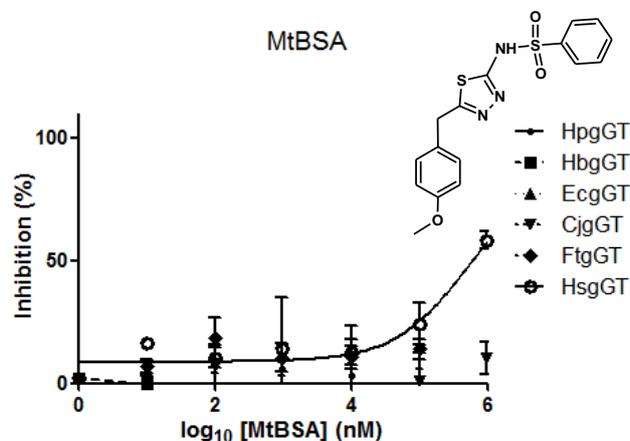
Der  $K_i$ -Wert für Homoquinolat bei der HpgGT liegt bei 250  $\mu$ M. Für EcgGT wurde ein deutlich niedrigerer Wert von 1  $\mu$ M, bei CjgGT 2,5 mM und bei HbgGT 500  $\mu$ M gemessen. Für die Enzyme FtgGT und HsgGT konnte mit Homoquinolat keine Inhibition der gGT-Aktivität erzielt werden (Abbildung 40). Betrachtet man die berechneten Interaktionen, so fallen insbesondere die ionische Wechselwirkung mit Pro471 und Wasserstoffbrückenbindung mit Thr380 und Gly472 auf. Daraus lassen sich keine Rückschlüsse auf die beobachteten Unterschiede in der Bindeaffinität des Inhibitors ziehen.



**Abbildung 40:** Darstellung der Spezies-Spezifität des Homoquinolats (**rechts**) für HpgGT (50 ng), HbgGT (1000 ng), CjgGT (250 ng), EcgGT (500 ng), FtgGT (250 ng) und der humanen gGT (1000ng). Für die Analyse der Inhibition wurde die gGT-Aktivität in 10  $\mu$ M gGpNA und 10 mM Gly-Gly bei 405 nm bei 37°C für 15 Minuten gemessen. (n= 3). Darstellung des aktiven Zentrums und virtuelles Docking (**links**) mittels Molecular Docking Servers basierend auf der Kristallstruktur der HpgGT (2NQO).

e) *N*-[5-[(4-methoxyphenyl)methyl]-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-4-methylbenzenesulfonamid (*MtBSA*)

Neben den bereits beschriebenen Inhibitoren wurde zusätzlich die Substanz MtBSA auf Selektivität getestet. Der aus der Literatur bekannte Inhibitor für die humane gGT wurde bislang nur auf eukaryotischen gGTs getestet (King et al., 2009). Für alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten bakteriellen gGTs konnte keine Inhibition erzielt werden. Einzig für das humane Enzym wurde ein  $K_i$ -Wert von 800  $\mu$ M bestimmt (Abbildung 41).



**Abbildung 41:** Darstellung der Spezies-Spezifität des MtBSAs für HpgGT (50 ng), HbgGT (1000 ng), CjgGT (250 ng), EcgGT (500 ng), FtgGT (250 ng) und der humanen gGT (1000 ng). Für die Analyse der Inhibition wurde die gGT-Aktivität in 10  $\mu$ M gGpNA und 10 mM Gly-Gly bei 405 nm bei 37°C für 15 Minuten gemessen. (n= 3)

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im Rahmen der Analyse der Spezies-Spezifität der gGT-Inhibitoren Substanzen identifiziert wurden, die eine deutlich erhöhte Affinität zu bakteriellen gGTs und insbesondere zu HpgGT und homologen Enzymen nahe verwandter Spezies aufweisen. Ein besonders vielversprechender Kandidat für die Weiterentwicklung und Optimierung ist das Quisqualat. Durch die selektive Hemmung der HpgGT kann Resistenzbildung verringert und das Risiko der Nebenwirkungen der Standard-Antibiotika auf die Darmflora möglicherweise abgeschwächt werden. Das Projekt wird bereits im Rahmen des m<sup>4</sup>-Clusters in Kooperation mit der *Priaxon AG* weitergeführt und an der Synthese verbesserter Substanzen gearbeitet, die auf den in dieser Arbeit generierten Daten aufbauen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die konservierte Funktion der *Helicobacter* $\gamma$ -Glutamyl-transpeptidase als Immunevasionsfaktor

*H. pylori* schafft es trotz inflammatorischer Immunantwort, lebenslang in der menschlichen Magenschleimhaut zu persistieren. Eine wichtige Voraussetzung für diese chronische Infektion stellt die Evasion vor dem Immunsystem dar. Hierzu stehen dem Keim zur aktiven Vermeidung der Immunantwort verschiedene Mechanismen zur Verfügung (Gebert et al., 2003; Gobert et al., 2001a; Jonsson et al., 2004a). Ein bislang kaum untersuchter Immunevasionsfaktor ist die *H. pylori* gGT, ein pathogenitätsassoziiertes Faktor, der G1 Zellzyklus Arrest in T-Zellen als auch Apoptose in AGS-Zellen induziert (Kim et al., 2010; Schmees et al., 2007). Ähnliche Effekte konnten auch für die *C. jejuni* gGT gezeigt werden. gGT-defiziente Stämme dieser Bakterien induzieren in verringertem Maß Apoptose in Kolon-Zelllinien und zeichnen sich durch verminderte Kolonisierung aus (Barnes et al., 2007; Hofreuter et al., 2008).

Neben der immunmodulatorischen Aktivität ist auch die Spaltung von GSH bei *Francisella tularensis* eine mögliche physiologische Funktion der gGT, wodurch dem Bakterium Cystein zur Verfügung gestellt wird. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *F. tularensis*- $\Delta$ gGT-Stämme ebenfalls eine stark verminderte Kolonisierung und somit reduzierte Virulenz in Mäusen aufweisen (Alkhuder et al., 2009). Ein immunmodulatorischer Effekt wurde bislang nur vereinzelt beobachtet und die Ursachen nicht im Detail untersucht.

Des Weiteren wurden in der Literatur bislang nur gGTs einzelner Organismen charakterisiert, welche sich aufgrund der unterschiedlichen Fragestellungen in der Analyse nicht direkt vergleichen lassen. Um dieser Problematik zu begegnen, wurden im Rahmen dieser Arbeit gGTs aus verschiedenen Organismen rekombinant hergestellt, charakterisiert und ihre Funktion untersucht. Die rekombinante Herstellung der humanen gGT konnte in *E. coli* nicht funktionell realisiert werden, da das produzierte Protein keine Autoproteolyse in das aktive Heterodimer aufwies. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte die fehlende Glykosylierung des Proteins sein: Ohne eine korrekte Glykosylierung, z.

B. an Aminosäure Asn95, findet keine Autoprocessing statt (West et al., 2011). Die Überexpression in humanen Zelllinien ergab hingegen prozessiertes Protein. Diese Problematik stellte sich bei den bakteriellen Proteinen nicht. Neben den bereits beschriebenen gGTs wurden weitere rekombinante Enzyme von *H. bilis*, *F. tularensis* und *C. jejuni* hergestellt.

Eine einzigartige Besonderheit hierbei war, dass für *H. bilis* zwei gGT Gene identifiziert und die Proteine gereinigt werden konnten. Bei genauerer Untersuchung der phylogenetisch unterschiedlich entstandenen gGTs wurde festgestellt, dass es sich nur bei einer der beiden gGTs um ein homologes Enzym zu den anderen bakteriellen gGTs mit Autoprocessing und gGT-Aktivität handelt (Rossi et al., 2012). Die Funktion der zweiten HbgGT ist bislang unbekannt und wird Gegenstand weiterer Forschung sein.

Die gGT von *Helicobacter pylori* wurde 2007 als wichtiger Virulenzfaktor identifiziert (Schmees et al., 2007). Der immunsuppressive Effekt der gGT wurde erst in den letzten Jahren näher untersucht. Jedoch wurden bislang nur spezifische Effekte auf den Zellzyklus analysiert und keine vollständige Betrachtung angestrebt. Die in der Literatur beschriebenen Effekte der gGT auf T-Zellen und deren möglicher Wirkmechanismus sind entsprechend vielfältig: Die gGT hydrolysiert extrazelluläres Glutamin und Glutathion zu Glutamat als Energiequelle (Leduc et al., 2010; Shibayama et al., 2007).

Dies hat zwei Effekte: Durch den Entzug des Glutamins kann es zum einen zu einer Hemmung der T-Zell-Proliferation kommen (Carr et al., 2010). Zum anderen kann durch den Entzug des GSHs oxidativer Stress für umliegende Zellen erzeugt werden. Es kommt zu einer Erhöhung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion, welche in DNA-Schädigung, der Hochregulierung von IL-8 und der Aktivierung von NF-κB resultiert (Gong et al., 2010). Daneben wurden Effekte auf die Proliferation durch Apoptose-Induktion beschrieben (Shibayama et al., 2003). Dies wurde in der Literatur kontrovers diskutiert und konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

Um ein besseres Verständnis sowie Vergleichbarkeit zwischen der rekombinant hergestellten gGTs und deren Funktion, z. B. dem Effekt auf die T-Zell-Proliferation, zu erhalten, wurde die enzymatische Aktivität der gGTs

charakterisiert. Zur Aktivitätsbestimmung wurde der standardisierte enzymatische Assay verwendet, welcher die gGpNA-Umsatzrate bei 37°C und pH 8.0 bestimmt. Vergleicht man die in dieser Arbeit rekombinant hergestellten gGTs mit in der Literatur beschriebenen kinetischen Parametern für gGTs, so finden sich für die Enzyme jeweils gute Übereinstimmungen mit den publizierten Parametern. Für *H. pylori* gGT wurden die kinetischen Parameter  $K_m^{gGpNA} = 9,8 \pm 1,5 \mu\text{M}$  und einer spezifischen Aktivität von 11,3 U/mg ermittelt, welche vergleichbar mit den Werten aus der Literatur mit  $K_m^{gGpNA} = 10,9 \mu\text{M}$  und einer spezifischen Aktivität von 12,5 U/mg sind (Boanca et al., 2006a). Diese Vergleichbarkeit gilt auch für die gGT aus *E. coli* mit Werten von  $K_m^{gGpNA} = 5,7 \pm 1,5 \mu\text{M}$  und einer spezifischen Aktivität von 1,5 U/mg [ $K_m^{gGpNA} = 35 \mu\text{M}$  und einer spezifischen Aktivität von 1,41 U/mg (Suzuki et al., 1986)] und die humane gGT mit Werten von  $K_m^{gGpNA} = 678 \pm 231 \mu\text{M}$  und einer spezifischen Aktivität von 0,3 U/mg [ $K_m^{gGpNA} = 614 \mu\text{M}$  und einer spezifischen Aktivität von 0,28 U/mg (Castonguay et al., 2007)].

Neben diesem standardisierten Aktivitätsassay wurde auch die pH-Abhängigkeit der gGTs untersucht, um die tatsächliche enzymatische Aktivität im Kolonisierungsmilieu zu messen. Die hier ermittelten Werte mit einem pH-Optimum bei pH 8.0 wurden durch die in der Literatur beschriebenen Studien für die *H. pylori* gGT bestätigt. Betrachtet man die pH-Bereiche der weiteren gGTs, fallen insbesondere die HbgGT und FtgGT auf, die ein deutlich niedrigeres pH-Optimum aufweisen. Für *H. bilis* ist dies verwunderlich, da der Keim an seinem Kolonisierungsort im Magen / Darm von Mäusen im Vergleich zum menschlichen Magen und des dort kolonisierenden *H. pylori* eine neutralere Umgebung vorfindet. Bei *F. tularensis* könnte diese pH-Anpassung evolutionär entstanden sein, um die Funktionalität des Enzyms im sauren Milieu der infizierten Makrophagen (Santic et al., 2010) zu gewährleisten.

Bislang wurden Vergleiche nur zwischen gGTs jeweils zweier Spezies gezogen. In dieser Arbeit konnte durch die Herstellung von fünf bakteriellen und der humanen gGT Vergleiche unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden. Neben der bereits beschriebenen Analyse der kinetischen Parameter und pH Optima wurde die Substratspezifität der einzelnen gGTs untersucht. Bislang wurde dies außer in *E. coli* (Suzuki et al., 1986) mit keiner der hier verwendeten bakteriellen gGTs durchgeführt. Weitere Daten gibt es in der Literatur für *B.*

*anthracis* gGT (Hu et al., 2012) und das humane Enzym (Keillor et al., 2005; Wickham et al., 2011). In dieser Arbeit wurde für die gGTs aus *Helicobacter pylori*, *Helicobacter bilis*, *Campylobacter jejuni* bzw. *Homo sapiens* eine Reduktion der gGpNA-Umsatzrate bei Austausch des Akzeptors GlyGly gemessen. Im Gegensatz dazu konnte eine vergleichbare gGpNA-Umsatzrate für EcgGT bei Verwendung von Cystein (88,5 % der GlyGly-Aktivität) und eine deutlich gesteigerte Umsatzrate durch den Einsatz von Histidin bei der FtgGT (189,8 % der GlyGly-Aktivität) erzielt werden. Für EcgGT wird eine Rolle des Enzyms in der Glutathion-Biosynthese diskutiert, welche durch die hier gezeigte Affinität unterstützt wird. *F. tularensis* benötigt durch das Fehlen funktioneller Biosynthesewege für sein Wachstum verschiedene Aminosäuren, darunter auch Histidin (Larsson et al., 2005). Die Aktivierung der FtgGT durch Zugabe von Histidin könnte ein Hinweis auf eine hohe Bindeaffinität dieser Aminosäure in der Bindetasche und somit auf eine Beteiligung der gGT in der Bereitstellung von Histidin als Wachstumsquelle für das Bakterium sein.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die gGTs zusätzlich zu ihrer immunevasiven Rolle für die Keime die Funktion der Bereitstellung verschiedener Aminosäuren als Wachstumsquellen übernehmen.

Betrachtet man den Effekt der verschiedenen bakteriellen gGTs auf die T-Zell-Proliferation, so gibt es deutliche Unterschiede in der Hemmung, wobei für alle gGTs ein Effekt beobachtet werden kann. Dabei kann in dem bisherigen Versuchsaufbau die Hemmung der T-Zell-Proliferation zum Teil durch die Depletion des Glutamins im Medium erklärt werden. Dies wird momentan durch weiterführende Versuche analysiert (nicht publizierte Daten) und konnte zum Teil bereits bestätigt werden. Jedoch konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass neben der Glutamin-Depletion weitere Wirkmechanismen der gGT auf die T-Zellen vorhanden sind. Durch den Einsatz der gereinigten Fraktionen in einer hohen Verdünnung (1:100) in frischem Medium mit L-Gln konnte ausgeschlossen werden, dass der Effekt Glutamin-abhängig ist.

Die Erklärung des gGT-Effektes durch die Depletion des Glutamins als einzige Ursache kann auch nicht erklären, warum die gGT für die Etablierung der Infektion essentiell ist. Die Infektion eines  $\Delta$ gGT-Stammes in Mäusen kann sich

nicht etablieren. Werden Rag<sup>-/-</sup> Mäuse infiziert, die B- und T-Zell-defizient sind, kolonisiert der gGT-defiziente Keim den Magen (Florian Anderl, nicht publizierte Daten). Um einen direkten Einfluss auf die T-Zell-Proliferation *in vivo* zu haben, müsste der immunmodulatorische Effekt der gGT im Thymus bzw. den Lymphknoten der Mäuse wirken (Raff et al., 1973). Jedoch ist die Glutamin-Depletion lokal begrenzt und kann so nicht die Erklärung für das beobachtete Phänomen sein. Eine mögliche Erklärung wäre hier eine niedermolekulare Substanz (Mediator), die in geringsten Konzentrationen die Hemmung der Proliferation bewirken kann. In dieser Arbeit konnten erste Hinweise auf die strukturelle Beschaffenheit dieses Moleküls gefunden werden. Die abschließende Analyse des Mediators steht noch aus und wird weitergeführt. Zusätzlich soll der gGT-Effekt *in vivo* im Mausmodell genauer untersucht werden. Hierzu sollen neben der Analyse der HpgGT und deren Auswirkungen auf die T-Zellen *in vivo* auch *H. pylori*-Stämme generiert werden, deren gGT durch Punktmutanten, wie der im Anschluss beschriebenen Glu419Ala, ersetzt wurde.

Bei der Analyse der Punktmutanten und des Vergleichs der enzymatischen Aktivität mit der Proliferationshemmung fallen insbesondere die Punktmutanten Glu419Ala, Tyr433Ala und Pro471Ala auf. Das Verhalten dieser Mutanten entspricht nicht dem Verhältnis zwischen Proliferationshemmung und Aktivität und liefert so Hinweise auf die Funktion dieser Aminosäuren. Die Mutante Glu419Ala zeigte eine Aktivität von 0,29 U/μg, wobei dies nicht mit dem Grad der Hemmung der Proliferation von über 45 %, verglichen mit 65 % durch das wildtypische Enzym, korreliert. Im Gegensatz hierzu kommt es zu einer starken Abnahme dieses inhibitorischen Effektes im Vergleich zur Aktivität bei den Mutanten Tyr433Ala (20 % Hemmung bei 0,57 U/μg) und Pro471Ala (keine signifikante Hemmung bei 0,98 U/μg). Dies deutet auf eine wichtige Rolle der Reste Try433 und Pro471 für den Effekt der T-Zell-Hemmung sowie eine Rolle des Glu419 für die Lokalisierung eines möglichen Substrates und der damit verbundenen Spezifität hin. Zusätzlich zur Analyse der kinetischen Parameter und der Proliferationshemmung konnten in den Punktmutanten der HpgGT unterschiedliche Effekte auf die Autoprozessierung festgestellt werden. Insbesondere für die Punktmutante Thr380 konnten hier in Übereinstimmung mit der Publikation durch Hashimoto et al., 1995, welche die *E. coli* gGT untersucht,

bei einem Austausch von Ala und Serin eine Prozessierungseffizienz von 0 % für T380A bzw. 15 % für T380S festgestellt werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Funktionsweise der verschiedenen gGTs deuten auf eine mehrfache Beeinflussung des Immunsystems hin. Neben der bereits in der Literatur diskutierten Glutamin-Depletion entsteht durch die enzymatische Aktivität ein Mediator, der direkten Einfluss auf die T-Zell-Proliferation hat. Durch die Identifizierung dieses Mediators würden sich diverse Anwendungsmöglichkeiten ergeben, da es sich um eine immunsuppressive Substanz vergleichbar zu Cortisol mit hohem medizinischen und kommerziellen Potential handeln würde. Erste Experimente mit Lösungen, in denen der Mediator enthalten war, konnten vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die Immunsuppression wie Cortisol aufweisen (Anahita Javaheri, nicht publizierte Daten). Die Beeinflussung des Immunsystems durch die gGT eröffnet zusätzlich die Möglichkeit, den Keim durch Immunisierung wieder zugänglich für die Immunabwehr zu machen und so einen wirkungsvollen Impfschutz zu erzeugen. Dieser Ansatz wird derzeit in präklinischen Studien im Rhesusaffen in Kooperation mit dem deutschen Primatenzentrum evaluiert. Für die Impfstudien konnte in dieser Arbeit ein Teil der wissenschaftlichen Grundlagen generiert und so der Fortschritt der Impfstoff-Entwicklung gewährleistet werden.

Neben der direkten Anwendbarkeit der Resultate zur Immunevasion konnten durch die biochemische Charakterisierung der verschiedenen gGTs und deren Mutanten weitere Einblicke in die Unterschiede des katalytischen Zentrums gewonnen werden. Hierdurch wurden die Voraussetzungen geschaffen, durch ein besseres Verständnis der Aktivität und des katalytischen Zentrums neue gGT-spezifische Inhibitoren zu identifizieren und auf deren Selektivität zu untersuchen.

#### **4.2 Die $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase als Target für die Entwicklung von *Small Molecule Inhibitors* (SMIs)**

Neben der essentiellen Rolle der *H. pylori* gGT für die erfolgreiche Infektion durch den Erreger, ist insbesondere die humane gGT durch die metabolische Funktion in Neoplasien (Pompella et al., 2006) für die Inhibitor-Entwicklung von

großem Interesse. So wurde in den vergangenen Jahren intensiv an der Identifizierung neuer, spezifischer gGT-Inhibitoren geforscht. Neben dem häufig verwendeten gGT-Inhibitor ( $\alpha,S,5S$ )- $\alpha$ -Amino-3-Chloro-4,5-Dihydro-5-Isoxazole-Essigsäure (Acivicin), sind auch weitere Glutamin-Analoga wie 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucin (DON) oder *O*-Diazoacetyl-L-Serin (Azaserin) beschrieben (Tate and Meister, 1977; Wada et al., 2008). Diese Inhibitoren besitzen starke zytotoxische Nebenwirkungen, da sie neben der gGT auch Glutamin-abhängige Amidotransferasen und Enzyme verschiedener Biosynthesewege (Aminosäuren & Pyrimidin) inhibieren (Ahluwalia et al., 1990; Weber and Prajda, 1994). Neben diesen Inhibitoren ist auch L-2-amino-4-Buttersäure beschrieben, welche ebenfalls eine Hemmung der gGT bewirkt, aber im Gegensatz zu den bisherigen Inhibitoren reversibel an das Enzym bindet (Stein et al., 2001).

Zur Identifizierung neuer Inhibitoren gegen die gGT wurden mehrere Runden *In silico* Screenings (ISS) durchgeführt. Durch die Anwendung dieser Methode konnten z. B. für Caspasen (Fattorusso et al., 2005) oder Protein-Kinasen (Forino et al., 2005; Sandberg et al., 2005) neue Inhibitoren identifiziert und validiert werden. ISS ist bislang kein Ersatz für die klassische *in vitro* Testung mittels *High Throughput Screening* (HTS), es kann jedoch zu einer Reduktion der Kosten für die Entwicklung neuer Inhibitoren beitragen, wodurch eine Testung verschiedener Kandidaten im Rahmen dieser Arbeit möglich war.

Neben der hier beschriebenen Methoden des HTS und des ISS wurden für die gGT durch rationales Design neue Inhibitor-Klassen entwickelt und synthetisiert. In der Literatur wurde sich bisher auf das humane Enzym konzentriert, um die Spezifität möglicher Chemotherapeutika zu erhöhen. Dabei wurden verschiedene Ansätze verfolgt: Zum einen die Synthese und Optimierung von Glutamin-Analoga, ähnlich des Acivicins. Für gGTs wurden in Studien neben Phosphonoester (Han et al., 2007) auch Sulfat-Derivate des L-Glutamats (Lherbet and Keillor, 2004) als weitere Inhibitoren identifiziert. Der große Nachteil bei diesem Vorgehen ist, dass diese Inhibitoren häufig dieselben toxischen Nebeneffekte wie Acivicin aufweisen. Diese Effekte müssen durch Modifikationen reduziert werden.

Zum anderen wurde zunächst durch HTS nach neuen Inhibitorclassen gescreent, die sich strukturell von Glutamat unterscheiden. Diese Substanzen wurden anschließend chemisch modifiziert, um die Spezifität gegen die humane gGT zu optimieren (King et al., 2009).

Der Ansatz in dieser Arbeit baut auf den beschriebenen Methoden und Publikationen auf, fokussiert aber im Gegensatz dazu die Spezifität identifizierter Inhibitoren gegen die HpgGT als möglichen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Antiinfektiva gegen *H. pylori*. Hierdurch soll eine Kreuzreaktion mit anderen Bakterien und dem humanen Homolog vermieden werden. Bei der gGT von *H. pylori* handelt es sich um einen essentiellen Virulenzfaktor zur Etablierung der Infektion. Eine Resistenzbildung gegen dieses Enzym, z. B. durch strukturelle Modifikationen des Proteins, korreliert direkt mit einer Reduktion der enzymatischen und immunmodulatorischen Aktivität, wodurch eine Selbstlimitierung erzeugt wird. Aus diesen Gründen bietet dieses Enzym optimale Voraussetzungen für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren. In einer Studie, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der gGT durch Acivicin im Mausmodell zu einer Beseitigung der Infektion führt (Florian Anderl, nicht publizierte Daten).

Ausgehend von dem aus der Literatur mehrfach beschriebenen gGT-Inhibitor Acivicin, wurden zunächst Screening-Assays etabliert und validiert. Vergleicht man die in der Literatur publizierten  $K_i$ -Werte von 20 bis 80  $\mu\text{M}$  des Acivicins (Boanca et al., 2007; Williams et al., 2009) mit denen in dieser Arbeit ermittelten Werten von 40 nM, so stellt man einen Unterschied von drei Log-Stufen fest. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse in Bezug auf die Assay-Bedingungen, so fällt auf, dass alle publizierten Messungen auf einem modifizierten gGpNA-Assay unter Zusatz von Glutamin bzw. Glutamat bestimmt wurden. Durch die Zugabe des Glutamins wird eine weitere Substanz im Assay eingesetzt, die mit dem zu vermessenden gGpNA um die Bindungstasche konkurriert. Die Beeinflussung durch das Glutamin könnte in direktem Zusammenhang mit den hier ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werten im Proliferations-Assay stehen, in welchem RPMI 1640 verwendet wurde. In diesem Medium ist bereits 2 mM Glutamin enthalten und kann mit dem Inhibitor um die Bindung konkurrieren. So konnten im Proliferations-Assay ebenfalls  $\text{IC}_{50}$ -Werte im  $\mu\text{M}$ -Bereich gemessen werden. Bisherige

Untersuchungen zur Bindung des Acivicins wurden nur an den gGTs von *E. coli*, *H. pylori* und *H. sapiens* durchgeführt und paarweise miteinander verglichen. In dieser Arbeit wurden neben diesen Spezies ein Vergleich mit zu *H. pylori* verwandten bakteriellen gGTs (*H. bilis* und *C. jejuni*), sowie aus *F. tularensis*, durchgeführt.

Betrachtet man die einzelnen Substanzen, so wurde für Quisqualat die Inhibition der Na<sup>+</sup>-unabhängigen Cystin-Aufnahme in Zellen (Allen et al., 2000), jedoch kein direkter Zusammenhang mit der Inhibition der gGT beschrieben. Vergleicht man die in dieser Studie beschriebenen Effekte für die Inhibition der Aufnahme des Cystins durch den Einsatz von 0,1 bis 0,3 mM Quisqualat und dem Einsatz von 5 mM Acivicin, welcher deutlich über der in dieser Arbeit gemessenen K<sub>i</sub>-Wert von 26 nM liegt, ergeben sich vergleichbare Effekte. Fasst man diese Ergebnisse mit den in der hier vorliegenden Arbeit gemessenen Inhibition der gGT durch Quisqualat zusammen, ist es möglich, dass die Hemmung der gGT-Aktivität durch die Substanz bereits durch Allen et al., 2000 beobachtet, aber möglicherweise falsch zugeordnet wurde. Jedoch ist zu beachten, dass die Inhibition des Quisqualats nicht für das humane Enzym nachgewiesen werden konnte und für die in der Studie untersuchte *Rattus norvegicus* gGT keine Inhibitor-Daten vorliegen.

Homoquinolinat ist in der Literatur als Agonist des NMDA-Rezeptors beschrieben (Erreger et al., 2005; Siggins et al., 2003). Dieser Glutamat-Rezeptor wird in Zusammenhang mit der Sensitivität und Toleranz gegen verschiedene Drogen gebracht. Durch die Bindung des Homoquinolinats an die Glutamat-Bindetasche wird der Rezeptor teilweise aktiviert, es kommt zu einer Öffnung des Ionenkanals. Der in dieser Arbeit gefundene inhibitorische Effekt auf die enzymatische Aktivität der gGT wurde bislang nicht beschrieben. Für AHPP-Buttersäure, einem Phosphonoester-Analogon zu Glutamat, konnte eine Inhibition der bakteriellen gGTs im nM-Bereich gemessen werden. In dieser Arbeit konnte, anders als in der Literatur beschrieben, die irreversible Inhibition der HsgGT beobachtet werden (Han et al., 2007). Eine mögliche Erklärung hierfür liefert bereits erwähnte Publikation, in der beschrieben wird, dass die Inaktivierung der gGT-Aktivität in Anwesenheit von Donor-Substrat stark verlangsamt ist. Ebenfalls konnte keine

irreversible Bindung des Inhibitors an die gGT in der MS-Analyse nachgewiesen werden.

Der ebenfalls in dieser Arbeit getestete Inhibitor MtBSA wurde bereits mittels rationalem Design für die humane gGT optimiert und zeigt eine nicht-kompetitive Hemmung der humanen gGT (King et al., 2009). In dieser Publikation wurde nur ein Vergleich zwischen eukaryotischen gGTs durchgeführt und bakterielle gGTs völlig außer Acht gelassen. Mit einem publizierten apparenten  $K_i$ -Wert von 80  $\mu\text{M}$ , eine Log-Stufe niedriger zu den hier gemessenen Werten von 800  $\mu\text{M}$ , liegt ein deutlicher Unterschied vor. Eine Erklärung könnte die unterschiedliche Glykosylierung der in dieser Arbeit verwendeten nativen, aus humanen Zelllinien gereinigten HsgGT im Vergleich zu der rekombinant in *Pichia Pastoris* hergestellten gGT liefern. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich das Glykosylierungsmuster in *P. pastoris* mit einer Hyper-Mannosylierung deutlich von dem humanen unterscheidet (Jacobs et al., 2008). Zwar wurde in der Literatur die Aktivität der unterschiedlich hergestellten gGTs verglichen (King et al., 2009), jedoch nie eine genaue Analyse der Auswirkungen der Glykosylierung vorgenommen. Da die Glykosylierung, z. B. an Aminosäure Asn95 (West et al., 2011), bereits eine essentielle Rolle für die korrekte Autoprozessierung spielt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Auswirkungen auf die Affinität und Spezifität von Inhibitoren auf die HsgGT auftreten. Dies bedarf einer genaueren Untersuchung, die im Anschluss an diese Arbeit durchgeführt werden soll.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zusätzlich die Kristallstrukturen für das Enzym HpgGT alleine, sowie die Struktur der Acivicin-gebundenen HpgGT mit einer Auflösung von 1.49 Å gelöst werden. Sowohl die Struktur der gGT mit einer zentralen homologen  $\alpha\beta\alpha$ -Kernstruktur, die typisch für Ntn-Hydrolasen ist, als auch die Bindung des Acivicins, ist identisch zu den bereits publizierten gGT-Strukturen (Wada et al., 2008; Williams et al., 2009). In diesen Studien wurde sowohl die Bindung des Acivicins an die *H. pylori* gGT als auch an die *E. coli* gGT untersucht. Die Reste Thr380 und Thr398 (äquivalent zu Thr391 und Thr409 in *E. coli*), die die katalytisch aktive Thr-Thr-Dyade bilden, sowie Gly472 und Gly473 (äquivalent zu Gly483 und Gly484 in *E. coli*), welche für die räumliche Ausrichtung des Inhibitors wichtig sind, werden dort beschrieben. In der EcgGT befindet sich hier ein zusätzliches Wasser-Molekül, welches zwischen Inhibitor

und Oxyanion-Loch lokalisiert ist. Zusätzlich ist es gelungen, einen Kristall der HpgGT zu generieren, der in der Lage ist, Inhibitoren nachträglich aufzunehmen (*soakable crystal*), wodurch die Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehung neuer Inhibitor-Kandidaten deutlich vereinfacht wird.

Durch den Vergleich des inhibitorischen Effekts des Acivicins und der neu identifizierten Inhibitoren auf die verschiedenen gGTs, konnten in dieser Arbeit neue Erkenntnisse für die Optimierung der Bindeaffinität und der Spezies-Spezifität der Inhibitoren gewonnen werden. Es wurden insgesamt neun neue Substanzen identifiziert, die die gGT-Aktivität der HpgGT inhibieren. Insbesondere der Inhibitor Homoquinolinat, welcher in der Literatur als Agonist des NMDA-Glutamatrezeptors beschrieben wurde und für den Auswirkungen auf den inhibitorischen Effekt durch diverse strukturelle Modifikationen getestet wurden, bildet die Grundlage für eine Weiterentwicklung. Die hier entstandenen Daten sind Gegenstand eines bereits geförderten Projektes und werden im Rahmen des m<sup>4</sup>-Clusters weitergeführt.

## 5 Zusammenfassung

Die Infektion mit *Helicobacter pylori* mit einer Durchseuchungsrate von über 50 % weltweit führt beim Menschen zu einer chronischen Gastritis in der Magenschleimhaut. Durch die lebenslängliche Infektion entwickeln 20 % der Patienten eine Atrophie, intestinale Metaplasie oder sogar ein Magenkarzinom. Durch die zunehmenden Antibiotika-Resistenzen werden allerdings die Therapiemöglichkeiten immer weiter eingeschränkt, wobei die Entstehung von Kreuzresistenzen als besonders problematisch anzusehen ist. Angesichts dieser Situation gibt es auch für *Helicobacter pylori* einen wachsenden medizinischen Bedarf an hochselektiven Antiinfektiva mit neuartigen Hemm-Mechanismen.

Durch die Charakterisierung des essentiellen immunmodulatorischen Virulenzfaktors  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (gGT) von *Helicobacter pylori* konnten grundlegende Erkenntnisse zu der Beteiligung der HpgGT an der Immunevasion von *H. pylori* und die strukturellen Unterschiede im katalytischen Zentrum des Enzyms im Vergleich zu den gGTs anderer Spezies gewonnen werden. Hierzu wurden rekombinante  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen aus sechs verschiedenen Spezies hergestellt und enzymatisch charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass diese immunevasive Funktion der HpgGT auch in den eng verwandten Spezies *Helicobacter bilis* und *Campylobacter jejuni* konserviert ist. Die humane gGT inhibiert die Proliferation der T-Zellen jedoch nicht. Neben der Untersuchung des immunevasiven Effekts konnten auch deutliche Unterschiede in der enzymatischen Aktivität bezüglich pH-Optimum und Substratspezifität nachgewiesen werden. Dies unterstreicht die konservierte Rolle der gGT bei *Helicobacter pylori* als essentiellen Virulenzfaktor und deren gegenüber der eukaryotischen gGTs klar abgegrenzten Funktion.

Zur weiteren Charakterisierung des katalytischen Zentrums, der Rolle einzelner Reste in der enzymatischen Aktivität und der Inhibition der T-Zell Proliferation wurden in dieser Arbeit neun rational designte Punktmutanten der HpgGT hergestellt. Die Mutationen der Aminosäuren T380, E419, Y433 und P471 zeigten unterschiedlich starke Effekte auf die gGT-Aktivität bzw. den proliferationshemmenden Effekt. Insbesondere für das Glutamat 419 ein deutlicher Einfluss auf die gGT-Aktivität nachgewiesen werden. Die Analyse des Effekts *In Vivo* ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Durch die enzymatische Aktivität der gGT entsteht ein Produkt, welches direkten Einfluss auf die T-Zell-Proliferation hat. In dieser Arbeit wurden erste Hinweise auf die strukturelle Zusammensetzung des Mediators erlangt. Es wurde gezeigt, dass es sich bei dem immunsuppressiven Enzymprodukt um eine niedermolekulare Substanz mit hoher Stabilität handelt. Durch mehrstufige Chromatographie konnten eine Anreicherung der Substanz und erste Charakterisierungen als Glyko-Peptid erzielt werden. Durch die zukünftige Identifizierung dieses Mediators könnten sich diverse Anwendungsmöglichkeiten ergeben, da es sich um eine neue, mit dem Cortisol vergleichbare Substanz mit immunsuppressiver Wirkung handelt.

Die hier durchgeführten Studien zur enzymatischen Aktivität und zum katalytischen Zentrum dienen als Grundlage für die Identifizierung neuer inhibitorischer Substanzen, die genau auf die *Helicobacter pylori* gGT zugeschnitten sind („tailored drugs“) und so Nebenwirkungen wie auch Resistenzentwicklungen umgehen. So wurden 35 potentielle Substanzen mittels *In Silico* Screening identifiziert und *In Vitro* getestet. Nach Validierung dieser Kandidaten konnte für neun Substanzen ein inhibitorischer Effekt auf die HpgGT nachgewiesen werden. Hierbei wurden irreversibel bindende Inhibitoren mit  $K_i$ -Werten im nM-Bereich (AHPP-Buttersäure mit einem  $K_i = 18$  nM), als auch reversibel bindende Inhibitoren im  $\mu$ M bis mM Bereich identifiziert. Neben der Analyse der Inhibition der HpgGT wurde durch Vergleich mit den in dieser Arbeit gereinigten gGTs anderer Spezies die Spezies-Spezifität dieser Moleküle untersucht. Die dabei gefundenen Unterschiede geben erste Anhaltspunkte auf die unterschiedlichen Bindungsmodi der Inhibitoren und die strukturellen Unterschiede in den Bindetaschen der verschiedenen gGTs. Die hier entstandenen Daten dienen als Grundlage für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren gegen die HpgGT und werden im Rahmen des m<sup>4</sup>-Clusters in Kooperation mit der *Priaxon AG* weitergeführt.

Als weitere Anwendung wurde die rekombinante HpgGT im Rahmen eines GoBio-Projektes in einem Impfstoff verwendet. Die dadurch induzierten, die HpgGT blockierenden Antikörper machen *H. pylori* zugänglich für die Immunabwehr und ermöglichen es dem Immunsystem die Infektion zu beseitigen. Mit diesem Ansatz, welcher nicht Bestandteil dieser Doktorarbeit ist, konnte im Mausmodell ein Impfschutz vermittelt und damit bereits der *Proof of Concept* erbracht werden.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden gemäß der Einbuchstaben- oder Dreibuchstaben-Schreibweise abgekürzt.

Å	Ångström ( $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ )
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
A <sub>x</sub>	Absorption bei einer Wellenlänge x nm
bla	β-Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
cfu	<i>colony forming units</i>
C-terminal	Carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
Da	Dalton [ $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ]
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
E <sub>0</sub>	Enzymkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere (Autoren) ( <i>et alii</i> )

GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
gGT	$\gamma$ -Glutamyltranspeptidase
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IMAC	Metallchelat-Affinitätschromatographie ( <i>Immobilized metal affinity chromatography</i> )
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
K	Kelvin; Gleichgewichtskonstante
Kan	Kanamycin
$k_{\text{cat}}$	Wechselzahl
$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$	katalytischer Effizienzparameter
$K_{\text{D}}$	thermodynamische Dissoziationskonstante
kDa	kiloDalton ( $1 \cdot 10^3 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ )
$K_{\text{M}}$	Michaelis-Konstante, entspricht der Enzymkonzentration, bei der halbmaximale Geschwindigkeit erreicht ist
KP	Kaliumphosphat-Puffer
LB	Luria Bertoni
ln	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
M	Molar (mol/l); Längenstandard (Marker)
MPa	Megapascal ( $1 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ )
$M_{\text{r}}$	Relatives Molekulargewicht des Proteins [Da]
N-terminal	Aminoterminales Ende einer Polypeptidkette

---

OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ori	Replikationsstartpunkt eines Plasmids ( <i>origin of replication</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Datenbank
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	Substrat; Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SOE	<i>overlap extension</i>
T	Temperatur; Thymidin
t <sub>0</sub>	Zeitpunkt t = 0
T <sub>a</sub>	Annealing-Temperatur [°C]
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur [°C]
T <sub>E</sub>	Transformations-Effizienz
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit; eine Unit entspricht der Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen 1 nmol Substrat pro Minute umsetzt.
UE	Untereinheit
Ü.N	über Nacht

V	Volt
$v_i$	Anfangsgeschwindigkeit
$v_{\max}$	maximale Umsatzgeschwindigkeit
Vol	Volumen [l]
w/v	Masse pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
wt / WT	Wildtyp
% GC	relativer molarer GC-Gehalt
$^{0,1\%}A_x$	spezifischer Extinktionskoeffizient bei x nm
$\lambda$	Wellenlänge [nm]
$\epsilon_x$	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge x [ $\frac{1}{M \text{ cm}}$ ]

## 7 Literaturverzeichnis

Ahluwalia, G.S., Grem, J.L., Hao, Z., and Cooney, D.A. (1990). Metabolism and action of amino acid analog anti-cancer agents. *Pharmacol Ther* 46, 243-271.

Ahmed, K.S., Khan, A.A., Ahmed, I., Tiwari, S.K., Habeeb, A., Ahi, J.D., Abid, Z., Ahmed, N., and Habibullah, C.M. (2007). Impact of household hygiene and water source on the prevalence and transmission of *Helicobacter pylori*: a South Indian perspective. *Singapore Med J* 48, 543-549.

Akopyants, N.S., Clifton, S.W., Kersulyte, D., Crabtree, J.E., Youree, B.E., Reece, C.A., Bukanov, N.O., Drazek, E.S., Roe, B.A., and Berg, D.E. (1998). Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Molecular microbiology* 28, 37-53.

Alkhuder, K., Meibom, K.L., Dubail, I., Dupuis, M., and Charbit, A. (2009). Glutathione provides a source of cysteine essential for intracellular multiplication of *Francisella tularensis*. *PLoS pathogens* 5, e1000284.

Allen, S., Shea, J.M., Felmet, T., Gadra, J., and Dehn, P.F. (2000). A kinetic microassay for glutathione in cells plated on 96-well microtiter plates. *Methods Cell Sci* 22, 305-312.

Allison, C.C., Kufer, T.A., Kremmer, E., Kaparakis, M., and Ferrero, R.L. (2009). *Helicobacter pylori* induces MAPK phosphorylation and AP-1 activation via a NOD1-dependent mechanism. *J Immunol* 183, 8099-8109.

Atherton, J.C. (1998). *H. pylori* virulence factors. *Br Med Bull* 54, 105-120.

Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., Jr., Tummuru, M.K., Blaser, M.J., and Cover, T.L. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *The Journal of biological chemistry* 270, 17771-17777.

Atherton, J.C., Peek, R.M., Jr., Tham, K.T., Cover, T.L., and Blaser, M.J. (1997). Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 112, 92-99.

- Barnes, I.H., Bagnall, M.C., Browning, D.D., Thompson, S.A., Manning, G., and Newell, D.G. (2007). Gamma-glutamyl transpeptidase has a role in the persistent colonization of the avian gut by *Campylobacter jejuni*. *Microbial pathogenesis* 43, 198-207.
- Basso, D., Zambon, C.F., Letley, D.P., Stranges, A., Marchet, A., Rhead, J.L., Schiavon, S., Guariso, G., Ceroti, M., Nitti, D., *et al.* (2008). Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology* 135, 91-99.
- Blaser, M.J. (1998). *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *Bmj* 316, 1507-1510.
- Blaser, M.J., and Berg, D.E. (2001). *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 107, 767-773.
- Boanca, G., Sand, A., and Barycki, J.J. (2006). Uncoupling the enzymatic and autoprocessing activities of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase. *The Journal of biological chemistry* 281, 19029-19037.
- Boanca, G., Sand, A., Okada, T., Suzuki, H., Kumagai, H., Fukuyama, K., and Barycki, J.J. (2007). Autoprocessing of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase leads to the formation of a threonine-threonine catalytic dyad. *J Biol Chem* 282, 534-541.
- Boren, T., Falk, P., Roth, K.A., Larson, G., and Normark, S. (1993). Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 262, 1892-1895.
- 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, 248-254.
- Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R., and Murzin, A.G. (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 378, 416-419.
- Brown, L.M. (2000). *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* 22, 283-297.
- Busiello, I., Acquaviva, R., Di Popolo, A., Blanchard, T.G., Ricci, V., Romano, M., and Zarrilli, R. (2004). *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase upregulates COX-2 and EGF-related peptide expression in human gastric cells. *Cell Microbiol* 6, 255-267.

- Carr, E.L., Kelman, A., Wu, G.S., Gopaul, R., Senkevitch, E., Aghvanyan, A., Turay, A.M., and Frauwirth, K.A. (2010). Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J Immunol* 185, 1037-1044.
- Castonguay, R., Halim, D., Morin, M., Furtos, A., Lherbet, C., Bonneil, E., Thibault, P., and Keillor, J.W. (2007). Kinetic characterization and identification of the acylation and glycosylation sites of recombinant human gamma-glutamyltranspeptidase. *Biochemistry* 46, 12253-12262.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., and Covacci, A. (1996). *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14648-14653.
- Censini, S., Stein, M., and Covacci, A. (2001). Cellular responses induced after contact with *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Microbiol* 4, 41-46.
- Cheng, Y., and Prusoff, W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant ( $K_I$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22, 3099-3108.
- Cover, T.L., and Blaser, M.J. (1992). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *The Journal of biological chemistry* 267, 10570-10575.
- Cover, T.L., Hanson, P.I., and Heuser, J.E. (1997). Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol* 138, 759-769.
- De Francesco, V., Zullo, A., Perna, F., Giorgio, F., Hassan, C., Vannella, L., Cristofari, F., Panella, C., Vaira, D., and Ierardi, E. (2010). *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and [13C]urea breath test values. *Journal of medical microbiology* 59, 588-591.
- Deltenre, M.A. (2012). Economics of *Helicobacter pylori* eradication therapy. *European journal of gastroenterology & hepatology* 9 Suppl 1, S23-26.
- Dunn, B.E., Cohen, H., and Blaser, M.J. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clinical microbiology reviews* 10, 720-741.

El-Omar, E.M., Carrington, M., Chow, W.H., McColl, K.E., Bream, J.H., Young, H.A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C.C., Rothman, N., *et al.* (2000). Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404, 398-402.

El-Omar, E.M., Ng, M.T., and Hold, G.L. (2008). Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene* 27, 244-252.

El-Omar, E.M., Rabkin, C.S., Gammon, M.D., Vaughan, T.L., Risch, H.A., Schoenberg, J.B., Stanford, J.L., Mayne, S.T., Goedert, J., Blot, W.J., *et al.* (2003). Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 124, 1193-1201.

Erreger, K., Geballe, M.T., Dravid, S.M., Snyder, J.P., Wyllie, D.J., and Traynelis, S.F. (2005). Mechanism of partial agonism at NMDA receptors for a conformationally restricted glutamate analog. *J Neurosci* 25, 7858-7866.

Escobar, M.L., and Kawakami, E. (2004). Evidence of mother-child transmission of *Helicobacter pylori* infection. *Arq Gastroenterol* 41, 239-244.

Fattorusso, R., Jung, D., Crowell, K.J., Forino, M., and Pellecchia, M. (2005). Discovery of a novel class of reversible non-peptide caspase inhibitors via a structure-based approach. *J Med Chem* 48, 1649-1656.

Forino, M., Jung, D., Easton, J.B., Houghton, P.J., and Pellecchia, M. (2005). Virtual docking approaches to protein kinase B inhibition. *J Med Chem* 48, 2278-2281.

Fox, J.G. (2002). The non-H pylori helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut* 50, 273-283.

Franchi, L., Warner, N., Viani, K., and Nunez, G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 227, 106-128.

Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., and Haas, R. (2003). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 301, 1099-1102.

Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Boren, T., Rad, R., Schepp, W., Miehle, S., Classen, M., and Prinz, C. (1999). Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12778-12783.

- Gobert, A.P., McGee, D.J., Akhtar, M., Mendz, G.L., Newton, J.C., Cheng, Y., Mobley, H.L., and Wilson, K.T. (2001). Helicobacter pylori arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13844-13849.
- Gong, M., Ling, S.S., Lui, S.Y., Yeoh, K.G., and Ho, B. (2010). Helicobacter pylori gamma-glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the development of peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 139, 564-573.
- Goodwin, C.S., McConnell, W., McCulloch, R.K., McCullough, C., Hill, R., Bronsdon, M.A., and Kasper, G. (1989). Cellular fatty acid composition of Campylobacter pylori from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. *J Clin Microbiol* 27, 938-943.
- Goodwin, S., Blincow, E., Armstrong, J., McCulloch, R., and Collins, D. (1985). Campylobacter pyloridis is unique: GCLO-2 is an ordinary campylobacter. *Lancet* 2, 38-39.
- Graham, D.Y., Opekun, A.R., Osato, M.S., El-Zimaity, H.M., Lee, C.K., Yamaoka, Y., Qureshi, W.A., Cadoz, M., and Monath, T.P. (2004). Challenge model for Helicobacter pylori infection in human volunteers. *Gut* 53, 1235-1243.
- Gu, Z., Weidenhaupt, M., Ivanova, N., Pavlov, M., Xu, B., Su, Z.G., and Janson, J.C. (2002). Chromatographic methods for the isolation of, and refolding of proteins from, Escherichia coli inclusion bodies. *Protein expression and purification* 25, 174-179.
- Han, L., Hiratake, J., Kamiyama, A., and Sakata, K. (2007). Design, synthesis, and evaluation of gamma-phosphono diester analogues of glutamate as highly potent inhibitors and active site probes of gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 46, 1432-1447.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology* 166, 557-580.
- Hofreuter, D., Novik, V., and Galan, J.E. (2008). Metabolic diversity in Campylobacter jejuni enhances specific tissue colonization. *Cell host & microbe* 4, 425-433.
- Hu, X., Legler, P.M., Khavrutskii, I., Scorpio, A., Compton, J.R., Robertson, K.L., Friedlander, A.M., and Wallqvist, A. (2012). Probing the donor and acceptor substrate specificity of the gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 51, 1199-1212.

- Hulten, K., Han, S.W., Enroth, H., Klein, P.D., Opekun, A.R., Gilman, R.H., Evans, D.G., Engstrand, L., Graham, D.Y., and El-Zaatari, F.A. (1996). Helicobacter pylori in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 110, 1031-1035.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L., and Boren, T. (1998). Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279, 373-377.
- Jacobs, P.P., Ryckaert, S., Geysens, S., De Vusser, K., Callewaert, N., and Contreras, R. (2008). Pichia surface display: display of proteins on the surface of glycoengineered Pichia pastoris strains. *Biotechnol Lett* 30, 2173-2181.
- Jonsson, K., Guo, B.P., Monstein, H.J., Mekalanos, J.J., and Kronvall, G. (2004). Molecular cloning and characterization of two Helicobacter pylori genes coding for plasminogen-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1852-1857.
- Keillor, J.W., Castonguay, R., and Lherbet, C. (2005). Gamma-glutamyl transpeptidase substrate specificity and catalytic mechanism. *Methods Enzymol* 401, 449-467.
- Khamri, W., Moran, A.P., Worku, M.L., Karim, Q.N., Walker, M.M., Annuk, H., Ferris, J.A., Appelmelk, B.J., Eggleton, P., Reid, K.B., *et al.* (2005). Variations in Helicobacter pylori lipopolysaccharide to evade the innate immune component surfactant protein D. *Infection and immunity* 73, 7677-7686.
- Kim, K.M., Lee, S.G., Kim, J.M., Kim, D.S., Song, J.Y., Kang, H.L., Lee, W.K., Cho, M.J., Rhee, K.H., Youn, H.S., *et al.* (2010). Helicobacter pylori gamma-glutamyltranspeptidase induces cell cycle arrest at the G1-S phase transition. *J Microbiol* 48, 372-377.
- King, J.B., West, M.B., Cook, P.F., and Hanigan, M.H. (2009). A novel, species-specific class of uncompetitive inhibitors of gamma-glutamyl transpeptidase. *The Journal of biological chemistry* 284, 9059-9065.
- Kleywegt, G.J., and Jones, T.A. (2002). Homo crystallographicus--quo vadis? *Structure* 10, 465-472.
- Knipp, U., Birkholz, S., Kaup, W., and Opferkuch, W. (1993). Immune suppressive effects of Helicobacter pylori on human peripheral blood mononuclear cells. *Med Microbiol Immunol* 182, 63-76.

- Knowles, B.B., Howe, C.C., and Aden, D.P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497-499.
- Kuipers, E.J. (1999). Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 13 *Suppl 1*, 3-11.
- Kuipers, E.J., Thijs, J.C., and Festen, H.P. (1995). The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther* 9 *Suppl 2*, 59-69.
- Kusters, J.G., van Vliet, A.H., and Kuipers, E.J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical microbiology reviews* 19, 449-490.
- Larsson, P., Oyston, P.C., Chain, P., Chu, M.C., Duffield, M., Fuxelius, H.H., Garcia, E., Halltorp, G., Johansson, D., Isherwood, K.E., *et al.* (2005). The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nature genetics* 37, 153-159.
- Lau, P.P., DeBrunner-Vossbrinck, B., Dunn, B., Miotto, K., MacDonnell, M.T., Rollins, D.M., Pillidge, C.J., Hespell, R.B., Colwell, R.R., Sogin, M.L., *et al.* (1987). Phylogenetic diversity and position of the genus *Campylobacter*. *Syst Appl Microbiol* 9, 231-238.
- Leduc, D., Gallaud, J., Stingl, K., and de Reuse, H. (2010). Coupled amino acid deamidase-transport systems essential for *Helicobacter pylori* colonization. *Infect Immun* 78, 2782-2792.
- Lenferink, A.E., Busse, D., Flanagan, W.M., Yakes, F.M., and Arteaga, C.L. (2001). ErbB2/neu kinase modulates cellular p27(Kip1) and cyclin D1 through multiple signaling pathways. *Cancer Res* 61, 6583-6591.
- Lherbet, C., and Keillor, J.W. (2004). Probing the stereochemistry of the active site of gamma-glutamyl transpeptidase using sulfur derivatives of l-glutamic acid. *Org Biomol Chem* 2, 238-245.
- Mahdavi, J., Sonden, B., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N., Angstrom, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.A., *et al.* (2002). *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 297, 573-578.
- Malaty, H.M. (2007). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 21, 205-214.

- Malaty, H.M., Engstrand, L., Pedersen, N.L., and Graham, D.Y. (1994). *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann Intern Med* 120, 982-986.
- Malaty, H.M., Evans, D.G., Evans, D.J., Jr., and Graham, D.Y. (1992). *Helicobacter pylori* in Hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. *Gastroenterology* 103, 813-816.
- Marshall, B.J., and Warren, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1, 1311-1315.
- Martin, M.N., Saladores, P.H., Lambert, E., Hudson, A.O., and Leustek, T. (2007). Localization of members of the gamma-glutamyl transpeptidase family identifies sites of glutathione and glutathione S-conjugate hydrolysis. *Plant Physiol* 144, 1715-1732.
- McGovern, K.J., Blanchard, T.G., Gutierrez, J.A., Czinn, S.J., Krakowka, S., and Youngman, P. (2001). gamma-Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* virulence factor but is not essential for colonization. *Infect Immun* 69, 4168-4173.
- Meister, A., Tate, S.S., and Griffith, O.W. (1981). Gamma-glutamyl transpeptidase. *Methods Enzymol* 77, 237-253.
- Miehlke, S., Kirsch, C., Agha-Amiri, K., Gunther, T., Lehn, N., Malfertheiner, P., Stolte, M., Ehninger, G., and Bayerdorffer, E. (2000). The *Helicobacter pylori* vacA s1, ml genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer* 87, 322-327.
- Mitchell, H.M. (1999). The epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiol Immunol* 241, 11-30.
- Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A., and Montecucco, C. (1998). Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med* 187, 135-140.
- Murray, L.J., McCrum, E.E., Evans, A.E., and Bamford, K.B. (1997). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection among 4742 randomly selected subjects from Northern Ireland. *Int J Epidemiol* 26, 880-887.

Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20, 87-90.

Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer research* 42, 3858-3863.

Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., *et al.* (2008). Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1003-1008.

Owen, R.J. (1998). *Helicobacter*--species classification and identification. *Br Med Bull* 54, 17-30.

Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4, 2411-2423.

Papini, E., Satin, B., Norais, N., de Bernard, M., Telford, J.L., Rappuoli, R., and Montecucco, C. (1998). Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Clin Invest* 102, 813-820.

Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelstein, J.H., and Friedman, G.D. (1994). *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 330, 1267-1271.

Peek, R.M., Jr., and Blaser, M.J. (2002). *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2, 28-37.

Perez-Perez, Guillermo I., and Portal-Celhay, C. (2006). Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clinical Science* 110, 305.

Pompella, A., De Tata, V., Paolicchi, A., and Zunino, F. (2006). Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem Pharmacol* 71, 231-238.

Rad, R., Dossumbekova, A., Neu, B., Lang, R., Bauer, S., Saur, D., Gerhard, M., and Prinz, C. (2004). Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric

inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 53, 1082-1089.

Raff, M.C., Feldmann, M., and De Petris, S. (1973). Monospecificity of bone marrow-derived lymphocytes. *J Exp Med* 137, 1024-1030.

Raghavan, S., and Holmgren, J. (2005). CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44, 121-127.

Rickes, S., Schultze, U., Monkemuller, K., and Malfertheiner, P. (2006). [Walter Krienitz--his life and intuitive description of bacteria in the stomach]. *Dtsch Med Wochenschr* 131, 1341-1343.

Rossi, M., Bolz, C., Revez, J., Javed, S., El-Najjar, N., Anderl, F., Hyytiainen, H., Vuorela, P., Gerhard, M., and Hanninen, M.L. (2012). Evidence for conserved function of gamma-glutamyltranspeptidase in *Helicobacter* genus. *PLoS One* 7, e30543.

Sandberg, E.M., Ma, X., He, K., Frank, S.J., Ostrov, D.A., and Sayeski, P.P. (2005). Identification of 1,2,3,4,5,6-hexabromocyclohexane as a small molecule inhibitor of jak2 tyrosine kinase autophosphorylation [correction of autophosphorylation]. *J Med Chem* 48, 2526-2533.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.

Santic, M., Al-Khodor, S., and Abu Kwaik, Y. (2010). Cell biology and molecular ecology of *Francisella tularensis*. *Cellular microbiology* 12, 129-139.

Sayi, A., Kohler, E., Toller, I.M., Flavell, R.A., Muller, W., Roers, A., and Muller, A. (2011). TLR-2-activated B cells suppress *Helicobacter*-induced preneoplastic gastric immunopathology by inducing T regulatory-1 cells. *J Immunol* 186, 878-890.

Schlehuber, S., and Skerra, A. (2001). Duocalins: engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. *Biol Chem* 382, 1335-1342.

Schmees, C., Prinz, C., Treptau, T., Rad, R., Hengst, L., Voland, P., Bauer, S., Brenner, L., Schmid, R.M., and Gerhard, M. (2007). Inhibition of T-Cell Proliferation by *Helicobacter pylori*  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase. *Gastroenterology* 132, 1820-1833.

- Schmidt, T.G., and Skerra, A. (1993). The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng* 6, 109-122.
- Schneider, U., Schwenk, H.U., and Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19, 621-626.
- Segal, E.D., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1996). *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1259-1264.
- Sharma, S.A., Tummuru, M.K., Blaser, M.J., and Kerr, L.D. (1998). Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J Immunol* 160, 2401-2407.
- Shibayama, K., Kamachi, K., Nagata, N., Yagi, T., Nada, T., Doi, Y., Shibata, N., Yokoyama, K., Yamane, K., Kato, H., *et al.* (2003). A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*. *Molecular microbiology* 47, 443-451.
- Shibayama, K., Wachino, J., Arakawa, Y., Saidijam, M., Rutherford, N.G., and Henderson, P.J. (2007). Metabolism of glutamine and glutathione via gamma-glutamyltranspeptidase and glutamate transport in *Helicobacter pylori*: possible significance in the pathophysiology of the organism. *Mol Microbiol* 64, 396-406.
- Siggins, G.R., Martin, G., Roberto, M., Nie, Z., Madamba, S., and De Lecea, L. (2003). Glutamatergic transmission in opiate and alcohol dependence. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1003, 196-211.
- Skerra, A. (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151, 131-135.
- Skerra, A., Pfitzinger, I., and Pluckthun, A. (1991). The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Biotechnology (N Y)* 9, 273-278.
- Skerra, A., and Schmidt, T.G. (2000). Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol* 326, 271-304.

- Solnick, J.V., and Schauer, D.B. (2001). Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clinical microbiology reviews* 14, 59-97.
- Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W.J., and Covacci, A. (2002). c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Molecular microbiology* 43, 971-980.
- Stein, R.L., DeCicco, C., Nelson, D., and Thomas, B. (2001). Slow-binding inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase by gamma-boroGlu. *Biochemistry* 40, 5804-5811.
- Stole, E., Smith, T.K., Manning, J.M., and Meister, A. (1994). Interaction of gamma-glutamyl transpeptidase with acivicin. *The Journal of biological chemistry* 269, 21435-21439.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* 189, 113-130.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185, 60-89.
- Su, B., Ceponis, P.J., Lebel, S., Huynh, H., and Sherman, P.M. (2003). *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infection and immunity* 71, 3496-3502.
- Suerbaum, S., and Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 347, 1175-1186.
- Suzuki, H., Kumagai, H., and Tochikura, T. (1986). gamma-Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12: purification and properties. *J Bacteriol* 168, 1325-1331.
- Szymczak, A.L., Workman, C.J., Wang, Y., Vignali, K.M., Dilioglou, S., Vanin, E.F., and Vignali, D.A. (2004). Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* 22, 589-594.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731-2739.

Taniguchi, Y., Kimura, K., Satoh, K., Yoshida, Y., Kihira, K., Takimoto, T., Saifuku, K., Ido, K., Ookawara, S., and Mato, M. (1995). Helicobacter pylori detected deep in gastric glands: an ultrastructural quantitative study. *J Clin Gastroenterol 21 Suppl 1*, S169-173.

Tate, S.S., and Meister, A. (1977). Affinity labeling of gamma-glutamyl transpeptidase and location of the gamma-glutamyl binding site on the light subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A 74*, 931-935.

Togawa, S., Joh, T., Itoh, M., Katsuda, N., Ito, H., Matsuo, K., Tajima, K., and Hamajima, N. (2005). Interleukin-2 gene polymorphisms associated with increased risk of gastric atrophy from Helicobacter pylori infection. *Helicobacter 10*, 172-178.

Treiber, G., and Lambert, J.R. (1998). The impact of Helicobacter pylori eradication on peptic ulcer healing. *Am J Gastroenterol 93*, 1080-1084.

Tummala, S., Keates, S., and Kelly, C.P. (2004). Update on the immunologic basis of Helicobacter pylori gastritis. *Curr Opin Gastroenterol 20*, 592-597.

Tummuru, M.K., Cover, T.L., and Blaser, M.J. (1993). Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of Helicobacter pylori: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infection and immunity 61*, 1799-1809.

Van Zanten, S.J., Dixon, M.F., and Lee, A. (1999). The gastric transitional zones: neglected links between gastroduodenal pathology and helicobacter ecology. *Gastroenterology 116*, 1217-1229.

Varoli, O., Landini, M.P., LaPlaca, M., Tucci, A., Corinaldesi, R., Paparo, G.F., Stanghellini, V., and Barbara, L. (1991). Presence of Helicobacter pylori in gastric juice. *Am J Gastroenterol 86*, 249.

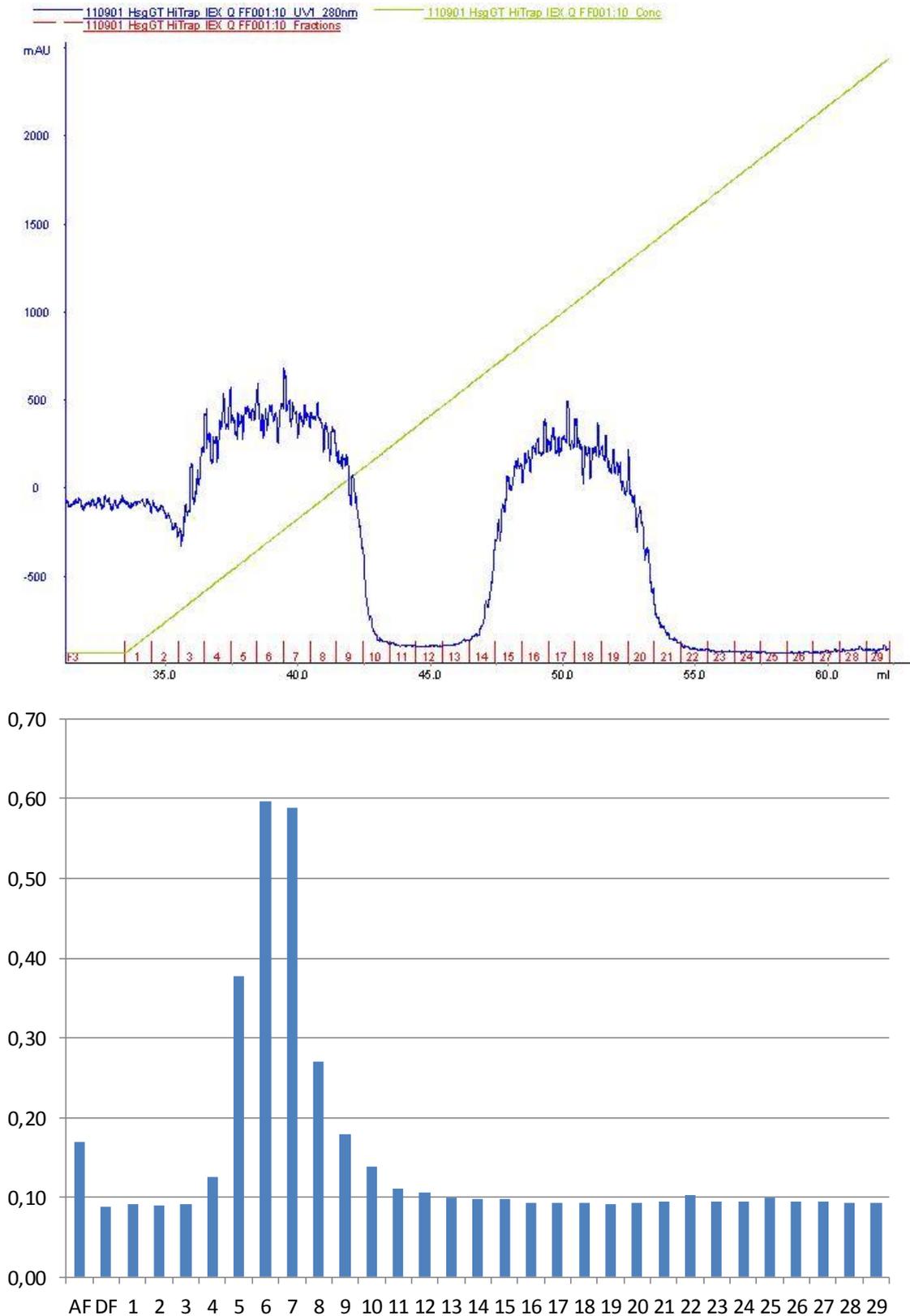
Viala, J., Chaput, C., Boneca, I.G., Cardona, A., Girardin, S.E., Moran, A.P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M.R., Coyle, A.J., *et al.* (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. *Nature immunology 5*, 1166-1174.

Wachino, J., Shibayama, K., Suzuki, S., Yamane, K., Mori, S., and Arakawa, Y. (2010). Profile of Expression of Helicobacter pylori gamma-glutamyltranspeptidase. *Helicobacter 15*, 184-192.

- Wada, K., Hiratake, J., Irie, M., Okada, T., Yamada, C., Kumagai, H., Suzuki, H., and Fukuyama, K. (2008). Crystal Structures of Escherichia coli  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase in Complex with Azaserine and Acivicin: Novel Mechanistic Implication for Inhibition by Glutamine Antagonists. *Journal of Molecular Biology* 380, 361-372.
- Wang, J., Brooks, E.G., Bamford, K.B., Denning, T.L., Pappo, J., and Ernst, P.B. (2001). Negative selection of T cells by Helicobacter pylori as a model for bacterial strain selection by immune evasion. *J Immunol* 167, 926-934.
- Wang, J.T., Sheu, J.C., Lin, J.T., Wang, T.H., and Wu, M.S. (1993). Direct DNA amplification and restriction pattern analysis of Helicobacter pylori in patients with duodenal ulcer and their families. *J Infect Dis* 168, 1544-1548.
- Weber, G., and Prajda, N. (1994). Targeted and non-targeted actions of anti-cancer drugs. *Adv Enzyme Regul* 34, 71-89.
- West, M.B., Wickham, S., Quinalty, L.M., Pavlovicz, R.E., Li, C., and Hanigan, M.H. (2011). Autocatalytic cleavage of human gamma-glutamyl transpeptidase is highly dependent on N-glycosylation at asparagine 95. *The Journal of biological chemistry* 286, 28876-28888.
- Wickham, S., West, M.B., Cook, P.F., and Hanigan, M.H. (2011). Gamma-glutamyl compounds: substrate specificity of gamma-glutamyl transpeptidase enzymes. *Anal Biochem* 414, 208-214.
- Williams, K., Cullati, S., Sand, A., Biterova, E.I., and Barycki, J.J. (2009). Crystal structure of acivicin-inhibited gamma-glutamyltranspeptidase reveals critical roles for its C-terminus in autoprocessing and catalysis. *Biochemistry* 48, 2459-2467.
- Wunder, C., Churin, Y., Winau, F., Warnecke, D., Vieth, M., Lindner, B., Zähringer, U., Mollenkopf, H.-J., Heinz, E., and Meyer, T.F. (2006). Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by Helicobacter pylori. *Nature Medicine* 12, 1030-1038.
- Yokota, K., Kurebayashi, Y., Takayama, Y., Hayashi, S., Isogai, H., Isogai, E., Imai, K., Yabana, T., Yachi, A., and Oguma, K. (1991). Colonization of Helicobacter pylori in the gastric mucosa of Mongolian gerbils. *Microbiol Immunol* 35, 475-480.



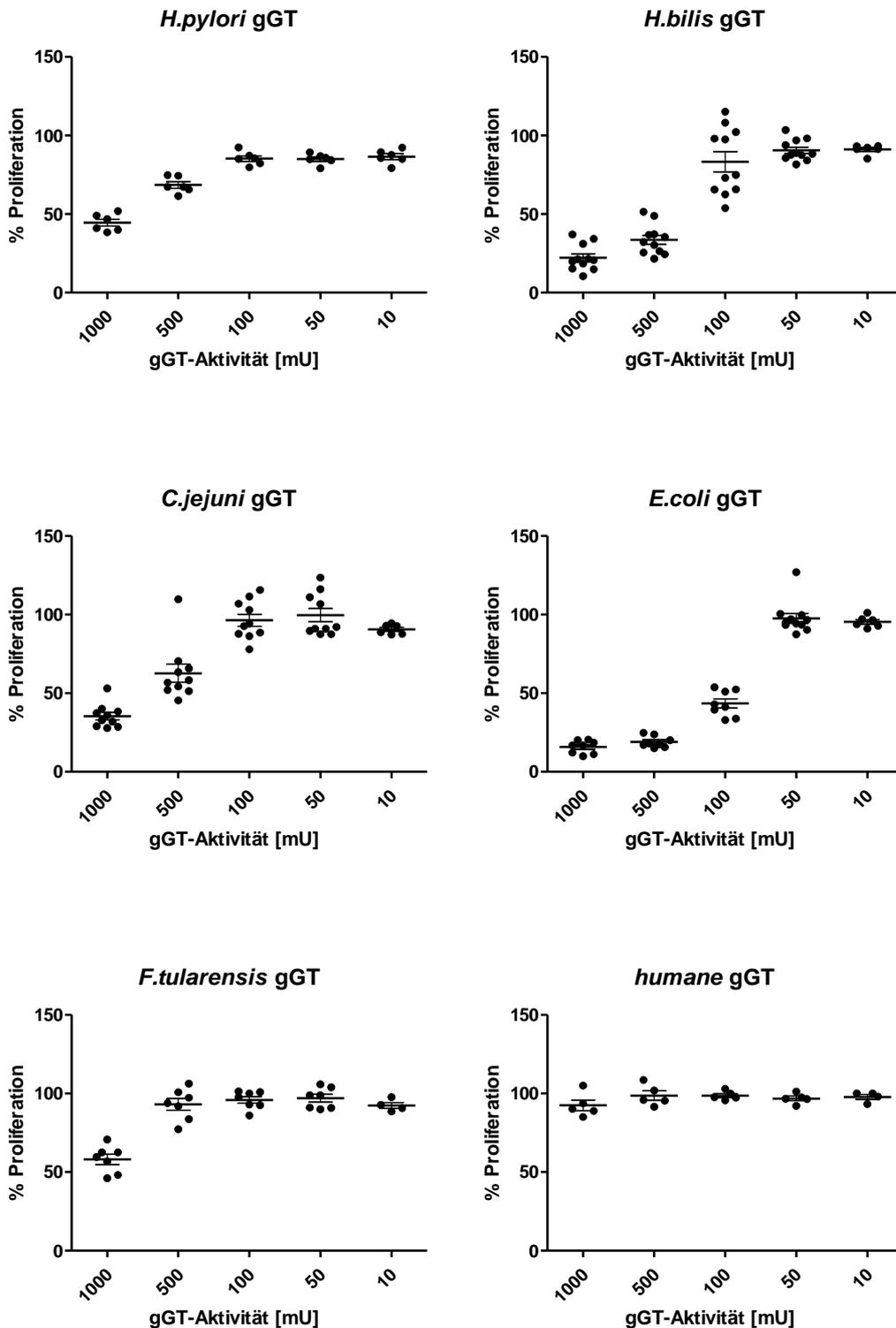
## A) Reinigungsprofil der HsgGT und gGT-Aktivität der AEX-Fractionen



**Abbildung 42:** (oben) Reinigungsprofil der Anionenaustausch-Chromatographie von nativer HsgGT in 100 mM Tris/HCl pH 8,5, 2 % Natrium-Deoxycholat, 20 % PEG 6000. (unten) Testung der gGT-Aktivität der

Elutions-Fractionen der AEX im gGpNA-Assay, wobei direkt 20  $\mu$ l der Fractionen eingesetzt und über dreißig Minuten bei 37°C gemessen wurde.

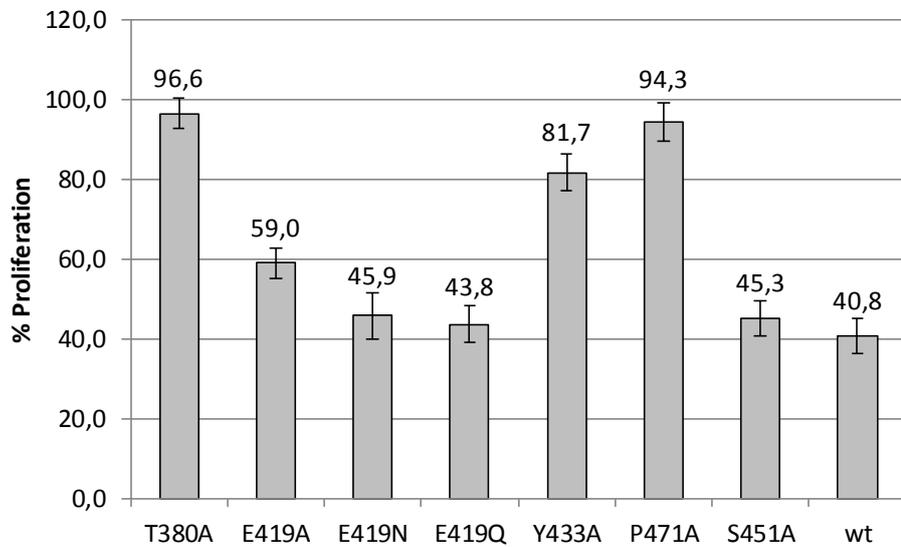
B) Vergleich des gGT-Effekts auf die Proliferation mit normierter gGT-Aktivität



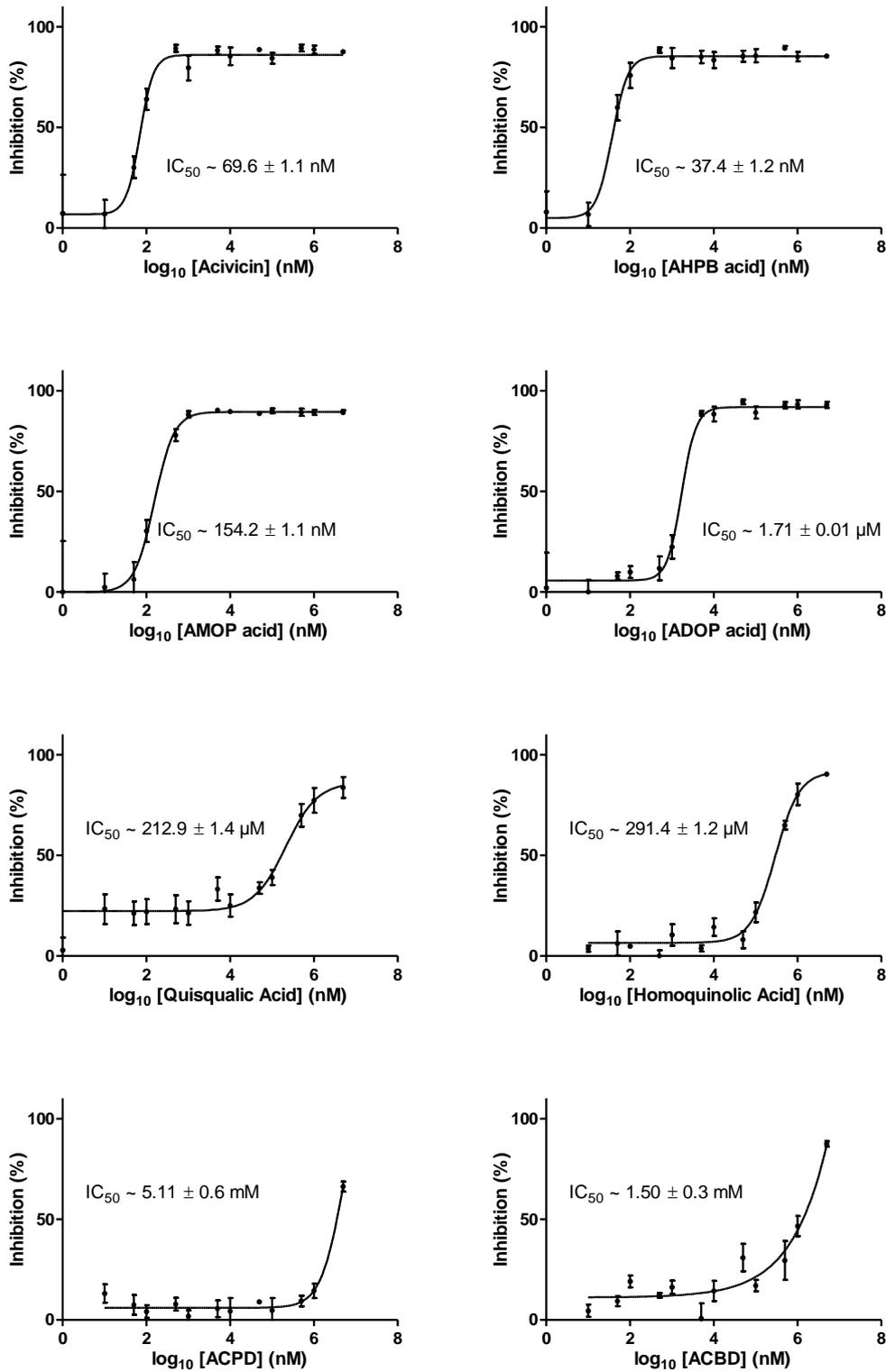
**Abbildung 43:** T-Zell-Proliferation-Experimente zur Untersuchung des Effekts der gGTs aus verschiedenen Spezies (A: HpgGT, B: HbgGT, C: CjgGT, D: EcgGT und E: FtgGT). Die eingesetzte Menge der gGTs wurde auf die enzymatische Aktivität der Proteine in mU normiert. Es wurden jeweils  $5 \times 10^3$  Jurkat-Zellen mit den

entsprechenden Mengen an gGT über 48 Stunden in Zellkulturmedium (RPMI1640, 10 % FCS, P/S) im 96-Well-Format im Brutschrank inkubiert und mittels CellTiter-Glo®-Assay analysiert. Die Darstellung der Messwerte wurde mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt.

C) Proliferationsdaten der HpgGT-Mutanten:



**Abbildung 44:** Untersuchung des Effekts der HpgGT Mutanten auf die T-Zell-Proliferation. Es wurden jeweils  $5 \times 10^3$  Jurkat-Zellen mit 500 ng gGT über 48 Stunden in Zellkulturmedium (RPMI1640, 10 % FCS, P/S) im 96-Well-Format im Brutschrank inkubiert und mittels CellTiter-Glo®-Assay analysiert.

D) Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte der Inhibitorkandidaten

**Abbildung 45:** Inaktivierung der HpgGT durch Inhibitorkandidaten. Inkubation von 25 ng/200 μl HpgGT mit variablen Konzentrationen der Inhibitoren und Bestimmung der gGT-Aktivität. Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde mittels Prism (Graph Pad Software) durchgeführt. Daten repräsentieren vier oder mehr Bestimmungen