

***lin*-Benzopurines as Inhibitors of tRNA-Guanine
Transglycosylase: Perturbance of Homodimer Formation,
Import of Water Clusters and Determinants of
Crystallographical Disorder**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie

der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

vorgelegt von

Florian Peter Philip Immekus

aus Lüdenscheid

Marburg/Lahn 2012

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am: 29.01.2013

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe

Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Reuter

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Juli 2009 bis November 2012 durchgeführt.

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 1 \cdot 10^{-10} \text{ m}$)
A ₆₀₀	Absorption bei 600 nm
C	Celsius
CMC	critical micelle concentration
CSD	Cambridge Structural Database
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid (Me ₂ SO)
<i>d</i>	Distanz
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ECY2	unmodifizierte <i>Escherichia coli</i> tRNA ^{Tyr}
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
ESI	electron spray ionization
Et	Ethyl-
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kcal	Kilokalorien
K	Kelvin
kb	Kilobasen
<i>K_d</i>	Dissoziationskonstante
<i>K_i</i>	kompetitive Inhibitionskonstante
K _m	Michaelis-Konstante
L	Liter

LB	Luria-Bertani (Nährmedium)
M	Molarität ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
Me	Methyl-
min	Minute
m	mili-
(m/v)	Masse pro Volumen
μ	mikro-
n	nano-
p	piko-
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAMPA	parallel artificial membrane permeability assay
PDB	protein data bank
PDB ID	protein data bank identifier
PEG	Polyethylenglykol
pK_a	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K_a
PPI	Protein-Protein Interaktion
<i>S.</i>	<i>Shigella</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek/s	Sekunde
TCA	Trichloressigsäure
TGT	tRNA-Guanin Transglycosylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen
<i>Z.</i>	<i>Zymomonas</i>
°	Grad

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Inhaltsverzeichnis	9
1 Einleitung und Problemstellung	13
1.1 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign und tRNA-Guanin Transglycosylase	13
1.2 Zielsetzung dieser Arbeit.....	15
1.3 Bakterienruhr.....	16
1.4 Klassifikation von <i>Shigella</i> und Verwandtschaft zu <i>Escherichia</i>	17
1.5 Zelluläre und molekulare Pathogenese der Shigellose.....	18
1.6 Bedeutung von VirF und TGT für die Virulenz von Shigella.....	20
1.7 Biosynthese von Queuosin als tRNA-Modifikation bei Prokaryoten.....	21
1.8 Mechanismus der TGT katalysierten Basenaustauschreaktion.....	23
1.9 Strukturelle Merkmale der <i>Z. mobilis</i> TGT.....	25
1.9.1 Sekundärstruktur.....	25
1.9.2 Quartärstruktur.....	25
1.9.3 Aktives Zentrum.....	27
2 Launching spiking ligands into a protein-protein interface: A promising strategy to destabilize and break interface formation in a tRNA modifying enzyme	28
2.1 Introductory Remarks.....	28
2.2 Abstract.....	28
2.3 Introduction.....	29
2.4 Results.....	33
2.4.1 Architecture of the Dimer Interface.....	33
2.4.2 Design of interface-spiking ligands.....	36
2.4.3 Evaluation of Binding Data.....	38
2.4.4 Structural characterization.....	38
2.4.5 Mass spectrometry.....	48
2.4.6 Modeling and MD-simulation.....	49

2.5	Discussion	52
2.6	Conclusion and Outlook	56
2.7	Experimental procedures	58
3	From <i>lin</i>-Benzoguanines to <i>lin</i>-Benzohypoxanthines as Ligands for <i>Z. mobilis</i> TGT: Replacement of Protein-Ligand Hydrogen Bonding by Import of Water Clusters	61
3.1	Introductory Remarks	61
3.2	Abstract	61
3.3	Introduction	62
3.4	Results and Discussion	63
3.4.1	Ligand design	63
3.4.2	Biological activity	64
3.4.3	Physicochemical properties	64
3.4.4	X-Ray cocrystal structures of <i>lin</i> -benzohypoxanthines	66
3.4.5	X-Ray cocrystal structures of N-alkylated <i>lin</i> -benzoguanines	71
3.4.6	Origin of differences in biological activity between <i>lin</i> -benzoguanines, their N-monoalkylated derivatives, and <i>lin</i> -benzohypoxanthines	75
3.5	Conclusion	76
3.6	Experimental section	78
4	Disubstituierte <i>lin</i>-Benzopurine als Inhibitoren der TGT	80
4.1	Einleitung	80
4.2	Resultate	81
4.2.1	Affinitätsdaten	81
4.2.2	Kristallstrukturen	83
4.3	Diskussion	92
4.4	Zusammenfassung	101
5	Kristallographische Untersuchungen einer TGT(Asp102Asn)-Variante	104
5.1	Einleitung	104
5.2	Kristallstrukturanalyse und Diskussion	106
5.3	Zusammenfassung und Ausblick	109

6.	Affinitätsbestimmung von tRNA^{Tyr} gegenüber <i>Z. mobilis</i> TGT	110
7	Conclusion and Outlook	112
8	Zusammenfassung und Ausblick	117
9	Material und Methoden	123
9.1	Chemikalien	123
9.2	Geräte	124
9.3	Lösungen und Puffer	125
9.4	Bakterienstämme und Plasmide	126
9.5	Molekularbiologische Methoden	126
9.5.1	Mutation des TGT Wildtyp	126
9.5.2	Transformation von Plasmiden	126
9.5.3	Überexpression und Aufreinigung	127
9.5.4	In-vitro Transkription und Aufreinigung von tRNA	128
9.6	Konzentrationsbestimmung von Protein, DNA und tRNA	128
9.7	Enzymkinetische Untersuchungen	129
9.8	Thermophoresemessungen	130
9.9	Röntgenstrukturanalyse	132
9.9.1	<i>Z. mobilis</i> TGT Kristallisation	132
9.9.2	Datensammlung	133
9.9.3	Strukturbestimmung und Verfeinerung	134
10	Appendix	135
10.1	Sequenzierung des TGT(Asp102Asn)-Plasmids	135
10.2	Bestimmung von Dissoziationskonstanten durch Thermophorese	135
10.3	Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken	140
11	Literatur	145
	Danksagung	153
	Erklärung	155
	Curriculum Vitae	157



1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign und tRNA-Guanin Transglycosylase

Die Behandlung von Krankheiten und die Entwicklung von Heilmitteln beschäftigt die Menschheit seit Jahrtausenden. Auch wenn sich die Zielsetzung im Kern nicht verändert hat, brachte die Geschichte doch sehr unterschiedliche Herangehensweisen an die Arzneistoff-Findung hervor. Ausgehend von traditionell-empirischer Volksmedizin, die in erster Linie auf Pflanzenextrakten und getrockneten Drogen basierte, führte das fortschreitende chemische Verständnis des 19. Jahrhunderts zu ersten aus Pflanzen isolierten Wirkstoffen [Klebe, 2009]. Einhergehend mit den größtenteils nur vagen Vorstellungen über die Pathophysiologie von Erkrankungen blieb die Entdeckung neuer Wirkstoffe in dieser Zeit zumeist aber auf Zufallsbefunden begründet.

Im Gegensatz dazu ist die heutige Arzneimittelentwicklung von einem immer detaillierter werdenden, molekularen Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Prozesse des Menschen geprägt. Die Identifizierung der Schlüsselreaktionen eines Krankheitsprozesses und die Charakterisierung der beteiligten Proteine steht im Fokus der Forschung - gefolgt von der Entwicklung potentieller Hemmstoffe und deren Optimierung u.a. hinsichtlich Selektivität und Bioverfügbarkeit. Synthetische, niedermolekulare Verbindungen machen - trotz des zunehmenden Marktanteils biotechnologisch hergestellter, makromolekularer Wirkstoffe - nach wie vor den Großteil unserer Arzneistoffe aus [Verband Forschender Arzneimittelhersteller, 2012].

Das strukturbasierte Wirkstoffdesign stellt sowohl eine Disziplin moderner Arzneimittelentwicklung als auch eine Abkehr von traditionellen, in erster Linie auf Zufall basierenden Methoden der Wirkstofffindung dar. Durch die strukturelle Charakterisierung eines Zielproteins ist es im Idealfall möglich, die molekularen Grundlagen seiner Funktion zu erkennen und diese durch "maßgeschneidert" synthetisierte und entsprechend affin bindende Wirkstoffe zu modulieren. Die strukturelle Analyse von Protein-Ligand Komplexen gepaart mit computergestützten Analysemethoden wie beispielsweise der Ermittlung von *hot spot* Interaktionen oder die Pharmakophorgenerierung ermöglicht die Optimierung zu potenten Wirkstoffen. Die Quelle der benötigten strukturellen Informationen ist in erster Linie die

Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen und in geringerem Maße die NMR-Spektroskopie. In den letzten Jahren nimmt der Umfang an Strukturdaten nahezu exponentiell zu. So zählt die *protein data bank* (PDB, www.rcsb.org) im September 2012 ca. 85.000 Einträge, wovon ca. 75.000 Einträge durch Röntgenstrukturanalyse gewonnen wurden.

Pragmatisch formuliert bietet ein gut etabliertes System bestehend aus kristallisierbarem Protein, einer Serie von Liganden und einer Methode zur Affinitätsbestimmung der Liganden die Möglichkeit des effektiven Studiums sowohl der Struktur-Affinitätsbeziehungen als auch der strukturellen Charakteristika des Zielproteins wie z.B. Mechanismen der Substraterkennung oder Funktionalität von Domänen und Quartärstrukturen.

Die tRNA-Guanin Transglycosylase (TGT) ist ein Beispiel für einen solchen Fall. Es stellt darüber hinaus als eines der Schlüsselproteine in der Pathogenese der bakteriellen Ruhr eine Zielstruktur für potentielle Antibiotika gegen die ursächlichen *Shigella*-Bakterien dar. In vorangegangenen Arbeiten konnten bereits hochpotente Inhibitoren der TGT entwickelt und charakterisiert werden [Hörtner et al., 2007; Ritschel, Kohler et al., 2009; Kohler et al., 2009]. Diese Liganden sollen nicht nur hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität sondern auch unter Gesichtspunkten der Bioverfügbarkeit weiterentwickelt werden.

Für die TGT konnte weiterhin ein direkter Zusammenhang zwischen katalytischer Aktivität und einer homodimeren Quartärstruktur gezeigt werden [Ritschel, Atmanene et al., 2009]. Die Hemmung der Dimerisierung könnte einen bisher unausgeschöpften Inhibitionsmechanismus darstellen. Die Modulation von Protein-Protein Interaktionen (PPI) durch Arzneistoffe ist hierbei ein neuerer Ansatz der Arzneistoffentwicklung, welcher Perspektiven für die Pharmakotherapie zahlreicher Erkrankungen eröffnet [Berg, 2003]. Das neue Ziel, eine PPI zu blockieren, bringt für das strukturbasierte Design aber auch eine Vielzahl an anspruchsvollen Aufgaben mit sich. So gestaltet sich die Identifizierung von Schlüsselinteraktionen zwischen zwei Proteinen häufig als schwierig und ist mit großem molekularbiologischem Aufwand verknüpft [Berg, 2003]. Die TGT stellt in diesem Zusammenhang ein gut zugängliches Modellsystem für Studien zur Charakteristik einer PPI dar. Ein tiefgehendes Verständnis der Bedeutung

bestimmter struktureller Motive für die Stabilität eines Proteindimers ist Grundlage für die Entwicklung von PPI-Inhibitoren.

1.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Inhibitoren der TGT mit sehr unterschiedlichen Zielsetzungen entwickelt und charakterisiert werden. Außerdem sollte das Zielenzym im Hinblick auf Substrataffinität und Eigenschaften des aktiven Zentrums näher charakterisiert werden. Die Schwerpunkte der Arbeit bildeten dabei folgende Aufgabenstellungen:

- Die räumliche Nähe des aktiven Zentrums der TGT zur Dimer *interface*-Region sollte zur Identifizierung von *hot spots* der Protein-Protein Interaktion genutzt werden. Auf Basis eines hochaffinen *active site*-Inhibitors sollten neue, in die Dimer *interface*-Region gerichtete Liganden strukturbasiert entwickelt und hinsichtlich ihrer Effekte auf die Protein-Protein Interaktion untersucht werden (Kapitel 2).
- Verschiedene Grundgerüste für *active site*-Liganden sollten im Hinblick auf pK_a-Profil, Membranpermeabilität, Bindungsaffinität und Bindungsmodus untersucht werden. Kristallographisch konservierte Wassernetzwerke sollten strukturell diskutiert werden, wobei deren Erhalt, Veränderung oder Verdrängung durch Liganden in Zusammenhang mit deren Bindungsaffinität stehen kann (Kapitel 3).
- Inhibitoren der TGT sollten durch gleichzeitige Besetzung dreier Subtaschen des aktiven Zentrums strukturbasiert optimiert und unter besonderer Berücksichtigung von Kooperativitäten zwischen Ligand-Seitenketten und im Hinblick auf strukturelle Ursachen möglicher Restmobilitäten in der Bindetasche kristallographisch analysiert werden (Kapitel 4).
- Der Protonierungszustand von Asp102 im aktiven Zentrum der TGT sollte durch die Untersuchung einer Varianten-Kristallstruktur ermittelt werden (Kapitel 5).
- Die Dissoziationskonstante der tRNA gegenüber TGT sollte mittels Thermophorese-Messungen ermittelt werden (Kapitel 6).

1.3 Bakterienruhr

Die Bakterienruhr (syn: Shigellose) ist eine akut entzündliche Erkrankung des Dickdarms, welche durch verschiedene Arten des *Shigella*-Bakteriums hervorgerufen wird. Die Infektion erfolgt oral über die Aufnahme von kontaminiertem Trinkwasser bzw. Nahrungsmitteln. Die Infektionsdosis ist hierbei ausgesprochen gering - bereits 10 Bakterienzellen sind ausreichend um eine Erkrankung hervorzurufen [Sansonetti, 2001]. *Shigella* weist eine hohe Säurestabilität auf, wodurch eine ungehinderte Magenpassage ermöglicht wird. Weiterhin führt die hohe Invasivität zum Eindringen der Bakterien in Epithelzellen des terminalen Ileums sowie des Kolons, einhergehend mit ausgedehnten, ulzerösen Läsionen innerhalb dieser Darmabschnitte [Sansonetti, 2001]. Diese spiegeln sich im klinischen Bild der Bakterienruhr wieder, welches von kolikartigen Bauchschmerzen, Tenesmen und wässriger oder blutiger Diarrhoe geprägt ist. Ein lebensbedrohlicher Krankheitsverlauf ist in erster Linie bei Säuglingen und Kleinkindern möglich, wobei die Sekundärkomplikationen der Bakterienruhr - Flüssigkeits- und Elektrolytverlust mit kausalem Nieren- und Kreislaufversagen - als besonders problematisch anzusehen sind [Hof et al., 2005]. Die Pharmakotherapie der Bakterienruhr wird aufgrund der zunehmenden Antibiotikaresistenzen immer schwieriger. So sind viele humanpathogene Stämme bereits resistent gegen Sulfonamide, Tetrazykline, Ampicillin und Trimethoprim-Sulfmethoxazol [Sack et al., 1997]. Für Fluorchinolone wird die zunehmende Entwicklung von Resistenzen beobachtet [WHO, 2000]. Die World Health Organization (WHO) empfiehlt aktuell die Therapie der Bakterienruhr mit Ciprofloxacin, ergänzt durch Flüssigkeits- und Elektrolytsupplementation.

Epidemiologisch betrachtet tritt die Bakterienruhr weltweit mit jährlich ca. 165 Millionen Krankheitsfällen und ca. 1 Million letalen Verläufen auf [Kotloff et al., 1999]. Die Erkrankungshäufigkeit ist aufgrund des fäkal-oralen Infektionsweges in Entwicklungsländern mit unzureichender Trinkwasser- und Nahrungsmittelversorgung deutlich erhöht. Assoziiert mit zunehmender internationaler Reiseaktivität liegt die Anzahl der Krankheitsfälle in der Bundesrepublik Deutschland jährlich im höheren dreistelligen Bereich [Robert-Koch-Institut, 2010].

Aus endemischen Gebieten der Bakterienruhr stammen erste dokumentierte Fälle in denen Patienten nach einer durchlaufenen Shigellose Immunität gegen den

entsprechenden Erreger entwickelt haben. Dieser Befund motiviert die Bestrebungen zur Entwicklung eines Impfstoffes, welcher v.a. in Endemiegebieten zum Einsatz kommen könnte. Die Wirksamkeit eines kürzlich entwickelten, oral applizierbaren Lebendimpfstoffes - basierend auf attenuiertem *Shigella dysenteriae* Typ 1 - konnte in einer ersten klinischen Studie gezeigt werden [Launay et al., 2009].

1.4 Klassifikation von *Shigella* und Verwandtschaft zu *Escherichia*

Shigellen sind GRAM-negative, sporenlose, unbegeißelte, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, die nach dem japanischen Bakteriologen Kiyoshi Shiga benannt wurden. Dieser wies den Erreger 1898 erstmals nach. Das Genus *Shigella* ist in vier Spezies unterteilt, welche sich wiederum auf Basis unterschiedlicher O-Antigene in mehrere Serotypen untergliedern lassen [Sansone, 2001] [Hof et al., 2005]:

Shigella flexneri (6 Serotypen): Erreger der Flexner-Ruhr, weltweit am weitesten verbreitet, eher milder Infektionsverlauf.

Shigella dysenteriae (16 Serotypen): Erreger der Shiga-Kruse-Ruhr, Auftreten vorwiegend in tropischen Regionen, höchste Pathogenität innerhalb des Genus aufgrund der Produktion des zytotoxischen Shiga-Toxins (*S. dysenteriae* Typ 1).

Shigella sonnei (1 Serotyp): Erreger einer eher in Mitteleuropa auftretenden, in der Regel harmlos verlaufenden Ruhr.

Shigella boydii (8 Serotypen): weltweit eher seltenes Vorkommen mit gleichmäßiger globaler Verteilung.

Das Genus *Shigella* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Genetische Analysen konnten allerdings zeigen, dass es sich bei *Shigella* eigentlich nicht um einen eigenen Genus handelt, sondern vielmehr die vier oben genannten "Arten" des "Genus" *Shigella* als Subtypen von *Escherichia coli* anzusehen sind [Escobar-Paramo et al., 2004]. Die Bezeichnung von *Shigella* als *enteroinvasive E. coli* (EIEC) entspricht daher eher der genetischen Verwandtschaft.

Seit Mai 2011 hat sich v.a. in Deutschland die Bewertung des von *E.coli* ausgehenden Gesundheitsrisikos für die Bevölkerung verändert. In dieser Zeit wurden die Einrichtungen des Gesundheitsschutzes v.a. in den nördlichen Bundesländern von

einem epidemischen Ausbruch des enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) des Serotyps O₁₀₄H₄ massiv ausgelastet. Das Bakterium verursachte hierbei in 855 Fällen das lebensbedrohliche hämolytisch-urämische Syndrom und in 2987 Fällen eine akute Gastroenteritis [Robert-Koch-Institut, 2011]. Insgesamt verstarben 53 Patienten infolge einer EHEC-Infektion. Entscheidend für die hohe Pathogenität dieses EHEC-Stammes war das sezernierte Shiga-Toxin 2, welches in variiertes Form ebenfalls von *Shigella dysenteriae* Typ 1 produziert wird.

Parallel zur medizinischen Problematik entstand in den Wochen des EHEC-Ausbruchs auch ein deutlicher volkswirtschaftlicher Schaden, der auf wöchentlich etwa 300 Mio. Euro geschätzt wurde. Bedingt durch die zunächst unklare Herkunft des Erregers hatte hierbei v.a. die Lebensmittelindustrie starke Umsatzeinbrüche zu verzeichnen.

1.5 Zelluläre und molekulare Pathogenese der Shigellose

Shigellen besitzen nicht die Fähigkeit von der luminalen Seite direkt in Enterozyten einzudringen [Sansonetti, 2001]. Die Passage der Darmwand geschieht daher indirekt über M-Zellen, welche als zellulärer Teil des Immunsystems in die Enterozytenmembran integriert sind (Abbildung 1.1). M-Zellen sind hierbei auf die Phagozytose von Antigenstrukturen (z.B. Bakterien) spezialisiert, welche anschließend den basolateral assoziierten Makrophagen präsentiert werden. Beide genannten Zellarten bilden einen Teil des Follikel-assoziierten Epithels, welches submukosale Lymphgefäße überlagert. Shigellen sind in der Lage die unspezifische, zelluläre Immunreaktion über den Weg der Phagozytose durch Makrophagen unbeschadet zu überstehen. Vielmehr induzieren sie die Apoptose der umgebenden Makrophagen durch Aktivierung der pro-apoptotischen Caspase-1, welche außerdem die pro-inflammatorischen Interleukine IL-1 β und IL-18 in die aktive Form überführt [Sansonetti, 2001]. Letztgenannte Entzündungsmediatoren werden nach post-apoptotischer Zellyse der Makrophagen gemeinsam mit den zuvor phagozytierten Shigellen in das umgebende Gewebe freigesetzt und lösen hier eine massive Entzündungsreaktion aus. IL-18 fördert hierbei die Produktion des Interferons γ (IFN- γ), das seinerseits als Aktivator des Immunsystems fungiert. Die freigesetzten Shigellen befallen die Enterozyten von der basolateralen Seite aus und verbreiten sich - vom Immunsystem weitgehend unbeeinflusst - innerhalb des Darmepithels. Infizierte

Epithelzellen sezernieren IL-8, welches gemeinsam mit IL-1 β und IL-18 chemotaktisch auf Makrophagen und polymorphonukleare Leukozyten (PMN) wirkt und diese aus dem subepithelialen Gewebe rekrutiert [Sansonetti, 2001; Jennison et al., 2004]. Die Einwanderung dieser Zellen in das infizierte Darmepithel in Verbindung mit der akuten Entzündungsreaktion destabilisiert das Gewebe zunehmend. Hierdurch wird die Passage weiterer Shigellen aus dem Darmlumen auf die basolaterale Epithelseite erleichtert. Im Gegensatz zu oben beschriebenen Makrophagen sind PMN-Zellen allerdings in der Lage, Shigellen im Phagosom abzutöten.

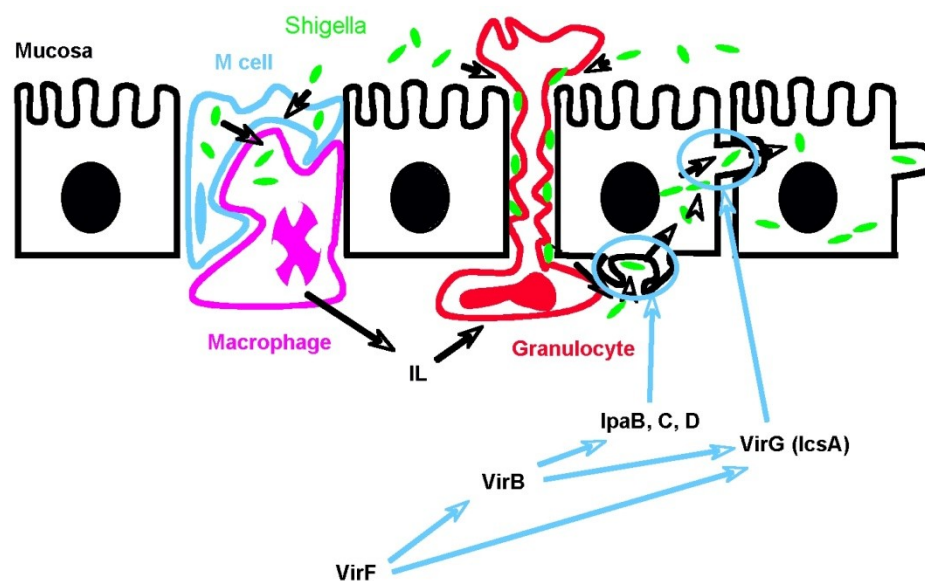


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Infektion des Kolonepithels durch *Shigella* und der entscheidenden Virulenzfaktoren und Mediatoren (Abbildung aus: <http://sitemaker.umich.edu/garcia.lab/home>).

Die Pathogenität von *Shigella* hinsichtlich Apoptoseinduktion von Makrophagen, makropinozytischer Aufnahme durch Enterozyten und intrazellulärer Beweglichkeit innerhalb des Darmepithels ist durch eine Vielzahl von Virulenzfaktoren (Invasine) bedingt [Fernandez et al., 2003; Van Nhieu et al., 2000]. Die Biosynthese dieser Virulenzfaktoren ist kontrolliert durch die Transkriptionsfaktoren VirF und VirB (Abbildung 1.1). Für das Eindringen in die Enterozyten des Darmepithels bildet *Shigella* zunächst einen röhrenartigen Typ III Sekretionsapparat aus [Sansonetti, 2001]. Nach Kontakt mit einer eukaryotischen Zelle bilden die sezernierten Invasine IpaB und IpaC eine Pore in der Zellmembran des Enterozyten. IpaC führt im Zytoplasma des

Enterozyten zur Aktivierung der Src-Tyrosinkinase, welche eine Signalkaskade aktiviert. Diese Kaskade führt zu einer Aktin-vermittelten Aufnahme von *Shigella* in die Darmzelle. Die intrazelluläre Mobilität von *Shigella* ist ebenfalls Aktin-abhängig und wird durch den Virulenzfaktor VirG (IcsA) kontrolliert.

1.6 Bedeutung von VirF und TGT für die Virulenz von *Shigella*

Die Invasivität und damit die Virulenz von *Shigella* hängt von den oben beschriebenen Virulenzfaktoren ab. Die genetische Information dieser Proteine ist auf einem Virulenzplasmid (214 kb) kodiert, welches aus *S. flexneri* isoliert und sequenziert werden konnte [Dorman et al., 1998]. Die Gene der Virulenzfaktoren sind über das gesamte Plasmid verteilt. VirF und VirB aktivieren die Transkription von Virulenzfaktoren, wobei VirF die Transkription von VirB- und VirG (IcsA)-Genen fördert (Abbildung 1.1). Indirekt kontrolliert VirF so auch die zelluläre Konzentration von IpaB, IpaC und IpaD, da die Transkription der entsprechenden Gene von VirB reguliert wird.

Die zelluläre Konzentration von VirF ist diversen Einflussgrößen unterworfen [Durand et al., 2000]. Neben der Anwesenheit bestimmter Nährstoffe (freies Arginin und Methionin), sowie definierter Temperatur-, pH-, und Osmolaritätswerte ($> 30^{\circ}\text{C}$, pH 7.4, physiologische Osmolarität) konnte anhand eines Gen-*knock-out* Experiments gezeigt werden, dass für eine effektive ribosomale Translation der VirF-mRNA die komplementäre tRNA modifiziert sein muss. Wird diese Modifikation durch Gen-*knock-out* unterdrückt, sinkt die Virulenz von *Shigella* signifikant.

Die tRNA wird hierbei an zwei bestimmten Positionen modifiziert. An Position 34 ("wobble Position" des Antikodons) wird die hypermodifizierte Base Queuin (Nukleosid: Queuosin) inkorporiert, während sich an Position 37 das modifizierte Nukleosid 2-Methylthio- N^6 -isopentenyladenosin befindet (Abbildung 1.2).

Die Modifikation an Position 37 der tRNA wird durch das *miaA* Genprodukt katalysiert. Mutationen im *miaA* Gen reduzieren die zelluläre VirF-Konzentration von *Shigella* auf 10% und die hämolytische Aktivität auf 10-20% gegenüber dem Wild-Typ. Die Modifikation der Position 34 wird durch das *tgt* / (*vacC*) Genprodukt katalysiert. Eine Mutation der entsprechenden Gene führt zu einer auf 50-60% reduzierten VirF-

Konzentration und einer in gleichem Maße gesenkten hämolytischen Aktivität gegenüber dem Wild-Typ [Durand et al., 1994; Durand et al., 1997; Durand et al., 2000].

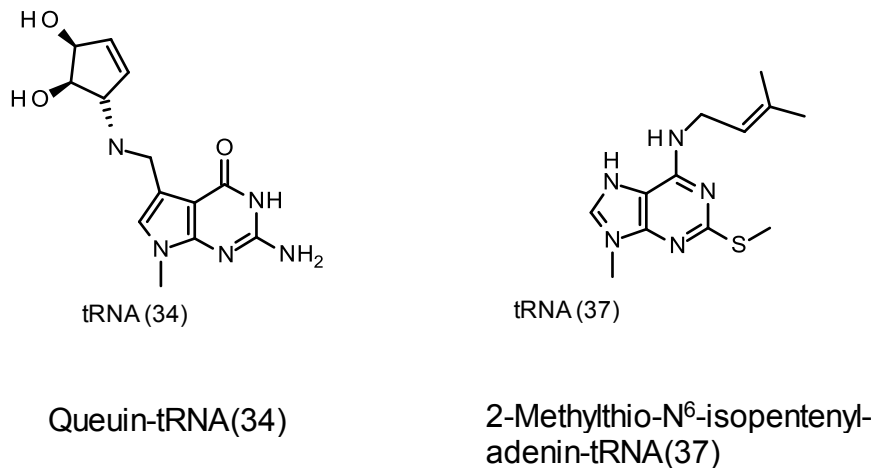


Abbildung 1.2 Modifizierte Basen an den Positionen 34 und 37 der tRNA.

Vor diesem Hintergrund ergibt sich die Hemmung von tRNA-modifizierenden Enzymen als vielversprechende Strategie zur Verminderung der Virulenz von *Shigella*. Entsprechende Inhibitoren stellen potentielle Antibiotika mit neuartigem Wirkmechanismus dar. Das Genprodukt des *tgt*-Gens aus *E.coli* - die tRNA-Guanin Transglycosylase (TGT) - ist bereits genau charakterisiert worden. Außerdem liegen diverse Kristallstrukturen der TGT aus *Zymomonas mobilis* vor, welche mit dem entsprechenden Protein von *S. flexneri* nahezu ident ist. Diese Datenlage lässt einen strukturbasierten Ansatz zur Entwicklung und Optimierung von Inhibitoren der TGT zu. Die langfristige Zielsetzung ist der *in-vivo* Nachweis des virulenzsenkenden Einfluss der Inhibitoren auf *Shigella*.

1.7 Biosynthese von Queuosin als tRNA Modifikation bei Prokaryoten

Nahezu alle Prokaryoten sind in der Lage tRNA in der oben beschriebenen Weise durch Einführung von Queuosin zu modifizieren. Lediglich *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces* und *Bifidobacterium* fehlt ein entsprechender Stoffwechselweg. Die TGT katalysiert in der mehrstufigen Biosynthese von Queuosin den Austausch des genetisch kodierten Guanins in Position 34 der tRNA durch den Queuin-Prekursor preQ₁ (Abbildung 1.3) [Hoops et al., 1995].

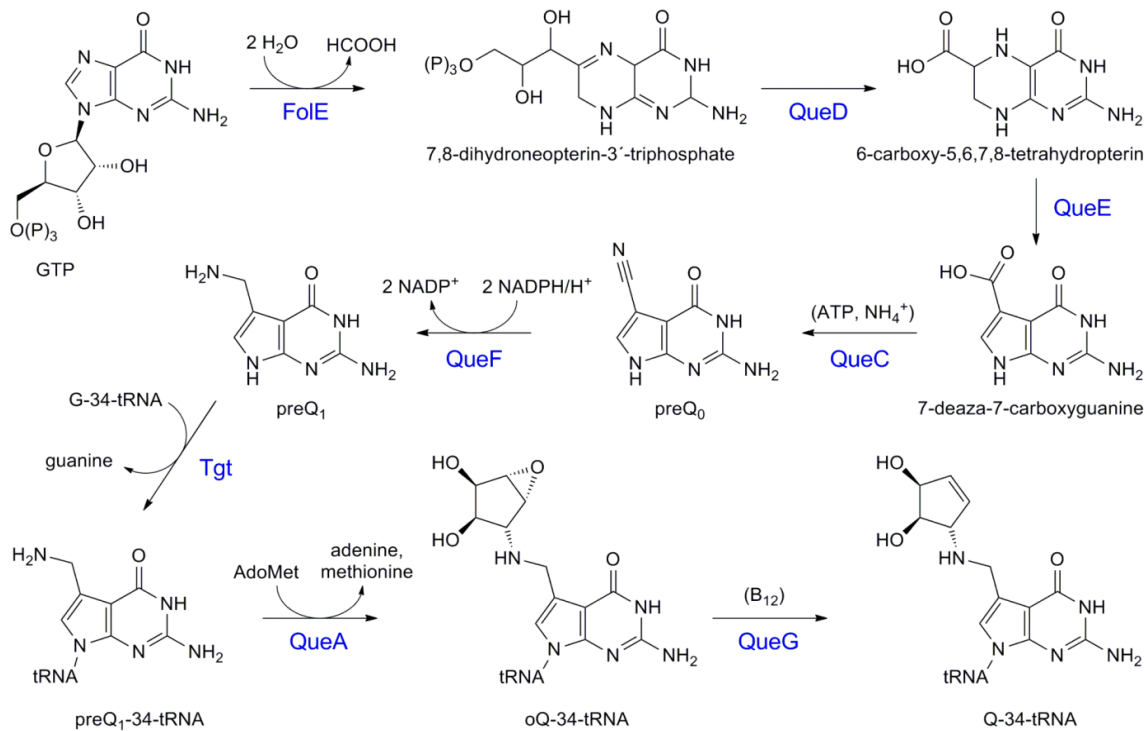


Abbildung 1.3 Biosynthese der modifizierten tRNA-Base Queuin mit Intermediaten und beteiligten Enzymen.

Im Rahmen der Substratspezifität muss hierbei die tRNA die Sequenz $U_{33}G_{34}U_{35}$ aufweisen, die nur im Zusammenhang mit der Antikodonstruktur $G_{34}U_{35}N_{36}$ ($N = A, U, C, G$) vorkommt. Die TGT akzeptiert also nur vier verschiedene tRNA-Moleküle ($tRNA^{\text{His, Tyr, Asp, Asn}}$) als Substrat.

PreQ₁ wird ausgehend von Guanodin-5-triphosphat (GTP) über Reaktionen der GTP-Cyclohydrolase I (Fole) [Philips et al., 2008], der 6-Carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin-Synthase (QueD) [McCarthy, Bandarian et al., 2009], eines S-Adenosyl-L-Methionin-abhängigen organische Radikale generierenden Enzyms (QueE) [McCarthy, Lin et al., 2009], der preQ₀-Synthetase (QueC) [McCarthy, Lin et al., 2009] und einer Nitril-Reduktase (QueF) [Lee et al., 2007] gebildet (Abbildung 1.3). Das in die tRNA inkorporierte preQ₁ wird in einer zweischrittigen Reaktion, katalysiert durch die S-Adosylmethionin-tRNA-Ribosyltransferase-Isomerase (QueA) [Van Lanen et al., 2003] und die Vitamin B₁₂-abhängige Epoxidequeosin-Reduktase (QueG) [Frey et al., 1988], in Queuin überführt (Abbildung 1.3).

Eukaryoten weisen ebenfalls eine durch die Inkorporierung von Queuin modifizierte tRNA auf. Aufgrund des Fehlens eines entsprechenden Biosynthesewegs müssen

Eukaryoten das Queuin-haltige Nukleosid Queuosin mit der Nahrung aufnehmen. Der anschließende Einbau in die tRNA erfolgt dann in einer einschrittigen Reaktion, die durch die eukaryotische TGT katalysiert wird. Weitergehende Modifikationen von Queuosin (Glykosylierung von Hydroxylgruppen) werden durch noch nicht näher charakterisierte Enzyme katalysiert [Iwata-Reuyl, 2003].

1.8 Mechanismus der TGT-katalysierten Basenaustauschreaktion

Die Basenaustauschreaktion, bei der das genetisch kodierte Guanin₃₄ der tRNA^{Asn, Asp, His, Tyr} durch preQ₁ ersetzt wird, läuft nach einem *ping pong*-Mechanismus ab [Xie et al., 2003]. Im initialen Schritt greift Asp280 das C(1) von Ribose₃₄ nukleophil an (Abbildung 1.4a). Während sich ein kovalentes Intermediat zwischen Asp280 und Ribose₃₄ ausbildet, stellt Guanin₃₄ die Abgangsgruppe der Reaktion dar. Guanin₃₄ muss nach der Abspaltung ein Proton aufnehmen, wobei der Protonendonator nicht klar definierbar ist. Während Xie et al. Asp102 als generelle Base der Reaktion beschreiben, kommt auch ein an Ala232 gebundenes Wassermolekül für diese Aufgabe in Frage (Abbildung 1.4a und b). Letzteres erscheint aus folgenden Gründen wahrscheinlicher [Persönliche Kommunikation, Prof. Dr. K. Reuter]. Die preQ₁-Inkorporation in die tRNA ist irreversibel. Aufgrund der exozyklischen Aminogruppe von preQ₁ kann sich das diskutierte Wasser nicht zeitgleich mit preQ₁ in der Guanin₃₄-Tasche befinden. Die Irreversibilität des preQ₁-Einbaus könnte somit durch das Fehlen eines Wassermoleküls in entsprechender Position als Protonendonator in einer Rückreaktion bedingt sein. Außerdem ist in diesem Zusammenhang die Nukleophilie von N(9) in preQ₁ und Guanin zu diskutieren. Während N(9) in Guanin-Teil eines Imidazolrings ist, liegt es in preQ₁ in einem Pyrrolring vor. Das zusätzliche Stickstoffatom N(7) im Imidazolring des Guanins übt einen indirekt elektronenziehenden Effekt auf N(9) aus, welcher im Pyrrolring von preQ₁ nicht vorhanden ist. Guanin sollte daher im Vergleich zu preQ₁ eine bessere Abgangsgruppe in der nukleophilen Substitutionsreaktion darstellen. In diesem Zusammenhang könnte auch der Bindetasche eine wichtige Funktion zukommen. So ist während der Bindung von Guanin die mit einem positiven Ladungsschwerpunkt versehene NH-Funktion von Ala232 in die Tasche gerichtet (Abbildung 1.4a). Durch dieses Arrangement ist ein über das verbrückende Wassermolekül und den Imidazolring fortgesetzter Elektronenzug auf

N(9) denkbar. Im Gegensatz hierzu ist durch die Bindung von preQ₁ im Anschluss an ein Umklappen der Peptidbindung 231-232 die C=O Funktion von Ala232 in die Tasche gerichtet (Abbildung 1.4c). Der negative Ladungsschwerpunkt des Carbonyl-Sauerstoffatoms begünstigt eine ladungsgestützte Wechselwirkung zur exozyklischen Ammoniumfunktion von preQ₁, wodurch der elektronenziehende Effekt auf N(9) und damit dessen Qualität als Abgangsgruppe als geringer einzuschätzen ist.

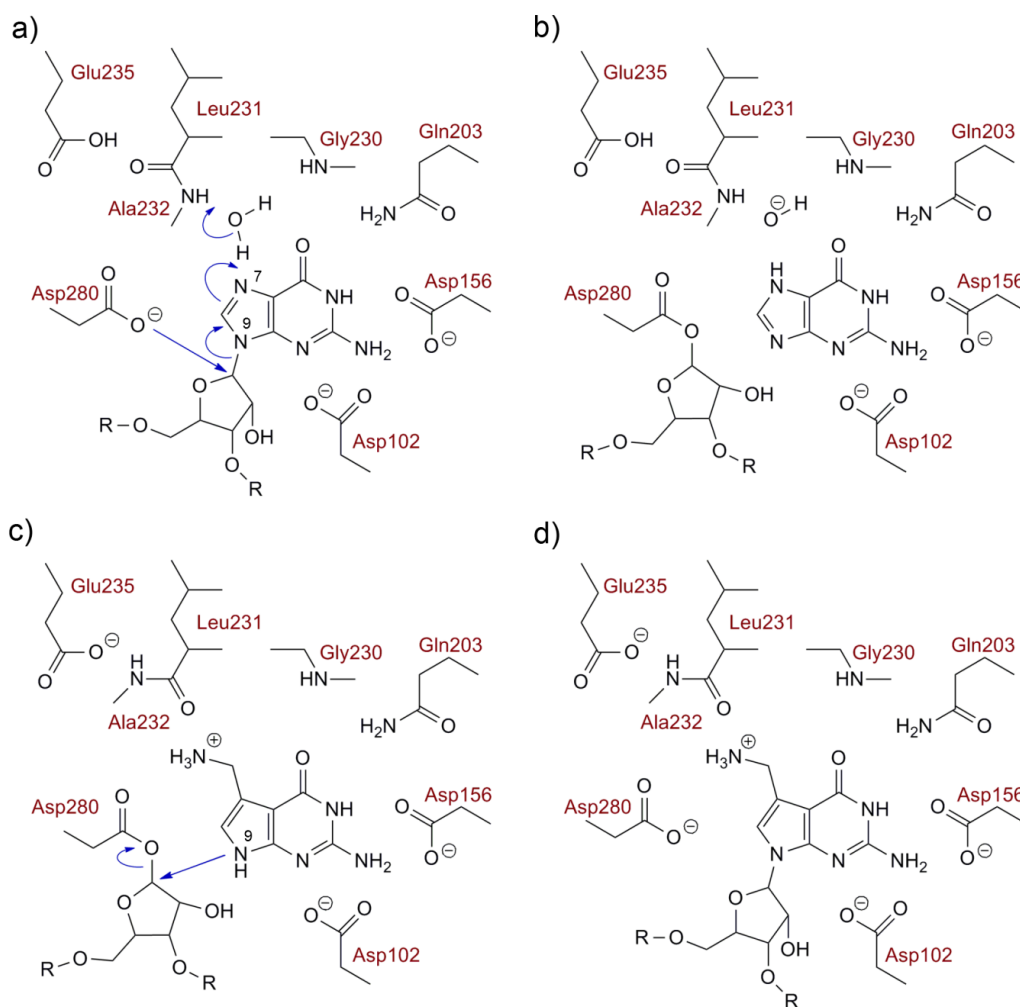


Abbildung 1.4 Angenommener Mechanismus der TGT-katalysierten Basenaustauschreaktion.

PreQ₁ bindet im dritten Reaktionsschritt in der freigewordenen Guanin34-Tasche (Abbildung 1.4c). Die Tasche verändert sich hierbei - wie oben angedeutet - im Rahmen einer *induced fit*-Adaption, bei der ein *flip* der Peptidbindung zwischen Leu231 und Ala232 die H-Brückendonor/akzeptoreigenschaften der Tasche umkehrt und dem

Substrat preQ₁ anpasst. Entscheidend für diese Adaption der Peptidbindung ist Glu235, welches in Abhängigkeit von seinem Protonierungsstatus sowohl mit der C=O-Funktion als auch mit der NH-Funktion von Ala232 wechselwirken kann (Abbildung 1.4b und c). PreQ₁ greift schließlich das C(1)-Atom der kovalent an Asp280 gebundenen Ribose34 nukleophil an (Abbildung 1.4c). Das in diesem Reaktionsschritt freigesetzte Proton wird sehr wahrscheinlich von einem der umgebenden Wassermoleküle aufgenommen (in der Abbildung nicht dargestellt). Im letzten Reaktionsschritt wird das kovalente tRNA-TGT-Intermediat gespalten und die modifizierte tRNA freigesetzt wird (Abbildung 1.4d).

1.9 Strukturelle Merkmale der *Z. mobilis* TGT

1.9.1 Sekundärstruktur

Z. mobilis TGT weist eine charakteristische Anordnung von β -Faltblatt- und α -Helix-Strukturelementen auf, welche der $(\beta\alpha)_8$ -TIM *barrel* Faltung entspricht (Abbildung 1.5) [Romier et al., 1996]. Erstmals wurde dieses in der Natur konservierte Faltungsmuster in der Triosephosphat-Isomerase (TIM) beobachtet. Es besteht aus acht zylinderartig angeordneten β -Faltblättern, auf deren Außenseite überbrückende α -Helices aufgelagert sind [Branden et al., 1991]. Das TIM-*barrel* Motiv wird durch zwei Insertionen erweitert, wobei sowohl die beta7-alpha6-Insertion als auch die Zinkbindungsdomäne an der Erkennung des Substrats tRNA beteiligt sind [Stengl et al., 2005]. Das aktive Zentrum befindet sich im Bereich des C-Terminus des TIM-*barrel* Motivs (Abbildung 1.6) [Okada et al., 1979; Nakanishi et al., 1994; Curnow et al., 1995].

1.9.2 Quartärstruktur

Z. mobilis TGT kristallisiert als Homodimer mit einer vergrabenen Kontaktfläche von ca. 1600 Å² zwischen beiden Monomeren (*Dimer interface*) [Ritschel, Atmanene et al., 2009]. Dieser kristallographische Befund ist unabhängig von der Raumgruppe der Proteinkristalle und gleichbleibend sowohl für apo-Strukturen als auch für Komplexstrukturen mit kompetitiven Inhibitoren oder tRNA-Fragmenten [Stengl et al., 2007; Xie et al., 2003].

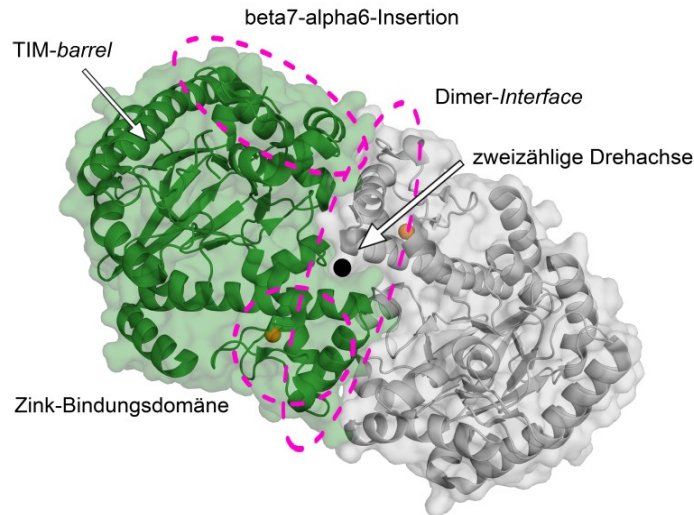


Abbildung 1.5 Übersicht über Strukturelemente des TGT-Homodimers gezeigt anhand einer apo-Kristallstruktur (PDB ID: 1P0D [Brenk et al., 2003]). Das Dimer kommt in dieser Struktur auf einer zweizähligen Drehachse zu liegen.

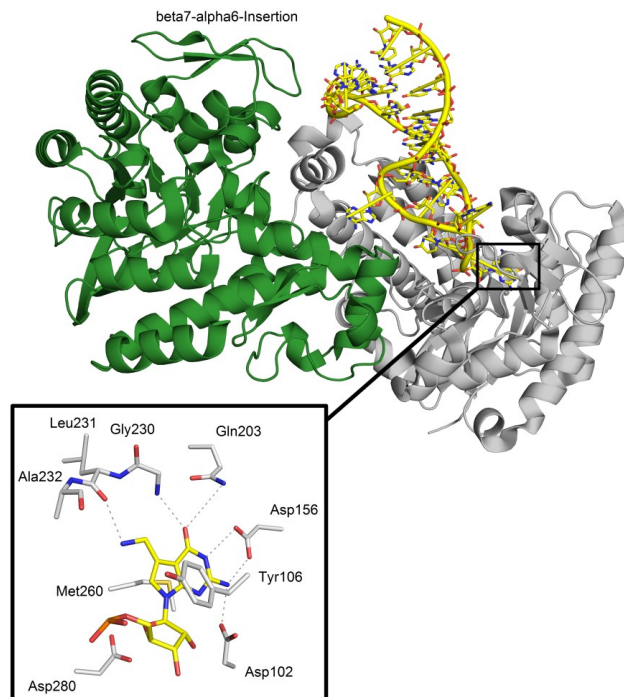


Abbildung 1.6 Ternärer Komplex des TGT-Homodimers mit einem gebundenen tRNA-Fragment, gezeigt anhand einer Kristallstruktur (PDB ID: 1Q2S [Xie et al., 2003]). Hervorgehoben ist das aktive Zentrum mit nukleosidischem preQ₁ als Reaktionsprodukt der TGT-katalysierten Basenaustauschreaktion. In dieser Struktur kommt das Dimer nicht auf einer zweizähligen Drehachse zu liegen.

Während in den beiden erstgenannten Fällen das Dimer immer auch als kristallographisches Dimer auf einer zweizähligen Drehachse zu liegen kommt (Abbildung 1.5), ist in letztgenanntem Fall eine identische Anordnung beider Monomere zueinander auch ohne die zweizählige Drehachse festzustellen (Abbildung 1.6).

Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen prokaryotischen Spezies zeigen weiterhin, dass die an der Bildung des Dimer *interface* von *Z. mobilis* TGT beteiligten Reste auch in anderen Spezies konserviert sind [Stengl et al., 2005]. Die Kristallstruktur eines Komplexes von *Z. mobilis* TGT mit einem tRNA-Fragment deutet auf eine homodimere Quartärstruktur als katalytisch aktive Form der TGT hin (Abbildung 1.6). Hierbei bindet das aktive Zentrum eines Monomers die tRNA, während das zweite Monomer den ternären Komplex - wahrscheinlich über Wechselwirkungen der beta7-alpha6-Insertion mit der tRNA - stabilisiert [Ritschel, Atmanene et al., 2009]. Die beta7-alpha6-Insertion wird durch zahlreiche, protonierbare Reste gebildet, welche ideale Interaktionspartner der nukleosidischen Phosphatgruppen der tRNA darstellen. Der 1:1 Komplex TGT Dimer:tRNA konnte durch nicht-kovalente Massenspektrometrie auch in der Gasphase nachgewiesen werden [Ritschel, Atmanene et al., 2009].

1.9.3 Aktives Zentrum

Das aktive Zentrum der TGT akzeptiert tRNA-Moleküle mit der Sequenz U₃₃G₃₄U₃₅ als Substrat [Okada et al., 1979; Nakanishi et al., 1994; Curnow et al., 1995]. Innerhalb der Guanin34-Subtasche findet die oben beschriebene Basenaustauschreaktion statt. Diese Tasche ist im Gegensatz zur U33- und U35-Tasche im Inneren des Proteins vergraben. Die Substrate Guanin und preQ₁ werden über H-Brücken zu Asp102, Asp156, Gln203, Gly230, Leu231 und Ala232 fixiert. Tyr106 wechselwirkt mit dem π -System der aromatischen Substrate. Tyr106 ist hierbei der einzige Rest des aktiven Zentrums, welcher sich zwischen *Z. mobilis* und *Shigella* TGT unterscheidet [Grädler et al., 2001]. Letztere weist ein Phenylalanin in Position 106 auf. Leu231 und Ala232 können über einen *flip* der Peptidbindung die H-Brückendonor- bzw. akzeptoreigenschaften der Guanin-Tasche verändern [Brenk et al., 2003].

2 Launching spiking ligands into a protein-protein interface: A promising strategy to destabilize and break interface formation in a tRNA modifying enzyme

2.1 Introductory Remarks

The following chapter was prepared for submission to a scientific journal. The presented compounds were synthesized by Luzi J. Barandun (ETH Zürich). The nanoESI-MS experiments were performed by Stéphanie Petiot and François Debaene (Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de Strasbourg). The modeling study was performed by Michael Betz (Philipps-Universität Marburg).

2.2 Abstract

Apart from the classical approach to inhibit protein function by synthetic inhibitors mimicking the binding of natural substrates in the active site, the perturbation of protein–protein interactions in complexes composed of separate subunits with small molecules opens new perspectives for the discovery of innovative therapeutics. The tRNA modifying enzyme tRNA–guanine transglycosylase (TGT) is a potential drug target in the treatment of shigellosis. Its catalytic activity is highly dependent on a homodimeric quaternary structure. Consequently, the disruption of the dimer interface by small molecules is a potential new inhibition mode for TGT. A special feature in this enzyme is the relatively small distance between the active site and the border of the dimer interface. This allowed to follow a – as an alternative to conventional interface destabilization by tailored mutation – straight forward approach of expanding active site inhibitors with rigid, needle-type side chains spiking into potential interaction hot spots of the interface. Structure-based ligand design enabled to specifically interfere with different secondary structure elements involved in the dimer interface formation. The ligand spiking effects have been studied by X-ray crystallography, noncovalent mass spectrometry, and K_d measurements, complemented with computer simulations. Multiple cocrystal structures with non-extended active site inhibitors revealed a well-

defined loop region involved in several contacts across the dimer interface. Upon binding of the spiking ligands, this loop, assumed to be important for dimer stabilization, falls apart and suggests enhanced flexibility. Consequently, other features than the directed interactions of the loop residues must contribute to dimer stability. Two extensively studied spiking ligands were found to perturb the order of the loop during crystallization and suggest significant destabilization of TGT homodimer in solution. This is a promising step towards the development of small molecule inhibitors of the TGT dimerization. The crystallographic observations provide evidence for the high stability of a helix-turn-helix motif which contributes to the dimer interface. An adjacent hydrophobic patch of contacting residues could be identified in the interface which is supposedly an essential hot spot of the dimer stability as it remains unaffected by the spiking ligands.

2.3 Introduction

In Summer 2011, Germany had to witness the sudden development of a highly pathogenic *Shiga*-toxin producing strain of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). The fast epidemic spread of the disease with more than 2000 cases within six weeks underlines the potential hazard of bacterial-triggered gastrointestinal infections [Robert-Koch-Institut, 2011]. The closely related bacteria of the genus *Shigella* exhibit similar properties causing acute inflammation of the colon along with bloody, mucopurulent diarrhea – known as shigellosis. The disease occurs predominantly in developing countries where it is responsible for more than one million lethal cases each year [Kotloff et al., 1999]. The tRNA modifying enzyme tRNA-guanine transglycosylase (TGT, EC 2.4.2.29) is involved in the infection pathway of *Shigella* bacteria and could be identified as a potential drug target in the treatment of shigellosis [Durand et al., 2000; Grädler et al., 2001]. Bacterial TGT catalyses the incorporation of the premodified nucleobase preQ₁ at position 34 ("wobble position") of tRNA^{Asp, Asn, His, Tyr} replacing the genetically encoded guanine in due course of the exchange reaction. Subsequently, in TGT-independent reactions the hypermodified tRNA nucleoside queuosine is formed. This tRNA processing is a prerequisite for the biosynthesis of invasion factors that are essential for the important to create pathogenicity of *Shigella*. The latter proteins are essential for the bacterial invasion of human colon mucosa cells [Durand et al., 1994; Durand et al., 1997]. Structural

properties of TGT have been studied by numerous crystallographic investigations of the *Zymomonas mobilis* enzyme, which deviates in the active site by one Phe/Tyr-exchange from the *Shigella* species [Brenk et al., 2003]. Beside the design of potent inhibitors, insights into the quaternary structure of TGT, its oligomerization state in solution, and the stoichiometry of the catalytic transformation attracted notice in recent research [Ritschel, Atmanene et al., 2009; Stengl et al., 2007]. Crystal structure analysis of multiple *Z. mobilis* TGT complexes revealed a conserved homodimer with ca. 1600 Å² buried contact area between the two monomers [Ritschel, Atmanene et al., 2009] independent whether the apo protein, TGT–ligand complexes or a TGT–tRNA anticodon stem-loop complex have been regarded [Xie et al., 2003]. In most crystal structures, the homodimer coincides with a crystallographic two-fold axis, however also the anticodon stem-loop complex shows homodimeric arrangement with two TGT monomers and one bound tRNA molecule. This complex does not coincide with crystallographic symmetry. Apparently one monomer binds the substrate whereas the other presumably stabilizes the ternary complex [Xie et al., 2003]. This crystallographic finding appears obvious as the active sites of the two TGT monomers are closely adjacent and could not host two bulky tRNA substrates at a time. The crystallographic evidence is also found in solution. Noncovalent ESI mass spectrometry measurements clearly reveals the 2:1 TGT:tRNA complex as solution species without any evidence for concentration-dependent higher order complexes [Ritschel, Atmanene et al., 2009]. The homodimer formation is a clear functional prerequisite and single site mutation can take impact on dimer stability [Ritschel, Atmanene et al., 2009]. Visual inspection of the crystal structures referred to several directed interactions across the dimer interface. At first glance the salt bridge between Lys52 and Glu339' and the hydrogen bond between Ala49 and Tyr330' have been selected as putative key interactions (Figure 2.1).

Straight forward mutations by structurally related amino acids have been performed: The TGT(Tyr330Phe) and TGT(Lys52Met) mutants exhibited significantly reduced k_{cat} values (factor 10 and 50) while for the double mutant TGT (Lys52Met/Tyr330Phe) no residual catalytic activity was recognized. A crystal structure obtained from TGT(Lys52Met) unraveled pronounced disorder of complete secondary structure elements which contribute major parts to the dimer interface (helix $\alpha 1$ and the adjacent $\beta 1\alpha 1$ -loop, Figure 2.1). Surprisingly, mass spectrometry of TGT(Tyr330Phe) and TGT(Lys52Met) showed only a slight, concentration dependent increase of the

monomeric form instead of the anticipated complete dimer disruption. It is in question whether this finding in solution correlates with crystallographic evidence as TGT(Lys52Met) still forms a crystallographic dimer in the solid state. More as an incidental observation, two cocystal structures of TGT with *lin*-benzoguanine active site inhibitors indicated ligand-induced conformational changes within the dimer interface. These changes are produced by ligands with extended C(4)-substituents pointing into the ribose-34 pocket which is found in close vicinity of the dimer interface (Figure 2.1 and Table 2.1).

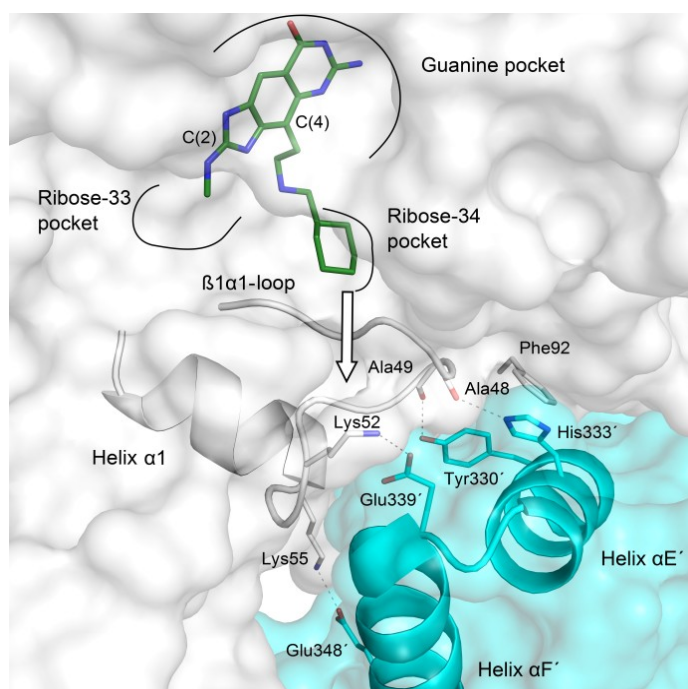


Figure 2.1 View on the binding pocket with the neighboring part of the dimer interface of *Z. mobilis* TGT. Colour coding: C_{monomer A} gray, C_{monomer B} cyan, C_{ligand} green, O red, N blue. Hydrogen bonds are shown as dashed lines. These characteristics apply to all figure captions unless otherwise stated. Both monomers are shown with transparent surfaces. Involved secondary structures are depicted as cartoon. Residues forming directed interactions across the monomers are shown as sticks. Between helix $\alpha 1$ / $\beta 1\alpha 1$ -loop and the corresponding helix-turn-helix motif two hydrogen bonds and three salt bridges are formed (Glu57-Lys325' not shown for clarity reasons). Glu339' is located at the apex of helix $\alpha E'$ and helix $\alpha F'$. Ligand **2** is displayed in the complex structure (PDB ID: 3EOS [Ritschel, Kohler et al., 2009], C green). This ligand exhibits the parental *lin*-benzoguanine scaffold further modified in this study. The white arrow indicates the direction in which spiking substituents are attached at the terminal cyclohexyl ring to possibly interfere with the helix $\alpha 1$ / $\beta 1\alpha 1$ -loop and the subjacent helix-turn-helix motif.

However, binding of these ligands had no obvious impact on dimer disruption in solution [Ritschel, Atmanene et al., 2009]. Nevertheless, the reported ligand-induced effects paved the ground for a novel strategy to disassemble the interface: ligands with

extended C(4)-substituents should be capable to directly spike into the interface region thereby perturbing and subsequently preventing dimer formation. This approach implicates the following three perspectives. (1) As TGT dimerization is obviously prerequisite for catalytic activity, ligands perturbing the dimer interface could provide a novel mechanism for TGT inhibition apart from competitive active site inhibition. (2) Typically, binding sites within a dimer interface are flat and, in monomeric state, mostly solvent-exposed cavities. Hence, the structure-based design of interface inhibitors is complicated by their most likely low binding affinity and in consequence it is difficult to perform crystal structure analysis. In contrast, applying reasonably decorated C(4)-substituents attached to potent active site binders, spiking into the dimer interface, can suggest new interaction sites without dramatic loss of binding affinity. In consequence, this strategy provides better opportunities to determine multiple crystal structures with bound ligands. (3) This approach opens the perspective to design the C(4)-substituents to selectively interfere with the structural arrangement next to the dimer interface. Thus, the most promising interactions with these local features can be analyzed with relatively small experimental effort. Usually, mutation studies are performed to obtain insights into interface formation. However, problems regarding protein purification and crystallization are frequently experienced [Ritschel, Atmanene et al., 2009]. These will be avoided following the above outlined ligand-based approach which requires solely the wild type protein.

In this contribution, a comprehensive study including X-ray crystallography, K_d measurements, noncovalent ESI mass spectrometry, structure-based design, and molecular dynamic simulations is presented. The multiplicity of methods opens various perspectives to characterize the TGT homodimer interface.

Based on the highly potent *lin*-benzoguanines as scaffold, C(4)-substituents were designed spiking from the active site into the adjacent dimer interface (Figure 2.1). Obtained TGT–ligand cocrystal structures provided information about the importance of directed interactions within the interface. Supported by computational chemistry, the stability of the involved secondary structures can be discussed. Noncovalent mass spectrometry and K_d measurements relate structural data provided by the crystal structures with the ligand-induced effects in solution.

2.4 Results

2.4.1 Architecture of the Dimer Interface

To perform a detailed analysis of the structural features of the dimer interface, 20 non-redundant crystal structures of TGT – denoted as TGT₂₀ in the following – have been randomly chosen and compared (see Experimental section). All structural features reported below were highly conserved in TGT₂₀ (Figure 2.2 and 2.3). The presented distance values are based on the apo structure (PDB ID: 1P0D [Brenk et al., 2003]) assessed as representative for TGT₂₀.

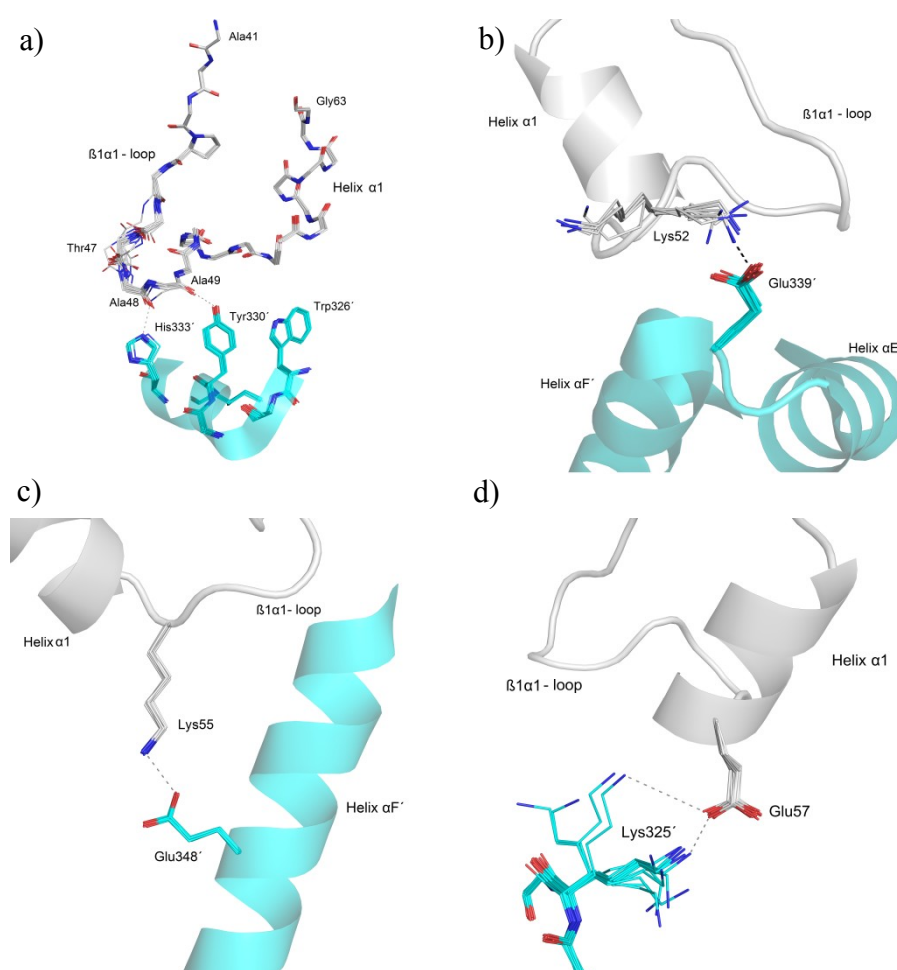


Figure 2.2 Crystallographically conserved, helix $\alpha 1$ / $\beta 1\alpha 1$ -loop associated directed interaction within the dimer interface of 20 test crystal-structures of *Z. mobilis* TGT (for PDB ID see Experimental section). Colour code: C and cartoon monomer A gray, C and cartoon monomer B cyan, O red, N blue. Hydrogen bonds and salt bridges are shown as dashed lines. a) Hydrogen bonds between Ala48/His333' (2.4 Å) and Ala49/Tyr330' (2.6 Å). Backbone atom positions of helix $\alpha 1$ / $\beta 1\alpha 1$ -loop are highly conserved with a slightly increased variance for Thr47. b) Salt bridge between Lys52 and Glu339' (2.3 Å). An alternative, Glu339'-averted conformation for Lys52 occurs in six structures. c) Salt bridge between Lys55 and Glu348' (2.6 Å). d) Salt bridge between Glu57 and Lys325' (2.3 and 4.2 Å). In two structures, Lys325' undergoes no interactions to Glu57.

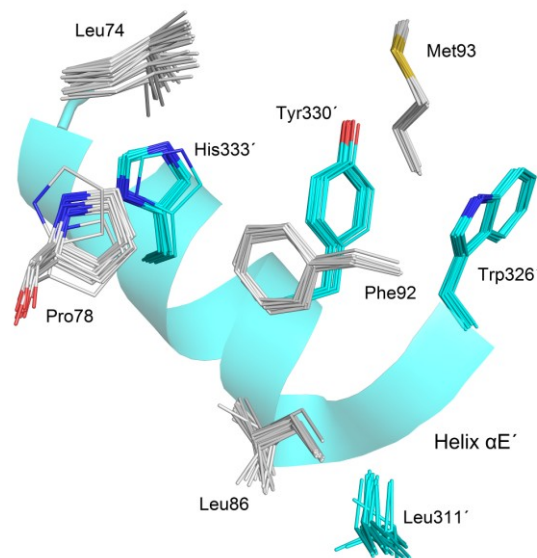


Figure 2.3 Hydrophobic contact area within the TGT dimer interface in 20 analysed datasets (for PDB ID see Experimental section). Colour code: $C_{\text{monomer A}}$ and cartoon grey, S yellow, $C_{\text{monomer B}}$ and cartoon cyan. The aromatic triade arising from helix $\alpha 1$ and consisting of Trp326', Tyr330', and His333' is part of a hydrophobic contact area with the corresponding monomer. His333' is in close contact to Leu74 (4.5 Å) and Pro78 (3.6 Å) whereas Tyr330' forms hydrophobic interactions to Phe92 (3.7 Å) and Met93 (4.2 Å). Met93 shows another contact to Trp326' (4.6 Å). Leu86 forms a hydrophobic interaction to Leu311' (3.9 Å).

The TGT homodimer spans an interface region of 1667 \AA^2 and each monomer contributes 43 contacting residues [Ritschel, Atmanene et al., 2009]. Regarding the directed interactions within the overall dimer interface, 10 salt bridges and 8 hydrogen bonds connect both monomer units, and the largest portion of these interactions resides on an α -helix composed of 9 residues (helix $\alpha 1$: Lys55–Gly63). This helix is preceded by an $\beta 1\alpha 1$ -loop formed by 10 residues (Val45–Leu54, Figure 2.1). It should be noted that due to two-fold symmetry any structural feature will contribute twice to the dimer interface. Each $\beta 1\alpha 1$ -loop comprises one residue to form the Lys52...Glu339' salt bridge and two hydrogen bonds (Ala48...His333', Ala49...Tyr330') while each helix $\alpha 1$ contributes to two salt bridges (Lys55...Glu348', Glu57...Lys325'). The binding partners of the corresponding monomer (indicated by a prime) are localized on a helix-turn-helix motif comprised by helix $\alpha E'$ (Ser327'–Arg336') and helix $\alpha F'$ (Ile340'–Glu367'). The latter stretches with a length of ca. 42 \AA across the entire monomer. Both helices are linked via a three-residue turn motif (Ala337', Gly338', Glu339') with Glu339' localized at the apex between both helices (Figure 2.1). Analyzing helix $\alpha E'$ with respect to hydrophobicity, Tyr330' and His333' attracted

attention apart from their above-mentioned role as hydrogen-bond donors. Complemented by Trp326', they form a hydrophobic, aromatic triad that experiences several van der Waals contacts to the adjacent monomer unit (Figure 2.1 and 2.4).

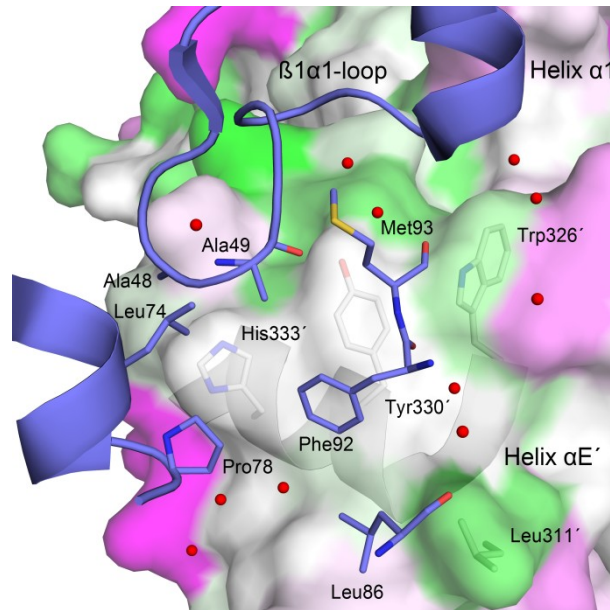


Figure 2.4 Hydrophobic contact area within the TGT dimer interface as observed in the apo structure (PDB ID: 1P0D [Brenk et al., 2003]) and found to be conserved across a dataset of 20 structures (TGT₂₀ dataset). Colour coding: C_{monomer A} and cartoon blue, S yellow, C_{monomer B} and cartoon gray. Water molecules are shown as red spheres and represents the archetype of a local water cluster conserved in the TGT₂₀ dataset. Surface of monomer B is coloured according to a normalized consensus hydrophobicity scale [Eisenberg et al., 1984] from maximal hydrophobicity (green) to maximal hydrophilicity (pink). An aromatic triad consisting of Trp326', Tyr330' and His333' is indicated as part of a hydrophobic contact patch exposed to the corresponding monomer mate of the dimer. The $\beta 1\alpha 1$ -loop of the mate (blue) locks this hydrophobic patch in the interface from the solvent and shields it as a kind of lid. This lid is further accomplished by the placement of the two hydrophobic residues Phe92 and Met93 from the dimer mate. In all analyzed TGT₂₀ no water molecules are observed in this contact area. All displayed side chains and secondary structures are crystallographically highly conserved (see Figure 2.3).

Altogether a rather hydrophobic, solvent-shielded contact area is generated between both monomers. His333' is in close contact with Leu74 (4.5 Å) and Pro78 (3.6 Å) of the other dimer mate whereas Tyr330' provides hydrophobic interactions to Phe92 (3.7 Å) and Met93 (4.2 Å). The latter residue exhibits a further contact to Trp326' (4.6 Å) which additionally interacts with the adjacent Pro56 localized on helix $\alpha 1$ (3.7 Å, not shown in Figure 2.4). Whereas the interaction between Leu86 and Leu311' (3.9 Å) blocks the contact patch on one face, the $\beta 1\alpha 1$ -loop shields the hydrophobic interface from above. In this context, Ala49 is located closely adjacent to Tyr330' (4.1 Å) and

His333' (4.3 Å), and the neighboring Ala48 interacts with His333' (4.2 Å). The TGT₂₀ dataset has been further analyzed regarding conserved water molecules accommodated in this hydrophobic contact region (Figure 2.4). Interestingly, several highly conserved water molecules surround the hydrophobic triad, however in none of the inspected crystal structures, a single water molecule is found within the hydrophobic interface patch.

2.4.2 Design of interface-spiking ligands

We developed *lin*-benzoguanines as tricyclic scaffold to occupy the guanine/preQ₁ recognition pocket with low nanomolar affinity [Ritschel, Kohler et al., 2009; Kohler et al., 2009]. It mimics the natural substrates by replacing their hydrogen-bonding pattern to Asp102, Asp156, Gln203, and Gly230 (see X-ray crystallography part) [Ritschel, Kohler et al., 2009; Hörtner et al., 2007]. Furthermore, the flat tricycle scaffold intercalates between the side chains of Tyr106 and Met260 similarly to the natural substrates. Design of potent active-site inhibitors exploited the ribose-33 pocket via C(2)-substitution [Hörtner et al., 2007] and the ribose-34 pocket via C(4)-substitution at the parent scaffold (Figure 2.1, Table 2.1) [Ritschel, Kohler et al., 2009; Kohler et al., 2009].

The design of our interface-spiking ligands was not entirely driven by affinity considerations but particularly focused towards the far end of the ribose-34 pocket which borders the dimer interface. We therefore considered extended C(4)-substituents to selectively perturb molecular portions of the interface, to explore putative interaction hot spots between the monomer units (Figure 2.1). In this study, we analyze compounds **1**, **3**, **4**, **7-13** (Table 2.1). As previously reported, **2**, **5** and **6** exert already some structural impact on the helix $\alpha 1/\beta 1\alpha 1$ -loop region [Stengl et al., 2007; Ritschel, Kohler et al., 2009]. In particular, **2** served as a lead for the designed ligand series. Its terminal cyclohexyl ring is deeply buried in the ribose-34 pocket and suits as a versatile vector to launch additional substituents targeting the $\beta 1\alpha 1$ -loop and the capping Glu339' located at the apex of the helix-turn-helix motif (Figure 2.1). The first model compounds **1**, **3** and **4** were focused on expansions at the cyclohexyl moiety. For compounds **7-13** a rigid, linear ethinyl linker has been attached to launch further substituents as a kind of warhead into the interface region. Our design suggested that, in addition to the

interference with the $\beta 1\alpha 1$ -loop, perturbation of the apex of the helix-turn-helix motif might be possible. As indicated above we anticipated this geometric motif as crucial for the aromatic interface triad residing on helix $\alpha E'$ (Figure 2.1 and 2.4).

Table 2.1 Affinity data [a] Competitive inhibition constant (K_i) measured in a kinetic assay [Meyer et al., 2006]. [b] Ritschel, Kohler et al., 2009, [c] Stengl et al., 2007.

Compound	R	K_d	Compound	R	K_d
1		1.1 nM ± 0.3 nM	7		5 nM ± 2 nM
2		4 nM ± 2 nM ^[a,b]	8		20 nM ± 6 nM
3		1.2 nM ± 0.3 nM	9		14 nM ± 2 nM
4		25 nM ± 10 nM	10		36 nM ± 15 nM
5		2 nM ± 1 nM ^[a,b]	11		4 nM ± 1 nM
6		3.7 μM ± 0.9 μM ^[a,c]	12		24 nM ± 14 nM
			13		32 nM ± 9 nM

2.4.3 Evaluation of Binding Data

Dissociation constants K_d have been obtained at pH 7.3 in 100 mM HEPES buffer by microscale thermophoresis. Application of a local temperature gradient induces protein motion which depends on size, charge and hydration shell. These properties are modulated by the presence of bound ligands which therefore allows the determination of the dissociation constants K_d [Wienken et al., 2010].

Compared to the parent scaffold **2**, compound **3** exhibits an attached methyl group expanding the terminal cyclohexyl ring. This derivative achieves an affinity of 1.2 nM (Table 2.1). Further expansion by the sterically demanding butyl group to feature **4** reduces affinity by 20-fold compared to **3**. Surprisingly, the bulky adamantyl moiety of **1** shows significantly improved affinity compared to **4**. An explanation of this affinity gain is provided by the cocrystal structure (see below). Regarding the series of alkyne ligands (**7-13**), no dramatic affinity breakdown is experienced compared to the parent compound **2**, although the ligand efficiency is reduced by the large substituents. Within the alkyne series ligands with shorter side chains (**7**, **9**, **11**) tend to exhibit better affinity (4–14 nM) whereas longer and bulkier decorations (**10**, **12**, **13**) lead to a drop in affinity towards two-digit nanomolar range (24–36 nM).

2.4.4 Structural characterization

To analyze ligand binding modes and perturbation of the dimer interface we performed cocrystal structure analyses with **1**, **7** and **12** at resolution between 1.45–1.74 Å. Furthermore, **7** has been soaked into protein crystals and a dataset has been collected at 1.62 Å resolution. Detailed information about the experimental conditions are given in the Experimental section (for refinement statistics see Appendix).

The tricyclic aromatic 2-amino-*lin*-benzoguanine moiety has been extensively described in preceding studies [Hörtner et al., 2007; Ritschel, Hörtner et al., 2009]. Also in the crystal structures determined in this study, the *lin*-benzoguanine core of **1**, **7** and **12** forms hydrogen bonds to Asp102, Asp156, and Gln203 and the backbone of Gly230, Leu231, and Ala232 of the guanine recognition pocket (Figures 2.5, 2.6 and 2.9). The interaction to Asp102 is charge-assisted, as N(5) of the tricycle is assumed to be protonated while Asp102 is, without much doubt, deprotonated (Table 2.1) (see section 3). As the 2-amino-imidazole is also most likely protonated, the hydrogen bond

to the Leu231 backbone C=O group has to be classified as charge assisted [Hörtner et al., 2007; Ritschel, Hörtner et al., 2009]. Furthermore, the ligand undergoes favorable π -stacking with Tyr106 and Met260 both flanking the tricycle [Hörtner et al., 2007]. The C(4)-substituent points into the ribose-34 pocket (Table 2.1) and an ethylamino linker attached to C(4) has been established as most promising to serve the purpose with high binding affinity [Ritschel, Kohler et al., 2009]. A conserved water cluster between the two facing Asp residues 102 and 280 is partly displaced [Ritschel, Kohler et al., 2009]. Binding of *lin*-benzoguanines induces a *cis*-peptide bond flip between Val262 and Gly263 [Ritschel, Hörtner et al., 2009].

For the adamantyl derivative **1**, well-defined electron density is apparent for the entire ligand (Figure 2.5a). The adamantyl moiety fills the ribose-34 pocket which shows several ligand-induced rearrangements. This leads to extended hydrophobic contacts compared to the complex structure of **2** (Figure 2.5b, PDB ID: 3EOS [Ritschel, Kohler et al., 2009]). In this pocket, the adamantyl moiety of **1** cannot adopt the same position as the cyclohexyl portion of **2** due to spatial restrictions provoked by Asn70 and Gln107. Hence it is shifted by 0.8 Å and tilted by 74°. In addition to this shift, the bulky adamantyl moiety pushes Gln107 about 3 Å off from the rim of the pocket which translates into a rearrangement of residues 108–115. This region of the protein is known to be flexible [Stengl et al., 2007]. Furthermore, the side chain of His73 adopts an orientation which widens the hydrophobic ribose-34 pocket. Additional pocket expansions are accomplished by reorientations of Asn70 and Thr47. The former moves its hydrophilic carboxamide group off from the ligand and presents the more apolar methylene portion towards the adamantyl moiety. Thr47 adopts a not yet described orientation by being shifted ca. 2 Å compared to the apo structure (PDB ID: 1POD [Brenk et al., 2003]). Whereas its side chain OH-group is oriented towards the ribose-34 pocket in the apo structure in the complex with **1**, the apolar methyl group experiences hydrophobic interactions with the adamantyl moiety (Figure 2.5). In consequence, the Thr47 OH side chain is now directed towards the dimer interface and forms a hydrogen bond to Lys52. The latter contact resulting from the reorientation is the only structural impact created by **1** on the targeted $\beta 1\alpha 1$ -loop. Especially the Lys52···Glu339' salt bridge is not affected by this ligand (Figure 2.5a).

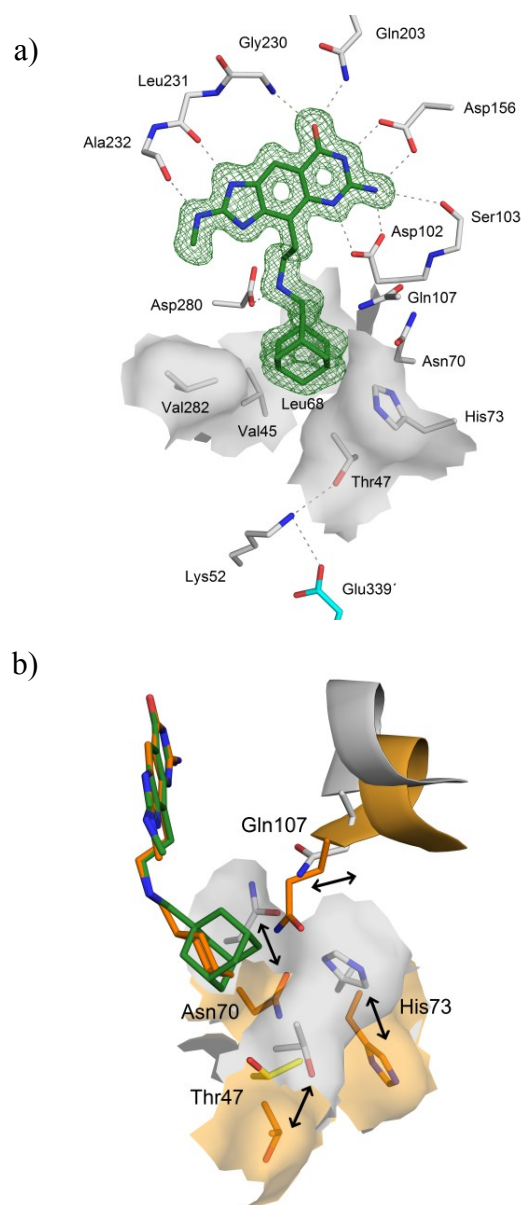


Figure 2.5 Cocystal structure of **1** bound in the active site of TGT (PDB ID: 4FPS). a.) The ligand is well-defined in the difference electron density contoured at 2σ level (green mesh). This characteristic applies to all figure captions of this section unless stated otherwise. The hydrophobic bottom of the ribose-34 pocket (shown as sticks and gray surface) encompasses the adamantyl moiety extensively. Asn70 and Thr47 expose their hydrophobic side chain portions towards the adamantyl moiety. The aromatic face of the imidazol moiety of His73 forms hydrophobic contacts to the adamantyl substituent. Lys52 is hydrogen bonded to Thr47 and Glu339'. Lys52 and Glu339' exhibit crystallographically conserved positions and form an interaction network with each other. For reasons of clarity the geometrically conserved secondary structures across the dimer interface are not shown. Indicated hydrogen bonds exhibit distances of 2.7–3.7 Å. Hydrophobic contact distances between the adamantyl moiety and the surrounding hydrophobic pocket fall between 3.3 and 4.2 Å. b.) Superposition of the crystal structure of **1** with the structure of **2** (PDB ID: 3EOS [Ritschel, Kohler et al., 2009]) and the apo structure (PDB ID 1P0D [Brenk et al., 2003]). Residues 107-115 are shown as cartoon. C_{Protein} and surfaces of the crystal structure of **1** are shown in grey. C_{Protein} and surfaces of the crystal structure of **2** are shown in orange. For clarity reasons, only the Thr47 side chain of the apo structure is shown (C_{Protein} yellow). The hydrophobic contact surface interacting with the ligand is increased for the complex with **1** by inducing altered orientations of Thr47, His73 and Asn70. Differences to the complex with **2** are highlighted by black arrows. Gln107 is pushed backwards by ligand **1** leading to a shift of the adjacent helical structure. The orientation of Thr47 in structure **1** also differs from the apo-structure (yellow).

The cocrystal structure with **7** could be obtained at 1.59 Å resolution (Figure 2.6a). The cell parameters deviate in cell axis *a* about 6 Å and in the monoclinic β angle by ca. 2° from the value usually observed for TGT crystals in space group *C2* (see Appendix). A similar shift has already been reported for the TGT(Lys52Met) mutant showing disorder in the $\alpha 1/\beta 1\alpha 1$ helix-loop region [Ritschel, Atmanene et al., 2009]. After refinement of the protein portion, the $|F_o|-|F_c|$ difference electron density map clearly indicates the tricyclic scaffold and major parts of the C(4)-substituent. However, the terminal, ethyne-linked pyridyl moiety is – even at lower contour level – not detectable in the difference map. We therefore assumed either high residual mobility or pronounced scatter over multiple configurations. The central cyclohexyl ring of the C(4)-substituent adopts a chair conformation with the ethyne attached in equatorial position. Regarding the B-values of the ligand atoms, the cyclohexyl ethyne portion refines to nearly two-fold larger values compared to the remaining part of the ligand. This indicates enhanced flexibility of the C(4)-substituent with increasing distance from the parent scaffold (Figure 2.6a). This finding appears reasonable taking into account that the C(4)-side chain of **7** induces massive conformational changes within the ribose-34 pocket, of the helix $\alpha 1$ and of the preceding $\beta 1\alpha 1$ -loop located below. In this region, no clearly defined electron density can be assigned to the 16 residues which form helix $\alpha 1$ (Lys55–Gly63) and the $\beta 1\alpha 1$ -loop (Ala48–Leu54).

Enhanced flexibility or scatter over multiple conformations is assumed and none of the directed interactions between the two monomers (Ala48···His333', Ala49···Tyr330', Lys52···Glu339', Lys55···Glu348', Glu57···Lys325') are visible. Interestingly, the residues residing on the corresponding dimer mate, except Lys325' and Glu348', are all well defined (Figure 2.6a). The integrity of the helix-turn-helix motif on the contacting monomer is not affected if the geometry on the interacting dimer mate is dissolved. Particularly Glu339', which is located in direct adjacency to the ligand's C(4)-side chain, is only slightly affected as indicated by somewhat increased B-values of the carboxylate oxygen atoms ($B_{OE1} = 51 \text{ \AA}^2$, $B_{OE2} = 35 \text{ \AA}^2$). The side chain of the neighboring Ile340' is not detectable in the electron density. Apparently, this is the only impact on the dimer mate directly induced by the ligand. The hydrophobic contact area between the aromatic triad (Trp326', Tyr330', His333') and Leu74, Pro78, Phe92, and Met93 is not affected by the ligand (Figure 2.7).

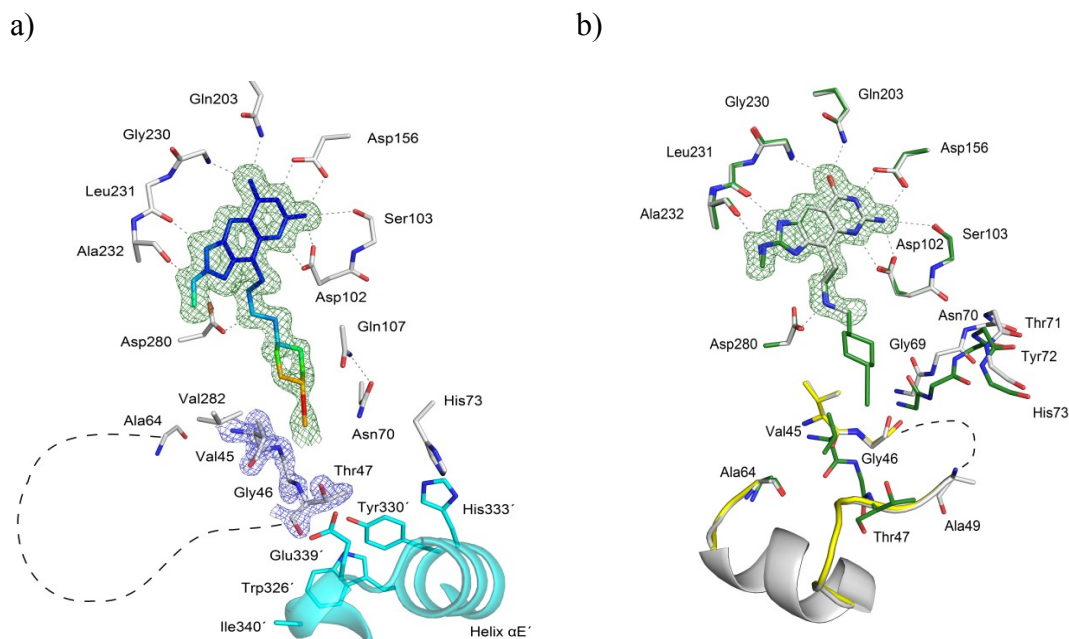


Figure 2.6 a.) Cocystal structure of **7** bound in the active site of TGT (PDB ID: 4FR6). The displayed ligand parts are well-defined by the difference electron density at 2σ and are coloured with respect to their B-values from blue (low B-values) to red (high B-values). The average B-factors indicate an increased flexibility of the cyclohexyl-ethinyl moiety compared to the rest of the visible portion of the ligand ($B_{\text{cyclohexyl-ethinyl}} = 28 \text{ \AA}^2$, $B_{\text{ligand}} = 16 \text{ \AA}^2$). Observed hydrogen bond distances are between 2.6–3.7 Å. The ligand induces conformational changes within the helix $\alpha 1$ and the $\beta 1\alpha 1$ -loop. Val45, Gly46 and Thr47 are pushed aside by the ligand ($3|F_o|-2|F_c|$ electron density map is shown at 1.5σ as blue mesh). The adjacent part of the $\beta 1\alpha 1$ -loop as well as the entire helix $\alpha 1$ up to Ala64 become disordered. The disordered substructures are indicated by the black dashed line. The corresponding helix-turn-helix motif is well-defined (shown as cyan cartoon). The side chains of Ile340', Lys325', and Glu348' are disordered while Glu339', Tyr330', His333', and Trp326' are fully defined. Gln107 and Asn70 flank the ligand's cyclohexyl ring and provoke a rotation of His73 enabling it to undergo hydrophobic interactions to His333'. Val45 and Val282 form a hydrophobic contact (4.2 Å). b.) Soaking structure of **7** (C and cartoon gray, PDB ID: 4FSA) aligned with the cocystal structure of **7** (C green) and the apo structure (C and cartoon yellow, PDB ID: 1P0D [Brenk et al., 2003]). The difference electron density defines the part of the ligand in the soaking structure of **7**. The ligand's tricyclic scaffold exhibits an unchanged binding mode independent of the crystallization protocol. The side chain portion visible in the electron density of the soaked ligand is further reduced compared to that in the cocrystallized structure. The orientation of Val45 and Gly46 are somewhat related in the soaking structure of **7** and the apo structure. Except of a disorder of Thr47 and Ala48 in the soaking structure of **7** (implied by the black dashed line) the ordered arrangement of helix $\alpha 1$ and the $\beta 1\alpha 1$ -loop aligns well with that in the apo-structure (for clarity reasons shown only as cartoon). The orientations of Val45–Thr47 differ strongly in the cocystal structure of **7**, where also the adjacent $\beta 1\alpha 1$ -loop/ helix $\alpha 1$ is disordered. The orientation of Val45 in the soaking structure would clash with the conformation of the cyclohexyl moiety of **7** in the cocrystallized complex. The backbone atoms of Gly69– His73 are about 2 Å shifted between the structures of both protocols. For reasons of clarity only a section of the binding pocket is aligned with the apo-structure. For the apo structure, side chains of Gly69–His73, Thr47, and Ala48 are not shown as they are well defined.

No water molecules are detectable within the hydrophobic interface. The $3|F_o|-2|F_c|$ electron density map explicitly reveals Val45, Gly46, and Thr47 at the beginning of the $\beta 1\alpha 1$ -loop (Figure 2.6a). These three residues appear in altered conformation compared to the apo structure and the transition is most likely caused by a too close contact

between the cyclohexyl moiety of **7** and the side chain of Val45 (Figure 2.6b). In this novel orientation, Val45 undergoes hydrophobic interactions to Val282 (Figure 2.6a). The side chains of Asn70 and Gln107 flank the ligand's cyclohexyl ring. Most likely induced by the reorientation of Gln107, His73 is rotated downwards and undergoes a hydrophobic interaction to His333'. Furthermore, compound **7** induces conformational changes of the residues Gly69–His73. The backbone atoms are shifted about 2 Å in space thereby slightly enlarging the ribose-34 pocket (Figure 2.6b). The above mentioned *a*-cell axis reduction corresponds to a movement of the dimer mate into the emerging space resulting from the structural collapse of the $\beta 1\alpha 1$ -loop (Figure 2.8a). This occurs without any structural impact on the integrity of the helix-turn-helix motif residing on the shifted dimer mate.

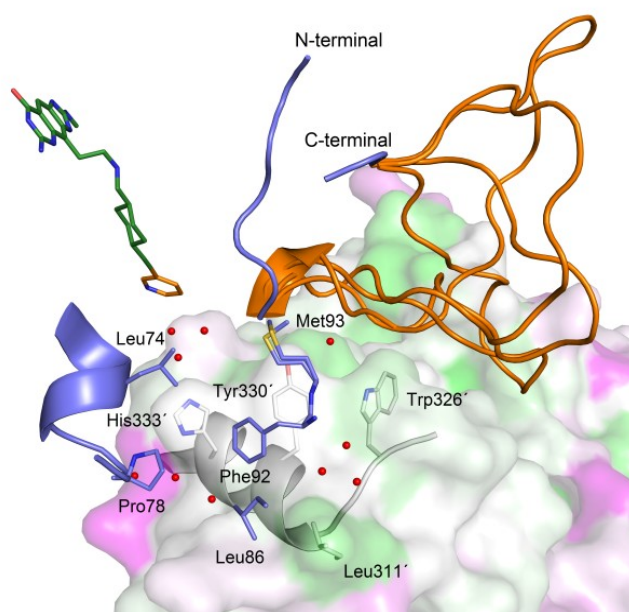


Figure 2.7 Hydrophobic contact area across the TGT dimer interface of the cocrystal structure of **7** (PDB ID: 4FR6) with several model-built conformations for the crystallographically invisible residues of helix $\alpha 1/\beta 1\alpha 1$ -loop motif (Ala48 - Gly63). Furthermore, the geometry of the model-built pyridyl moiety attached to ligand **7** is shown. Colour coding: $C_{\text{monomer A}}$ and cartoon blue, S yellow, $C_{\text{monomer B}}$ and cartoon gray; C_{modeled} and modeled cartoon: orange. Waters are shown as red spheres. Surface of monomer B is coloured according to a normalized consensus hydrophobicity scale [Eisenberg et al., 1984] from maximal hydrophobicity (green) to maximal hydrophilicity (pink). Trp326' and Tyr330' of the dimer mate are well-covered by the only slightly scattered N-terminal part of the modeled loops whereas His333' remains rather solvent-accessible. The C-terminal, solvent exposed part of the modeled loops scatter conformationally rather strongly. The aromatic triad (Trp326', Tyr330' and His333') forms hydrophobic contacts across the interface with the well-defined residues of monomer A (Leu74, Pro78, Phe92, Met93; blue). In addition Leu86 undergoes hydrophobic interactions with Leu311'. All hydrophobic contacts are between 3.9–4.6 Å. No waters are observed within this hydrophobic contact area. The shortest distance between the residues of the aromatic triad and those of modeled loops are ca. 4 Å for Trp326', ca. 5 Å for Tyr330' and ca. 6 Å for His333'.

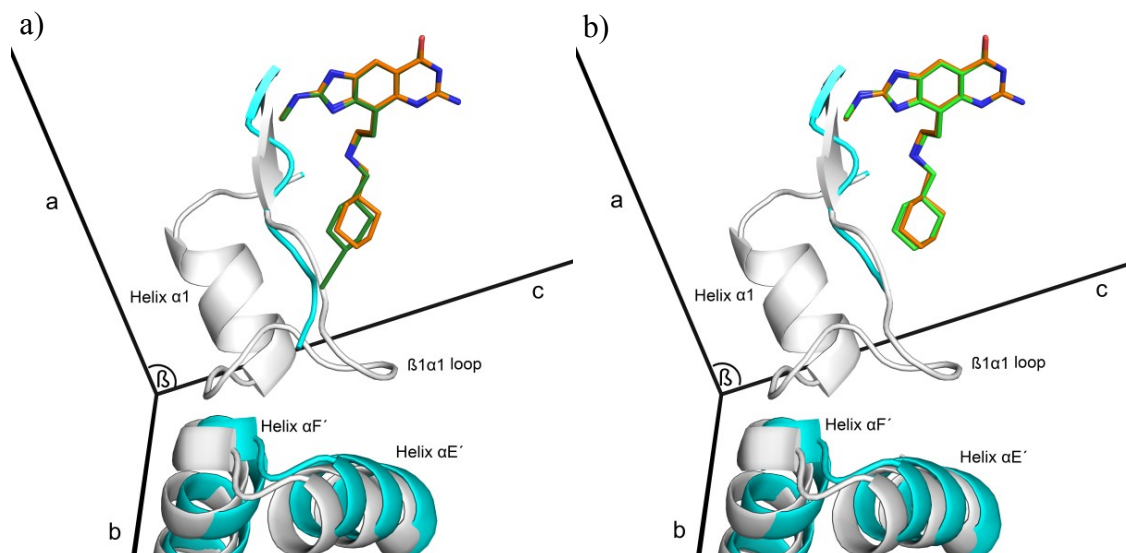


Figure 2.8 Cocystal- structures of a) ligand **7** (PDB-ID:4FR6) and b) ligand **12** (PDB-ID:4FR1) exhibit a shift of the helix $\alpha F'$ - turn - helix $\alpha E'$ motif towards the $\beta 1\alpha 1$ -loop compared to the superimposed cocystal-structure of ligand **2** (PDB-ID: 3EOS), reflected in a shortened cell axis a (ca. 5Å) and a decreased cell angle β (ca. 2°). Color code: Cartoon_{Protein} 3EOS gray, C_{Ligand 2} orange, Cartoon_{Protein} 4FR6 and 4FR1 cyan, C_{Ligand 7} and Ligand 12 green. Ligands are shown as sticks. Protein is shown as cartoon. Cell axes are shown as black lines.

A further structure with **7** could be obtained by soaking the ligand into the protein crystal instead of cocrystallization. A comparison with the above presented cocystal structure reveals significant differences (Figure 2.6b). The cell dimensions of the soaked structure do not deviate from the values usually found (see Appendix). In the $|F_o| - |F_c|$ electron density map a still smaller portion of the C(4)-substituent of the soaked ligand **7** is visible. The cyclohexyl ring and the ethyne-linked pyridyl moiety are, even at lower contour level, not detectable in the difference map. In contrast to the cocystal structure, helix $\alpha 1$ and the adjacent $\beta 1\alpha 1$ -loop are almost completely defined, only Thr47 and Ala48 lack clearly visible electron density. The alignment of the soaked structure of **7** with the apo structure (PDB ID: 1P0D [Brenk et al., 2003]) demonstrates that independent of the penetrating ligand the helix $\alpha 1$ / $\beta 1\alpha 1$ -loop motif adopts an unchanged orientation. The conformation of Val45 is clearly defined in the soaked structure and fully agrees with that in the apo structure. Nevertheless, it is incompatible with the placement of the ligand's cyclohexyl ring in the cocystal structure. If the latter geometry would also be given in the soaked structure, a too close contact between the ligand's cyclohexyl moiety and the side chain of Val45 (2.8 Å) would be created, thus an altered conformation for Val45 is enforced and the enhanced disorder of the

C(4)-side chain in the soaked structure becomes obvious (Figure 2.6b). Furthermore, the soaked structure lacks well-defined electron density for the residues Gln107–Ser112, which are visible in the density of the cocrystal structure (not shown in Figure 2.6). Most likely this is also a consequence of the increased disorder of the ligand's C(4)-side chain. Altogether, the impact of the bound ligand **7** on the protein structure differs whether the complex is formed in solution and then crystallized or whether the ligand penetrates subsequently in pre-packed crystals in the solid state.

A dataset with 1.74 Å resolution collected with the cocrystallized ligand **12** also revealed well-defined electron density for the tricyclic scaffold and the C(4)-substituted ethylamine linker (Figure 2.9).

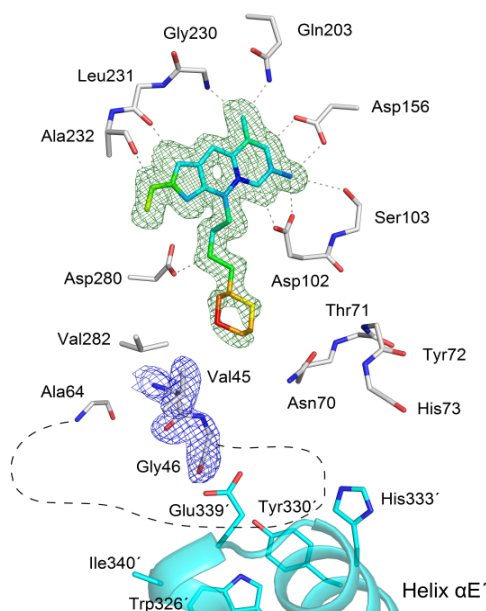


Figure 2.9 Cocrystal structure of **12** bound in the active site of TGT (PDB ID: 4FR1). The displayed ligand parts are well-defined by the difference electron density and are coloured with respect to their B-values from blue (low B-values) to red (high B-values). The average B-factors indicate an increasing flexibility of the cyclohexyl ring compared to the other ligand portions ($B_{\text{cyclohexyl}} = 28 \text{ \AA}^2$, $B_{\text{ligand}} = 17 \text{ \AA}^2$). The ligand induces conformational changes within the helix $\alpha 1$ and the $\beta 1\alpha 1$ -loop, and Val45 and Gly46 are pushed aside ($3|F_o| - 2|F_c|$ electron density map is shown at 1.5σ as blue mesh). The following part of the $\beta 1\alpha 1$ -loop and the entire helix $\alpha 1$ are up to Ala64 disordered (indicated by the black dashed line). The helix-turn-helix motif on the corresponding dimer mate is well-defined (shown as cyan cartoon). The side chain of Ile340' is disordered whereas Glu339', Tyr330', His333' and Trp326' are fully defined. The side chain of His73 is disordered.

The electron density reflecting the cyclohexyl ring within the C(4)-side chain is slightly reduced but indicates chair conformation. No clear difference electron density is visible

for the terminal ethyne-linked biphenyl moiety. Analogous to the cocrystallized ligand **7**, the averaged B-factors of the cyclohexyl ring are nearly two-fold enhanced compared to the averaged values of the remaining ligand atoms. This indicates an increased residual mobility or scatter of this molecular portion and is consistent with the reduced electron density and the below presented structural effects. Also the altered cell dimensions concerning the α -axis and β -angle are observed (see Appendix). This is reflected by the disorder of helix $\alpha 1$ and the adjacent $\beta 1\alpha 1$ -loop induced upon binding of **12**. Clearly defined electron density is missing for 17 residues (Thr47–Gly63). The preceding Val45 and Gly46 are well visible analogous to the cocrystal structure of **7** with Val45 forming a hydrophobic contact to Val282. The side chains of Gln107 and His73 are disordered while Asn70 orientates similar as in the cocrystal structure of **7** (Figure 2.10). The above described expansion of the ribose-34 pocket by the backbone shift of residues Gly69–His73 occurs also in the cocrystal structure of **12** (Figure 2.10).

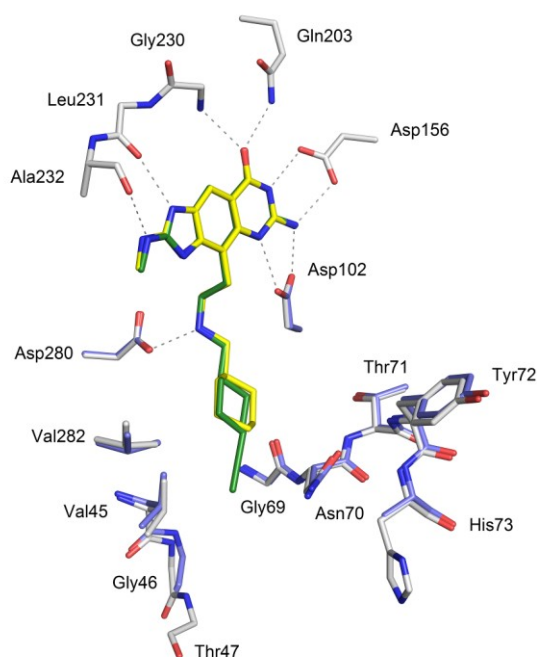


Figure 2.10 Alignment of the cocrystal structures of **12** (PDB ID: 4FR1) and **7** (PDB ID: 4FR6). Color code: $C_{\text{Ligand } 12}$ yellow, $C_{\text{Ligand } 7}$ green, $C_{\text{Protein } 4FR1}$ blue, $C_{\text{Protein } 4FR6}$ grey. The tricyclic scaffold of both ligands aligns in perfect agreement and forms numerous hydrogen bonds to the protein (2.6–3.0 Å). Val45 and Gly46 align in good agreement, whereas Thr47 is disordered in the cocrystal structure with **12**. Val45 forms a hydrophobic contact to Val282. In both structures, Gly69–His73 adopt similar orientations. The side chain of His73 is disordered in the cocrystal structure with **12**.

The helix-turn-helix motif of the contacting monomer mate slightly moves along the cell axis a , but geometrically it is not significantly affected concerning helix integrity (Figure 2.8b). Whereas the side chain of Ile340' is again disordered, Glu339' remains at the apex of the helix-turn-helix motif with slightly increased B-values of the carboxylate oxygen atoms ($B_{OE1} = 51 \text{ \AA}^2$, $B_{OE2} = 35 \text{ \AA}^2$, Figure 2.9). The side chains of His333', Tyr330', and Lys325' are not affected by the structural dissolution of the corresponding $\beta 1\alpha 1$ -loop and Trp326' also remains in position. In analogy to the cocrystal structure of **7**, the hydrophobic contact area between Trp326', Tyr330', and His333' on the one side and Leu74, Pro78, Phe92, and Met93 on the other side is not affected by the ligand (Figure 2.11). No water molecules are detectable within the hydrophobic interface.

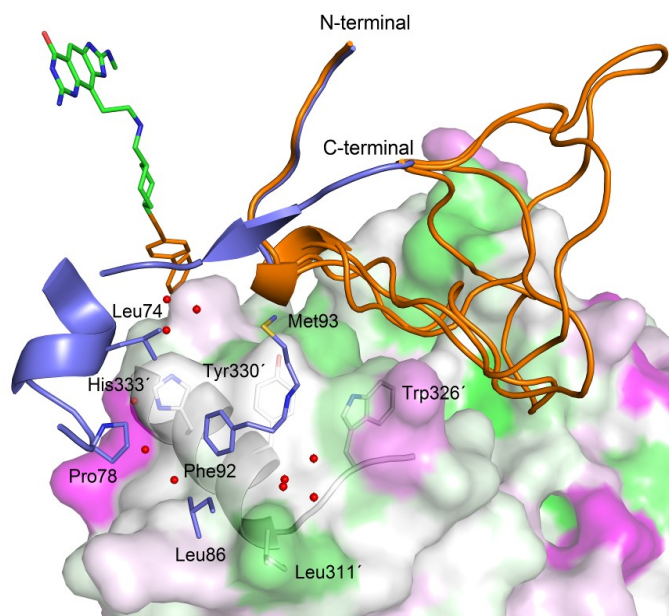


Figure 2.11 Hydrophobic contact area within the TGT dimer interface of the cocrystal structure of **12** (PDB ID: 4FR1) with superimposed modeled conformations for the crystallographically disordered residues of helix $\alpha 1/\beta 1\alpha 1$ -loop (Thr47 - Gly63) and the modeled biphenylethynyl moiety of ligand **12**. Colour code: $C_{\text{monomer A}}$ and cartoon blue, S yellow, $C_{\text{monomer B}}$ and cartoon gray. C_{modeled} and modeled cartoon: orange. Waters are shown as red spheres. Surface of monomer B is colored based on a normalized consensus hydrophobicity scale [Eisenberg et al., 1984] from maximal hydrophobicity (green) to maximal hydrophilicity (pink). Trp326' and Tyr330' are well-covered by the minimally scattered N-terminal part of the modeled loop whereas His333' is relatively solvent-accessible. The C-terminal, solvent exposed part of the modeled loops is conformationally diverse. The aromatic triade (Trp326', Tyr330', and His333') forms a hydrophobic interface with the well-defined residues of monomer A (Leu74, Pro78, Phe92, Met93). Leu86 undergoes hydrophobic interactions to Leu311'. All hydrophobic contacts are between 3.9 \AA and 4.6 \AA . No waters are observable within the hydrophobic contact area. The distances between the aromatic triade and the modelled loops are ca. 4 \AA for Trp326', 5 \AA for Tyr330', and 6 \AA for His333'.

Also datasets with cocrystallized ligands **3**, **4**, **8** - **11** have been collected in due course of this study. They revealed similar ligand-induced effects on the dimer interface without providing any further insights into the ligand side chain conformations and therefore, will not be discussed further.

2.4.5 Mass spectrometry

Noncovalent ESI mass spectrometry enables accurate mass determination by maintaining noncovalently composed assemblies such as protein oligomers or protein–ligand complexes in the gas phase. In this study an automated chip-based nanoelectrospray mass spectrometry (nanoESI-MS) was applied to analyze the influence of the crystallographically studied ligands on the oligomerization state of TGT (Figure 2.12).

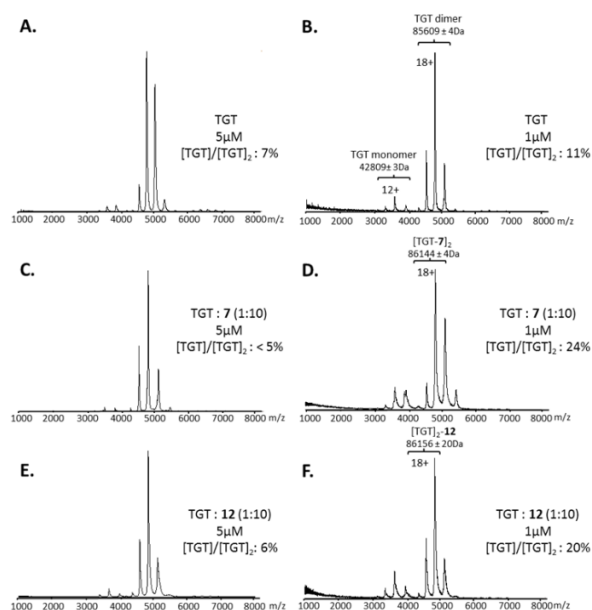


Figure 2.12 ESI mass spectrometry analysis of TGT wild type (A, B) and incubated with ligand **7** (C, D) or **12** (E, F). TGT was analyzed either at 5 μ M (A, C, E) or at 1 μ M (B, D, F) in ammonium acetate (1 M, pH 7.5). The monomer/dimer ratio was calculated after integrating over all charged states intensities of each species.

Experiments were performed at different protein concentrations (5 and 1 μ M, calculated as TGT monomer). Studies of the non-complexed wild-type protein exhibit a mass

which can be assigned to a dimer with one Zn^{2+} bound per monomer in agreement with previous studies [Ritschel, Atmanene et al., 2009]. The measured mass of 85608.9 ± 3.7 Da is in good agreement with the expected mass of 85607 Da and no significant concentration dependency of the monomer/dimer ratio can be observed (Figure 2.12 A, B). The influence of ligand binding of **12** and **7** was analyzed by preincubating TGT with a ten-fold molar excess of the ligand. Both ligands show no significant effect on the monomer/dimer ratio at $5\mu\text{M}$ TGT concentration (Figure 2.12 C, E). In contrast, both ligands are able to shift the ratio slightly towards the monomer applying lower protein concentrations (Figure 2.12 D, F). Ligand **12** induces a monomer portion of 20% while ligand **7** induces 24% monomer. Experiments beyond $1\mu\text{M}$ TGT concentration drastically reduced spectra quality and affect mass precision measurements. This concentration dependent ratio shift has already been reported for the TGT(Lys52Met) mutant [Ritschel, Atmanene et al., 2009]. The concentration dependency underlines that ligand **7** and **12** cause a destabilization of the TGT homodimer without complete disruption to fully separated monomers. Regarding the binding stoichiometries, **7** binds predominantly in 2:2 ratio to the TGT dimer. No fully uncomplexed TGT dimer is detectable and only traces of a TGT dimer:ligand complex with just one ligand molecule bound. The complex spectra with ligand **12** exhibit apart from uncomplexed TGT dimer signals for a 2:1 TGT dimer:ligand complex and only traces of a 2:2 TGT dimer:ligand complex, which agrees with the higher K_d -value of **12** compared to **7** (Table 2.1).

2.4.6 Modeling and MD-simulation

Based on the cocrystal structures with **7** and **12**, computer simulations were performed using the TGT dimer to complement the reported crystallographic findings and to support their interpretation. One important aspect was to screen for a set of alternative conformations of the helix $\alpha 1/\beta 1\alpha 1$ -loop segment which was evidenced by crystallography to be either highly mobile or scattered over multiple arrangements. The other issue was the suggestion of possible conformations for the ligand side chain portions of **7** and **12** that are not visible in the cocrystallized complexes. For the identification of alternative loop conformations, several configurations for the residue sequence under consideration were modeled based on the cocrystal structure of **7** (Figure 2.7). Subsequently, the construction of the initially modeled loops was

subjected to molecular dynamic simulations. The residues Ala48–Gly63, which are disordered in the crystal structure, were allowed for flexibility whereas the adjacent, crystallographically ordered residues were fixed (for details see Experimental section). During the MD simulation, the terminal pyridyl moiety of **7**, which was not visible in the crystallographically determined electron density, was modeled, and an approximate position was assumed by attaching this portion to the ethyne linker seen in the crystal structure (Figure 2.6a). Putative start structures for the conformation of the Ala48–Gly63 loop were generated using the modeling protocol of ModLoop. The protocol starts with initial random conformations, generates a number of independently optimized conformations and finally reports the one with the lowest pseudo-energy score [Fiser et al., 2003]. Each loop conformation presented in this work was generated applying this protocol.

After residue 51, the loop spreads out in space adopting a large variety of conformations (Figure 2.7). This rather unrestricted movement appears reasonable taking into account that this portion protrudes directly into the solvent. The first three residues 48–50 of the modeled loop remain spatially much more restricted and in contact with other residues of the adjacent protein which is indicated by the reduced fanning out in space. Notably, this minor spatial mobility of Ala48–Val51 results in a temporally rather stable arrangement and the subjacent hydrophobic triad of Trp326', Tyr330', and His333' to the mate in the dimer interface remains covered by Ala48–Val51. Trp326' forms close contacts to the loop in all conformations (ca. 4 Å) and even Tyr330' remains in about 5 Å distance.

The terminal pyridyl moiety of **7** and the biphenylethynyl portion of ligand **12** are not visible in the cocrystal structures (Figures 2.6a and 2.9). On the other hand, binding of both ligands does not perturb the spatial position of the targeted Glu339'. We model-built several conformations of the disordered substituents which are conform with the observed sterically restricted positions of the side chain of Glu339' (Figure 2.13). The generated orientations were validated with respect to allowed torsion angle ranges, consulting small molecule crystal structures in the CSD exhibiting similar structural elements (for details see Experimental section). In none of the simulated conformations **7** exhibited an ideally linear ethyne bridge, which is assumed to be energetically optimal (Figure 2.13a) [Atkins et al., 2003]. Steric interference with Glu339' forces the ethyne bridge to deviate significantly from linearity (157-169°). Nevertheless, such most likely

energetically less-favorable arrangements have been reported for several entries in the CSD (Figure 2.14). For the biphenylethynyl moiety of **12**, three possible conformations were produced (Figure 2.13b). They exhibit torsion angles between the two phenyl rings in a favorable range. The angle of the ethyne bridge is geometrically further declined to 156–161°, which still agrees with deviations also observed in small molecule crystal structures (Figure 2.14).

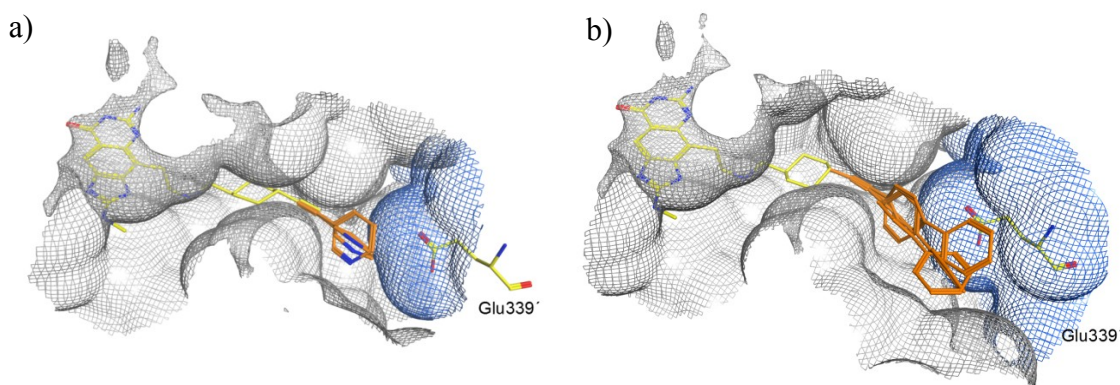


Figure 2.13 Modeled side chain conformations based on the corresponding cocrystal structures. Colour coding: $C_{\text{Crystal structure}}$ yellow, C_{Modeling} orange, $\text{Surface}_{\text{Monomer A}}$ gray, $\text{Surface}_{\text{Monomer B}}$ blue. The depicted surface corresponds to the Lee-Richards molecular surface [Lee et al., 1971]. For both ligands the calculated side chain conformations require a kinked geometry of the ethynyl bridge due to the sterical conflicts experienced with Glu339'. The modeled loop conformations were considered in the crystal structures. a.) Orientation of the modeled pyridyl moiety superimposed to the cocrystal structure of **7** (PDB ID: 4FR6). b.) Modeled biphenylethynyl moiety superimposed to the cocrystal structure of **12** (PDB ID: 4FR1).

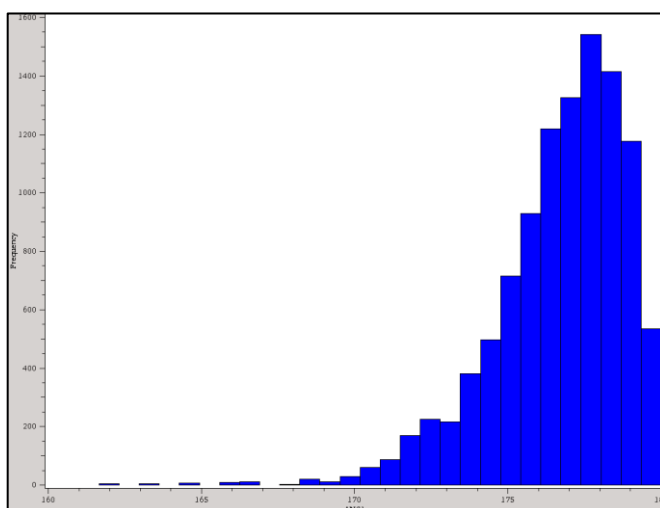


Figure 2.14 Results of a CSD database search for entries containing acyclic ethyne functionalities. Organometallic structures, structures with ions and powder structures were ignored. The angles are plotted against the frequency of occurrence.

2.5 Discussion

The potentially high importance of helix $\alpha 1$ and the preceding $\beta 1\alpha 1$ -loop has been assessed with respect to TGT dimer interface stability [Stengl et al., 2007; Ritschel, Atmanene et al., 2009; Ritschel, Kohler et al., 2009]. The rationale to investigate particularly this structural building block was based on the analysis of multiple crystal structures which show this structural portion to be highly conserved, however, strongly involved in almost all directed interactions between the two monomers. Chako et al. strikingly demonstrated the importance of solely one directed interaction within the 51 residue-membered heterodimer interface between the Fab HyHEL-5 and chicken lysozyme with respect to stability. A conservative exchange of Arg by Lys caused disruption of the dimer interface presumably triggered by change in hydrogen-bonding pattern [Chako et al., 1995]. The crystallographic finding next to **7** strongly suggests the structural importance of the helix $\alpha 1$ / $\beta 1\alpha 1$ -loop motif for the stabilization of the dimer interface. The impact of **7** on the protein structure depends on the way the complex with TGT was formed and crystallized. If **7** is bound to the protein prior to crystallization (cocrystallization), it will obviously induce disorder of the helix $\alpha 1$ / $\beta 1\alpha 1$ -loop motif and the complex will crystallize with this disorder also present in the solid phase. In contrast, if the uncomplexed protein is crystallized, the helix $\alpha 1$ / $\beta 1\alpha 1$ -loop region will arrange unperturbed in the formed crystals and its geometry will hardly be affected by the bound ligand upon soaking. Instead, the ligand has to adopt to the geometry of the fixed loop in the crystal. It is difficult to estimate whether the helix $\alpha 1$ / $\beta 1\alpha 1$ -loop segment is disordered in solution or whether it only scatters over multiple conformations once the ligand is bound. At least we can conclude that in solid state the loop adopts an ordered geometry and with bound ligand in solution a disordered state is copied across into the crystal. In any case, ordered and disordered state must be energetically close as the ligands **7-13** hardly show any loss in binding affinity compared to the analogs with much shorter C(4)-substituents. Nevertheless, the observed enhanced flexibility for the helix $\alpha 1$ / $\beta 1\alpha 1$ -loop speaks against a determining importance of the directed interactions across the TGT dimer interface as several of the involved amino acids are associated with this motif. The mass spectrometric analysis clearly revealed that structural interference of **7** and **12** with the interface region results in a destabilization of the TGT homodimer (Figure 2.12). The ligand-induced, concentration dependent impact on the monomer/dimer equilibrium is comparable to

that of the Lys52Met interface mutation [Ritschel, Atmanene et al., 2009]. Obviously, the helix $\alpha 1/\beta 1\alpha 1$ -loop takes the role of a kind of switch in the protein-protein interface formation, however, it is of minor importance with respect to directed interactions between both monomers. However, what else might take determining influence on the dimer formation? Detailed analysis of the crystal structures revealed that the $\beta 1\alpha 1$ -loop covers in a lid-like fashion a hydrophobic contact region formed by a triad of three residues. This aromatic triad residing on the amphipathic helix αE is supposedly a putative interaction hot spot on the TGT dimer interface (Figure 2.4), as a comparable arrangement has been observed by Kussie et al. for the interaction of p53 and MDM2 [Kussie et al., 1996]. In this example, a similar hydrophobic triad (Phe, Trp, Leu), hosted on an amphiphilic α -helix of p53 and solely undergoing van der Waals interactions to a hydrophobic cleft of MDM2, has been demonstrated to be the hot spot of the protein-protein interaction (PPI). Furthermore, numerous studies elucidated enhanced occurrence of tryptophane and tyrosine within PPI-hot spots [Clackson et al., 1995; Bogan et al., 1998; Moreira et al., 2007]. Our previously reported destabilization of the TGT dimer resulting from the rather conservative Tyr330Phe point mutation suggests that the formed hydrophobic contact area is important for the dimer stability [Ritschel, Atmanene et al., 2009]. This idea is supported by some characteristics of the helix $\alpha 1/\beta 1\alpha 1$ -loop. Tyr330 acts as a hydrogen-bond donor in the interface, however its phenolic OH-function in the aromatic triad might also prevent penetration of water molecules into the hydrophobic contact region. Furthermore, even though **7** and **12** perturb the interface, the arrangement of the hydrophobic triad remains unaffected (Figure 2.7, Figure 2.11). This is also supported by the mass spectrometric analysis which reveals a predominantly dimeric TGT with bound **7** and **12**. This fact underlines the hypothesis that the hydrophobic cluster of aromatic amino acids displays the hot spot of the dimer formation. As this hot spot is hardly affected by our bound spiking ligands only minor destabilization is induced.

Beside the perturbation of the $\beta 1\alpha 1$ -loop, ligands **9-13** have been designed to interfere with the contact formed to Glu339'. The cocrystal structures of **7** and **12** show Glu339' with well-defined geometry at the apex of the helix-turn-helix motif whereas the spiking ligand side chains are – to different extent – disordered (Figure 2.6a and 2.9). Obviously neither the position of this glutamate nor the geometry of the adjacent helices are affected. Nevertheless, a ligand-induced collapse of an α -helix followed by a subsequent

dimer dissociation has already been reported by McMillan et al. for the iNOS oxygenase homodimer interface [McMillan et al., 2000].

To suggest putative geometries of the crystallographically undefined ligand side chain portions, we had to model-build energetically most-likely less favorable arrangements with bent ethinyl linker not in conflict with the orientation of Glu339' (Figure 2.13). We therefore conclude that the orientation of Glu339 must be significantly stabilized by the local protein architecture.

Based on the analysis of the TGT₂₀ dataset the following consideration can be given. Glu339 is part of the turn, linking helix α E and helix α F. The relative orientation of both helices is stabilized by hydrophobic interactions (Figure 2.15a).

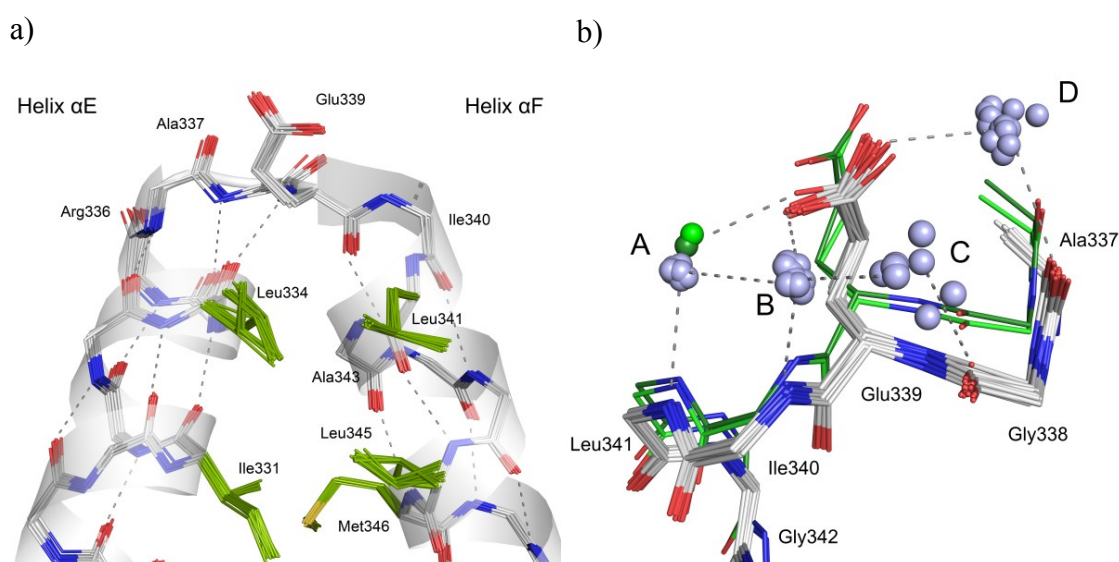


Figure 2.15 Helix-turn-helix motif and interstitial water molecules as found in the TGT₂₀ reference set of *Z.mobilis* TGT crystal structures (for PDB ID see Experimental section). a.) The backbone conformations of the helix-turn-helix motif align with good agreement. The turn motif is formed by Ala337, Gly338 and Glu339. The C-terminus of helix α E precedes the turn whereas the N-terminus of helix α F follows. The secondary structures are superimposed as transparent cartoon. For reasons of clarity, side chains are only shown for the residues involved in hydrophobic interactions (corresponding carbon atoms in green) and for Glu339. Hydrophobic contacts between helix α E (Ile331, Leu334) and helix α F (Leu341, Leu345, Met346) fall between 3.5-4.3 Å, displayed hydrogen bonds are between 2.7-3.7 Å. b.) Conserved water positions (A-D) as found in the TGT₂₀ reference set superimposed with cocystal structures of **7** and **12** (PDB ID: 4FR6, 4FR1). Colour coding: C_{TGT20} gray, waters of TGT₂₀ shown as light-blue spheres, C_{Cocystal structures 7 and 12} green, waters of cocystal structures **7** and **12** shown as green spheres. For reasons of clarity only the side chain of Glu339 is displayed. Water molecules form a hydrogen bond network between the Glu339-side chain and the backbone atoms of the adjacent residues. In the cocystal structures with **7** and **12** the network is reduced to solely water A mediating a contact between Leu341 and Glu339, whereas the other water molecules are repelled from these complexes.

Mutually intertwined, Leu334 interacts with Leu341 and Leu345, and Ile331 forms a close van der Waals contact to Met346. This arrangement reminds to some degree of a leucine zipper motif used as motif stabilizing the helix-turn-helix structures of DNA binding proteins [Landschulz et al., 1988]. The running directions of both helices are opposed. Whereas helix α E faces the dimer interface with its C-terminus, helix α F orients its N-terminus into this direction.

Wada and Hol suggested the description of α -helices as macro dipoles resulting from multiple parallel-oriented peptide bonds and leading to a more positive dipole end at the N-terminus and a more negative end at the C-terminus [Wada, 1976; Hol, 1985]. Following this concept, Glu339 takes a dual function as a capping residue. With respect to helix α E, the backbone NH of Glu339 forms a hydrogen bond to the otherwise unsaturated backbone C=O of Leu334 (2.7 Å). In contrast, the C=O functionalities of Arg336 and Ala337 are not saturated by any binding partners of the protein. The side chain of Glu339 is oriented towards the apex of helix α F. This agrees with a study of Forsyth et al. where a significantly higher population of negatively charged residues such as Asp and Glu has been observed at N-termini of α -helices [Forsyth et al., 2002]. Furthermore, it has been reported that Asp and Glu experience a pK_a -shift of ca. 0.6 units towards stronger acidity next to helical N-terminal positions which is caused by a stronger polarization of the acidic group [Porter et al., 2006]. Supposedly, their placement to the terminal end ("capping position") of the helix results in a stabilization of the helical arrangement. Strong direct H-bond interactions of the Glu339 carboxylate side chain formed to the uncomplexed terminal N-H backbone groups of helix α F seem to be lacking. The N-H function of Ile340 is in a distance suggesting a weak hydrogen bond (3.7 Å) but formed via an unfavorable angle. The distance between the Leu341 N-H and the Glu339 carboxylate groups is, even for a weak hydrogen bond, too long (4.8 Å). The only direct interaction Glu339 C=O forms to helix α F is the weak hydrogen bond to the backbone N-H of Ala343 (3.7 Å). Accordingly, the question remains whether any other contacts contribute to the stable orientation of this residue.

The analysis of water molecules found in the TGT₂₀ reference set indicates that the Glu339 side chain is stabilized by water molecules as binding partners. The upper part of the helix-turn-helix motif is solvated by four water molecules, which are conserved to different extent in the TGT₂₀ datasets (Figure 2.15b). The water molecules in clusters

A and B exhibit highest crystallographic conservation as they are present in all analyzed structures with minimal positional deviations. The spatial position of water C is more scattered and is only in 45% of all structures populated. Water D is present in 75% of all structures and exhibits a small positional variance. Waters A and B are involved in the capping of helix α F, whereas water A forms hydrogen bonds to the backbone N-H of Leu341 (2.9 Å), the carboxylate of Glu339 (2.7 Å) and water B (3.5 Å). Water B is involved in hydrogen-bonding to the backbone N-H of Ile340 (2.8 Å), the carboxylate of Glu339 (2.6 Å) and water C (2.6 Å). Whereas water C interacts with the backbone C=O of Gly338 (3.8 Å), water D is involved in the capping of helix α E forming hydrogen bonds to the backbone C=O of Ala337 (3.0 Å) and the carboxylate of Glu339 (2.8 Å). In summary, the highly conserved water network presumably stabilizes at the capping positions the parallel arrangement of the two helices and favors the conserved placement of Glu339. In light of the most likely more acidic properties of Glu339 at the capping position of the N-terminus of helix α F, this residue can be assumed as deprotonated. Thus, the described hydrogen bonds have to be considered as charge-assisted and in consequence of increased stability. The cocrystal structures with **7** and **12** reveal a reduced hydrogen-bonding network where waters B, C and D are no longer well-defined in the electron density. Water A still mediates a contact between the backbone N-H of Leu341 and the carboxylate of Glu339. This placement can be assumed as crucial for the spatial stabilization of the Glu339 side chain which remains virtually unperturbed upon the interference of the spiking ligands (Figure 2.13).

2.6 Conclusion and Outlook

The detailed analysis of numerous crystal structures of TGT revealed potential hot spots of interactions within the TGT dimer interface. A helix-loop-substructure involving three salt bridges and two hydrogen bonds to the corresponding mate in the dimer and a hydrophobic contact region containing a triad of aromatic residues have been identified as crucial for the interface formation. Ligands **1**, **3**, **4** target solely the helix-loop-substructure. Despite the absence of any structural impact on the dimer interface, the spatially demanding ligand **1** exhibits a surprisingly high binding affinity which is most likely related to an increasing hydrophobic contact formed between the surfaces of the ribose-34 pocket and the adamantyl moiety of the ligand.

Ligands **7-13** were designed to directly perturb the helix-loop-substructure and to interfere this way with Glu339' and the adjacent contact area. The extensively studied spiking ligands **7** and **12** influence the targeted helix-loop substructure in the determined cocrystal structures. For the first time noncovalent mass spectrometry verifies a ligand-induced destabilization of the TGT homodimer in solution. However, full dimer disruption is not observed and surprisingly high binding affinities of the spiking ligands question the importance of the helix-loop-substructure for the dimer stability. The comparison of the cocrystal structure of **7** with an analog structure revealed by soaking confirms speculations about the structural properties of helix $\alpha 1$ and the adjacent $\beta 1\alpha 1$ -loop in solution. This substructure is most likely conformationally flexible in solution but is conveyed into a well-ordered arrangement upon crystallization of the uncomplexed protein.

High structural integrity could be shown for the helix αE -turn-helix αF motif which remains highly conserved in all analyzed crystal structures. Especially the high structural conservation of the Glu339 side chain orientation is surprising as it is obviously maintained even though the ethinyl linker has to adopt an energetically unfavorable geometry strongly deviating from linearity. Apparently a set of highly conserved water molecules – present in all analyzed crystal structures – mediates interactions between the N-terminal backbone of helix αF and the side chain of Glu339. The high stability of the helix-turn-helix motif is of special interest as the aromatic triad, participating in a hydrophobic contact area between both monomers resides in close neighborhood on helix αE . The structural integrity of most parts of this arrangement even in the complexes with **7** and **12** is most likely the reason for the residual dimer stability in presence of these two ligands. Nevertheless, a gradual ligand-induced dimer destabilization is observed which possibly results from an interference with the adjacent $\beta 1\alpha 1$ -loop. This loop not only functions as a hydrogen-bond partner but also shields the hydrophobic contact area as a kind of lid.

The presented ligand-approach helps to figure out the importance of structural motifs in the dimer interface stabilization and provides new insights to the architecture of the protein-protein interaction between the two TGT monomer units.

2.7 Experimental procedures

Z. mobilis TGT crystallization: Protein was cloned, overexpressed, and purified as described in detail elsewhere [Romier et al., 1996; Reuter et al., 1995]. Crystals of TGT suitable for data collection were obtained using the hanging-drop, vapor diffusion method at 288 K. TGT was crystallized in presence of the inhibitors. A protein solution (12 mg/mL TGT, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 15% (v/v) Me₂SO) was incubated with 1.5 mM inhibitor. 2 μ L of this solution were mixed with 2 μ L reservoir solution (100 mM MES, pH 5.5, 1 mM DTT, 10% (v/v) Me₂SO, 13% (w/v) PEG 8000). After three weeks of crystal growth, specimen reached dimensions of about 0.7 x 0.7 x 0.2 mm³. Compound **7** was additionally to cocrystallization soaked at a final concentration of 5 mM for one day into premanufactured wild type crystals.

Data collection: Crystals were transferred for 10 sec into a cryo-protectant containing buffer (50 mM MES, pH5.5, 300 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 2%(v/v) DMSO, 4% (w/v) PEG 8000, 30%(v/v) glycerol). Subsequently crystals were flash-frozen in liquid nitrogen. All datasets were collected at cryo-conditions (100 K) at BESSY-PSF Beamline 14.2 in Berlin at a wavelength of $\lambda = 0.91841$ Å. A Rayonix MX225 CCD-detector was used for data collection. TGT crystals exhibited a monoclinic space group *C2* with one monomer per asymmetric unit. Data processing and scaling was done using HKL2000. Crystal dimensions, data collection and processing statistics are given in the Appendix.

Structure determination and refinement: For all complexes the CNS program package was used to perform the initial rigid-body refinement and a cycle of conjugate gradient energy minimization, simulated annealing and B-factor refinement [Brünger et al., 1998]. The coordinates of the TGT apo structure 1P0D were used as starting model. Due to the high resolution of all data collections a further refinement using SHELXL-97 was performed [Sheldrick et al., 1997]. For each refinement step at least 20 cycles of conjugate gradient minimization were performed with default restraints on bond distances, angles and B-values. 5% of all data were used to calculate R_{free}. Intermittent model building was performed using COOT [Emsley et al., 2004]. Ligand, water and glycerol molecules were placed into the difference electron density and once assigned included in the further refinement cycles. Riding hydrogen atoms were added for the

protein in a final refinement cycle without using additional parameters. Model analysis was performed using PROCHECK [Laskowski et al., 1993].

PDB deposition: Coordinate files were deposited in the PDB with the following access ID: 4FPS, 4FR6, 4FSA, and 4FR1.

Validation datasets: A randomly selected, non-redundant set of 20 TGT structures (denoted as TGT₂₀, resolutions between 1.28–2.25 Å) was aligned based on a RMSD minimizing sequence alignment by use of the PyMOL Molecular Graphics System. Structures have been visually inspected. PDB ID of the selected datasets are: 2Z7K, 3C2Z, 3EOS, 3EOU, 3S1G, 3V0Y, 3RR4, 4FPS, 1P0D, 1Q66, 1R5Y, 1N2V, 1OZM, 1OZQ, 1PUD, 3BL3, 3BLO, 2OKO, 2PWV, and 2QII.

Microscale thermophoresis measurements: *Z. mobilis* TGT was adjusted to a concentration of 10 µM and subsequently labeled with Alexa Fluor®647 succinimidyl ester at a concentration of 40 mg·L⁻¹ at room temperature for 30 minutes. Labeling reaction was performed in a 500 mM NaCl solution buffered with 50 mM HEPES pH 8.1 (molar dye : protein ratio ≈ 3 : 1). Unreacted Alexa Fluor®647 was removed with a NAP5 sephadex column (GE Healthcare) equilibrated with 2 M NaCl, 1 mM EDTA solution buffered with 10 mM TrisHCl pH 7.8. The label: protein ratio was determined using Photometry at 650 nm and 280 nm. Here a ratio of 0.8 was typically achieved. The Alexa Fluor®647-TGT solution was adjusted to 100 nM with 100 mM HEPES pH 7.3 buffer containing 5% DMSO and 323 µM Tween 20 (Roth). The final solution contained NaCl at a concentration of 300 mM. The ligand was dissolved in the same buffer (without NaCl) at a concentration of 1.25 µM. A series of 12 1:1 dilutions of ligand solution/buffer solution was prepared producing ligand concentrations ranging from 305 pM to 1.25 µM. For thermophoresis, each of these solutions was mixed with one volume of Alexa Fluor®647-TGT solution which leads to a final concentration of fluorescence labeled TGT of 10 nM and final ligand concentrations ranging from 153 pM to 625 nM. After 10 min incubation followed by centrifugation at 10 000 × g for 10 min, ca. 2 µL of each solution were filled into Monolith NT Standard treated capillaries (NanoTemper Technologies GmbH). Thermophoresis (including temperature jump) was measured at room temperature for 10 s using a Monolith NT.015 instrument (NanoTemper Technologies GmbH). Instrument parameters were adjusted with 100 % LED power and 60 % infrared laser

power. Data of three independent measurements were averaged and analyzed using Origin 7 (Origin Lab). For curve fitting procedures see Material und Methoden section. The curves are shown in the Appendix.

Loop prediction: Several loop orientations for the missing amino acid sequence A(48)ATVKALKPETVRATG(63) were generated using the ModLoop web service [Fiser et al., 2000; Fiser et al., 2003]. For this purpose the cocrystal structure of **7** (PDB ID: 4FR6) was prepared using *fconv* [Neudert et al., 2011] and completed with the missing sequence information. A putative conformation of the undetermined pyridyl moiety of the ligand C(4)-side chain was modeled using MOE (see below). The plausibility of the modeled loop structures was validated by running short molecular dynamic simulations using Amber 12 [Case et al., 2012].

Ligand modeling: Possible conformations for missing side chain portions of ligand **7** and **12** were modeled and protonated with MOE. The ligand was stepwise assembled using the integrated molecule builder tool. In each step the modeled parts were locally minimized applying the implemented MMFF94x force field. For the modeled part of the fully assembled ligand a conformational search has been performed, combining the systematically, the stochastically, and the “LowModeMD” method. For each method the standard search parameters were used, however the option 'enforce chair conformation' was disabled.

CCDC database: The conformational search suggested multiple locally minimized conformations. To further rationalize the suggested geometries a CSD search [Allen, 2002] with respect to deviations of the ethinyl linker from linearity (for ligand **7** and **12**) and the assumed torsion angle between the rings in the biphenyl moiety (ligand **12**) was performed using ConQuest [Bruno et al., 2002] version 1.14. Organometallic complexes, structures with ions, structures determined from powder material and cyclic ethynes were ignored during the search. The hits were analyzed using Mercury [Macrae et al., 2008].

3 From *lin*-Benzoguanines to *lin*-Benzohypoxanthines as Ligands for *Z. mobilis* TGT: Replacement of Protein-Ligand Hydrogen Bonding by Import of Water Clusters

3.1 Introductory Remarks

This chapter has been published in *Chemistry - A European Journal*. In the following the original text is depicted. The present study was accomplished with Luzi J. Barandun, Dr. Philipp C. Kohler and Sandro Tonazzi (ETH Zürich), Björn Wagner and Severin Wendelspiess (F. Hoffmann-La Roche AG) and Dr. Tina Ritschel (Philipps-Universität Marburg). In the course of this thesis, the crystallographic investigation of compounds **15-17**, **21**, **24** and the kinetic characterization of compounds **15-17**, **24**, **25** has been contributed.

3.2 Abstract

The foodborne illness shigellosis is caused by *Shigella* bacteria which segregate the highly cytotoxic *Shiga* toxin – also formed by the closely related enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). It has been shown that tRNA-guanine transglycosylase (TGT) is essential for the pathogenicity of *Shigella flexneri*. Herein, the molecular recognition properties of a guanine binding pocket in *Zymomonas mobilis* TGT are investigated with a series of *lin*-benzohypoxanthine- and *lin*-benzoguanine-based inhibitors bearing substituents to occupy either the ribose-33 or the ribose-34 pocket. The three inhibitor scaffolds differ by the substituent at C(6) being H, NH₂, or NH-alkyl. These differences lead to major changes in the inhibition constants, p*K*_a values, and binding modes. Compared to the *lin*-benzoguanines, with an exocyclic NH₂ at C(6), the *lin*-benzohypoxanthines, without exocyclic NH₂ group, have weaker affinity as several ionic protein-ligand H-bonds are lost. X-ray cocrystal structure analysis reveals, that a new water cluster is imported into the space vacated by the lacking NH₂ group and by a conformational shift of the side chain of catalytic Asp102. In the presence of an N-alkyl group at C(6) in *lin*-benzoguanine ligands, this water cluster is largely maintained but

replacement of one of the water molecules in the cluster leads to a substantial loss in binding affinity. This study provides new insight into the role of water clusters at enzyme active sites and their challenging substitution by ligand parts, a topic of general interest in contemporary structure-based drug design.

3.3 Introduction

In May 2011, the outbreak of the *Shiga* toxin-producing bacterium enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) led to a major health and economic problem in Europe [Frank et al., 2011]. The eponymous bacterium for the *Shiga* toxin – the *Shigella* bacterium – causes the acute inflammatory bowel disease shigellosis [Sansonetti, 2001]. It has been shown that the enzyme tRNA–guanine transglycosylase (TGT, EC 2.4.2.29) is a potential drug target for the treatment of shigellosis [Durand et al., 2000; Grädler et al., 2001]. We have introduced *lin*-benzoguanines (Figure 3.1, IUPAC: 6-aminoimidazo[4,5-*g*]quinazolin-8(7*H*)-ones) as inhibitors of *Zymomonas mobilis* TGT [Stengl et al., 2007; Meyer et al., 2006]. The tricyclic, unsubstituted *lin*-benzopurines, in which the natural purine is extended by insertion of a benzene ring between the pyrimidine and the imidazole moieties, were introduced first by Leonard and co-workers in the 1970s [Leonard et al., 1987]. They have however found only limited application in medicinal chemistry [Dvořáková et al., 1988; Rewcastle et al., 1996; Rotella et al., 2000]. Kool and co-workers reported the synthesis and base-pairing properties of these extended nucleobases when introduced in oligonucleotides [Krueger et al., 2011].

In our previous studies on *Z. mobilis* TGT, we showed that highly potent inhibitors are obtained by filling either the ribose-33 [Hörtner et al., 2007] or ribose-34 pocket [Kohler et al., 2009; Ritschel, Kohler et al., 2009] of the tRNA-binding site with substituents attached to C(2) or C(4), respectively, of the *lin*-benzoguanine core (Figure 3.1). Herein, we compare *lin*-benzoguanines with *lin*-benzohypoxanthines (IUPAC: imidazo[4,5-*g*]quinazolin-8(7*H*)-ones) which lack the exocyclic NH₂ group at C(6). Several comparative studies on the binding affinity of guanine and their corresponding hypoxanthine derivatives have been reported. Both cases are found, in which either the guanine-based compounds have stronger binding than the hypoxanthine-based ones, or *vice versa* [Eldrup et al., 2004; Bretner et al., 2003]. On the other hand, 9-deazahypoxanthine- and 9-deazaguanine-based ligands of the human

purine nucleoside phosphorylase (PNP) were found to be equipotent [Taylor et al., 2007]. These findings prompted us to investigate and compare the molecular recognition of *lin*-benzoguanines and *lin*-benzohypoxanthines by *Z. mobilis* TGT in detail.

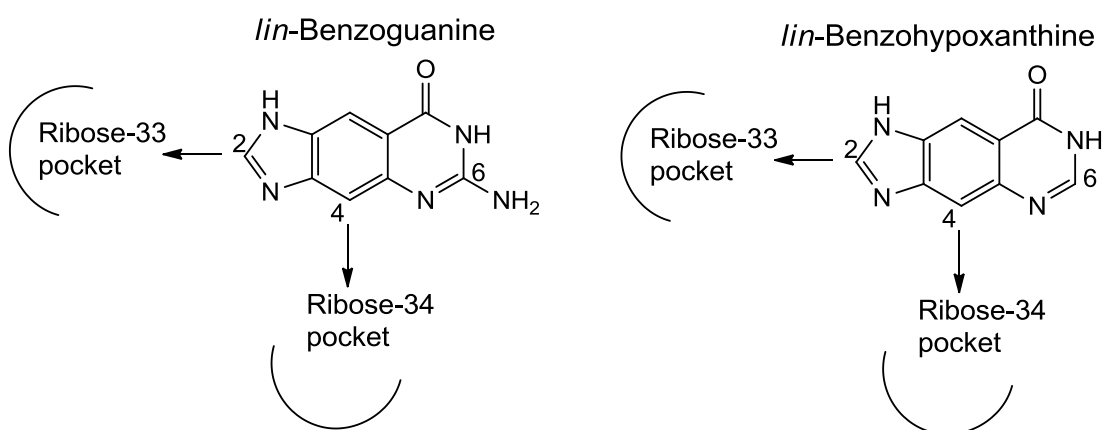


Figure 3.1 Structure and numbering of *lin*-benzoguanines and *lin*-benzohypoxanthines. Substitution at C(2) or C(4) allows to fill the ribose-33 and ribose-34 pockets, respectively.

3.4 Results and Discussion

3.4.1 Ligand design

Z. mobilis TGT catalyzes the guanine/preQ₁ base-exchange reaction at the wobble position G₃₄ in the anticodon of bound tRNA with participation of the side chains of catalytic Asp102 and Asp280 [Xie et al., 2003]. The region of the active site of interest for our ligand design comprises the guanine/preQ₁ binding pocket and the ribose-33 and ribose-34 pockets occupied by bound tRNA (Figure 3.2a). *Lin*-benzoguanines bound to the nucleobase pocket are intercalated between the side chains of Met260 and Tyr106 and, similar to the natural substrates guanine and preQ₁, their aminopyrimidinone ring engages in a complex hydrogen-bonding pattern with the protein, involving the side chains of Asp102, Asp156, Gln203 and the backbone NH of Gly230 (Figure 3.2a) [Hörtner et al., 2007; Kohler et al., 2009]. The *lin*-benzohypoxanthines lack the exocyclic NH₂ group at C(6) and, therefore, were expected to lose H-bonds to the side chains of Asp102 and Asp156, respectively.

3.4.2 Biological activity

Competitive inhibition constants K_i were obtained at pH 7.3 in 100 mM HEPES buffer at 37 °C by a radioactive assay using [8-³H]guanine, as described in the literature (see also Material und Methoden section) [Meyer et al., 2006]. The *lin*-benzoguanine derivatives with an exocyclic NH₂ group show by far the strongest inhibition (Table 3.1, compounds **2**, **5**, **14**, **18**, **20**, **22**) with K_i values in the range of 2–58 nM [Hörtner et al., 2007; Kohler et al., 2009]. The removal of the exocyclic NH₂ group in the corresponding *lin*-benzohypoxanthines **15**, **19**, **21**, **23** (with substituents for the ribose-33 pocket) and **24**, **25** (with substituents for the ribose-34 pocket) drastically reduces the affinity by a factor of 80–680, yielding K_i values in the range near 1 μM. Unexpectedly, mono-alkylation at the exocyclic NH₂ group of the *lin*-benzoguanines reduces the potency even further and K_i values are now in the double-digit micromolar range.

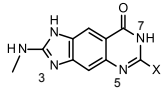
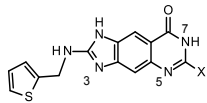
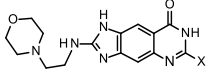
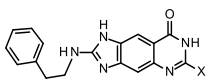
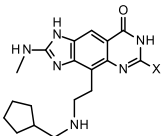
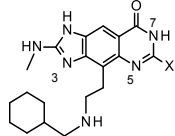
N-Methylated **16** shows a 480-fold lower binding affinity compared to the NH₂ derivative **14** and N-ethylated **17** binds even weaker by a factor of 700-fold. The origins of these large differences in binding strength become apparent in the discussion of the cocrystal structures (see below).

3.4.3 Physicochemical properties

We calculated $\text{clog}D$ and $\text{clog}P$ values and conducted measurements to analyze how the removal of the exocyclic NH₂ group in *lin*-benzohypoxanthines or its monoalkylation in *lin*-benzoguanines affect the physicochemical properties of the ligands. Both changes lead to more positive $\text{clog}D$ and $\text{clog}P$ values (calculated using ACD/Labs software; compare the 2-methylamino compounds **15**, **16**, **17** to **14**, Table 3.1) [Leo et al., 1971], although all compounds remain highly hydrophilic. Upon introduction of substituents at C(2) or C(4), the differences resulting from the changes at C(6) increasingly vanish and become masked by effects from the added substituents.

Measurements of PAMPA (parallel artificial membrane permeability) scores [Avdeef et al., 2007] were performed to estimate differences in membrane permeability between the three types of ligands. The majority of the highly polar compounds do not penetrate the membrane (Table 3.1), with only two rated as "medium" due to accumulation in the membrane. Differences between the three ligand classes are not observed, as the highly polar 2-aminoimidazole moiety presumably dominates the behavior of all systems.

Table 3.1 Inhibition constants K_i , $c\text{Log}D$ (calculated logarithmic distribution constant for *n*-octanol–water at pH = 7.4) and $c\text{Log}P$ (calculated logarithmic partition constant for *n*-octanol–water) values, PAMPA scores, and pK_a values for *lin*-benzohypoxanthines and *lin*-benzoguanines. [a] Hörtnner et al., 2007. [b] Kohler et al., 2009. [c] Accumulation in membrane. [d] Could not be determined.

	X	K_i [nM]	$c\text{Log}D$ (pH = 7.4)	$c\text{Log}P$	Pe [10^{-6} cm/s]	PAMPA score category	pK_a measurements N(7)H N(3)H ⁺ N(5)H ⁺			
	14	NH ₂	58 ± 36 ^[a]	-0.33	-0.05	0.00 ^[c]	medium	> 10	5.7	4.4
	15	H	6500 ± 2900	0.18	-0.19	0.00	low	> 10	5.6	1.8
	16	NHMe	28050 ± 11970	0.18	0.47	0.00	low	n.d. ^[d]	5.6	4.2
	17	NHEt	40830 ± 4270	0.72	0.97	0.05	low			
	18	NH ₂	35 ± 9 ^[a]	1.09	1.41	0.00 ^[c]	medium	> 10	5.5	4.0
	19	H	2900	1.76	1.27	0.03	low	> 10	5.1	2.0
	20	NH ₂	6 ± 6 ^[a]	-0.89	-0.45	0.00	low			
	21	H	4100	-0.22	-0.59	0.05	low			
	22	NH ₂	10 ± 3 ^[a]	1.76	2.04					
	23	H	3700	2.37	1.90					
	5	NH ₂	2 ± 1 ^[b]	-0.87	1.78	0.00	low			
	24	H	740 ± 170	-0.57	1.65	0.04	low			
	2	NH ₂	4 ± 2 ^[b]	-0.23	2.31	0.09	low	n.d. ^[d]	5.3	n.d. ^[d]
	25	H	1100 ± 370	-0.10	2.17	0.00	low			

Classical potentiometric titrations to determine the pK_a values of the ligands were not feasible due to low solubility of the *lin*-benzopurines. Instead, measurements were conducted by parallel capillary electrophoresis [Gong et al., 2008]. The pK_a values for the *lin*-benzoguanines **14**, **18** had been previously determined by photometric titration [Hörtnner et al., 2007], and the new data were found in good agreement. The pK_a values for the 2-aminoimidazolium moiety (5.1–5.7) and N(7)H (> 10) are similar for all three ligand classes. In contrast, the removal of the exocyclic NH₂ group at C(6) strongly increases the acidity of N(5)H⁺, lowering the pK_a from values around 4.0–4.4 in the *lin*-benzoguanines to 2.0 and below in the *lin*-benzohypoxanthines (Table 3.1). This may have a large impact on the binding mode as it is assumed that N(5) is protonated in the active site in order to undergo H-bonding to the presumably deprotonated side chain of

Asp102 [Ritschel, Hörtner et al., 2009; Stengl et al., 2005]. The *lin*-benzohypoxanthines have to pay a greater energetic penalty for protonation at N(5) compared to the *lin*-benzoguanines. The data indicate that the parent tricyclic scaffolds are predominantly in their unprotonated form under assay conditions (pH 7.3), although Poisson-Boltzmann calculations for *lin*-benzoguanines suggest an increase of the pK_a value of the 2-aminoimidazolium moiety upon binding in the enzyme pocket [Ritschel, Hörtner et al., 2009].

3.4.4 X-Ray cocrystal structures of *lin*-benzohypoxanthines

For the four ligands **15**, **19**, **21** and **24**, crystal structures in complex with TGT could be obtained with maximum resolution between 1.53 Å and 1.82 Å (for data collection and refinement statistics are given in the Appendix). The tricyclic aromatic ring system of 2-amino-*lin*-benzohypoxanthines (Figure 3.2b) binds in a way similar to the closely related 2-amino-*lin*-benzoguanines (Figure 3.2a) in the guanine sub-pocket.

In all structures, the tricyclic scaffold is fixed *via* H-bonds to the side chains of Asp156 and Gln203, the backbone NH of Gly230, and the backbone C=O groups of Leu231 and Ala232. The interaction with the backbone C=O of Leu231 can be assumed as rather strong due to the charge assistance provoked by the most likely protonation of the 2-aminoimidazole core of the ligand and the additional Glu235 which polarizes even further the addressed backbone carbonyl [Hörtner et al., 2007]. The tricyclic aromatic skeleton is sandwiched between Tyr106 and Met260, undergoing favorable π -stacking interactions. As reported for the cocrystal structures with *lin*-benzoguanines, the binding of *lin*-benzohypoxanthines induces a *cis*-peptide bond conformation between Val262 and Gly263 (not shown) [Ritschel, Hörtner et al., 2009].

For the unsubstituted ligand **15**, a dataset with a resolution of 1.82 Å showed a well-defined electron density for the ligand and the surrounding water molecules within the active site (Figure 3.2b). The comparison of this structure with that previously published for the largely analog *lin*-benzoguanine (PDB ID: 2Z7K [Ritschel, Hörtner et al., 2009]) revealed that removal of the exocyclic amino functionality at C(6) leads to a rotation of the side chain of Asp102 within the guanine sub-pocket, away from the bound ligand (Figure 3.2c). Instead, it now undergoes H-bonding to the side chain NH₂

of Asn70 and the backbone NH of Thr71. This interaction is already known from apo structures of TGT (Figure 3.3) [Brenk et al., 2003] and from cocrystal structures with ligands bound to the guanine sub-pocket that lack an H-bond donor in a fitting distance to the carboxyl functionality of Asp102 (e.g. PDB ID: 1F3E [Grädler et al., 2001]; Figure 3.4).

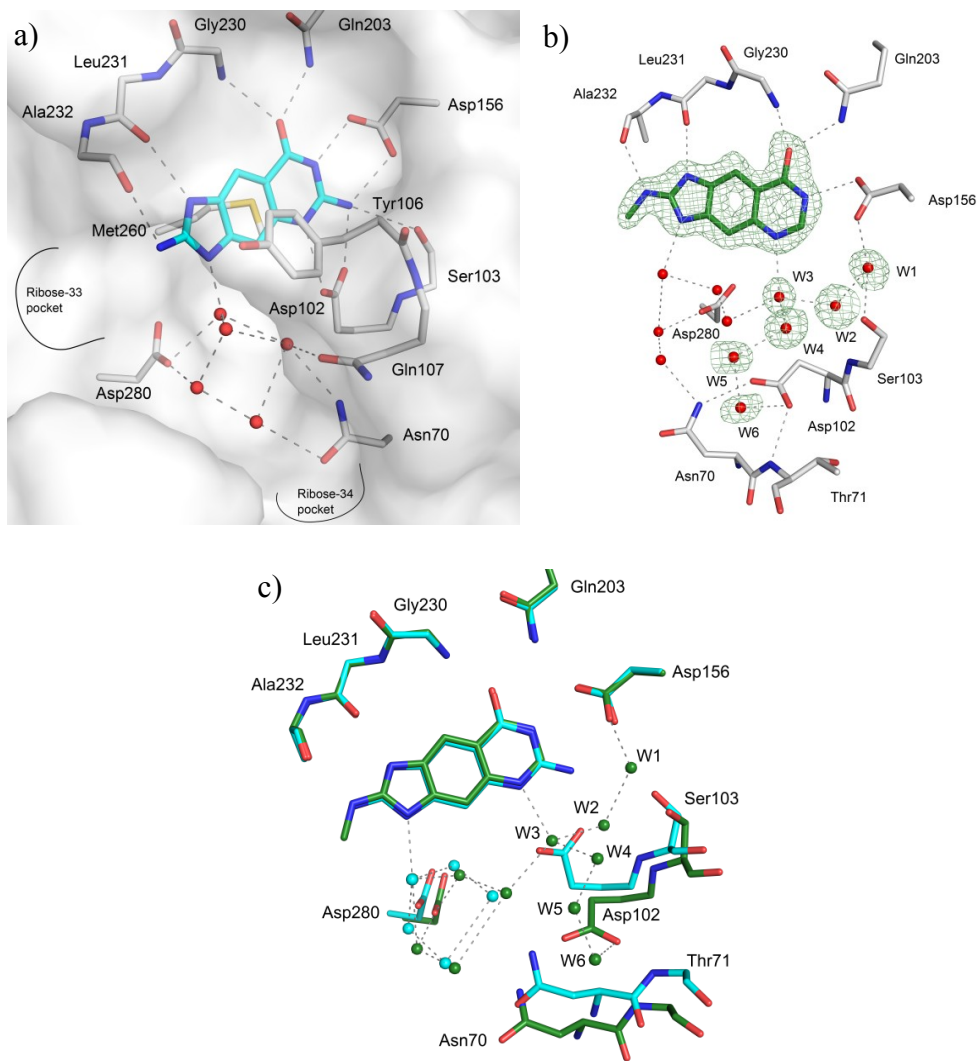


Figure 3.2 Comparison of X-ray cocrystal structures of *lin*-benzoguanines and *lin*-benzohypoxanthines bound to the active site of *Z. mobilis* TGT. Color code: C_{enzyme} gray, O red, N blue. Selected water molecules are shown as spheres and labeled as W. H-bonds are shown as dashed lines (distances between 2.5 Å and 3.5 Å). Ligand and water molecules are well defined by the difference electron density at 3 σ shown as green mesh. These characteristics apply to all Figure captions of this chapter unless otherwise stated. a) Binding mode of a *lin*-benzoguanine (C_{ligand} cyan) in the active site of TGT (PDB ID: 2Z7K [Ritschel, Hörtnner et al., 2009]) which is indicated as a grey surface. The water cluster between Asp102 and Asp280 is shown as red spheres. b) Cocrystal structure of **15** (C_{ligand} green) bound to the active site of TGT (PDB ID: 3S1G). An H-bond between W3 and the water cluster in the ribose-34 pocket connects the new water cluster lined up by W1–W6. There is no electron density observable for the side chain of Gln107. Instead W5 occupies this position. c) Overlay of a *lin*-benzoguanine (C cyan, water molecules cyan; PDB ID: 2Z7K [Ritschel, Hörtnner et al., 2009]) and the largely analog *lin*-benzohypoxanthine **15** (C green, water molecules green; PDB ID: 3S1G) in the active site of *Z. mobilis* TGT.

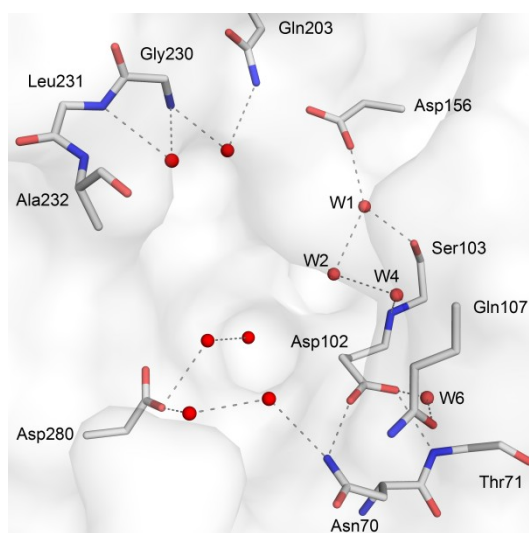


Figure 3.3 Apo crystal structure of *Z. mobilis* TGT (PDB ID: 1P0D [Brenk et al., 2003]). Asp102 adopts an orientation averted from the guanine subpocket and experiences hydrogen bonds to Asn70 and Thr71. Water molecules W1, W2, W4 and W6 are present at positions seen to be crystallographically conserved. Displayed hydrogen bonds are between 2.5-3.8 Å.

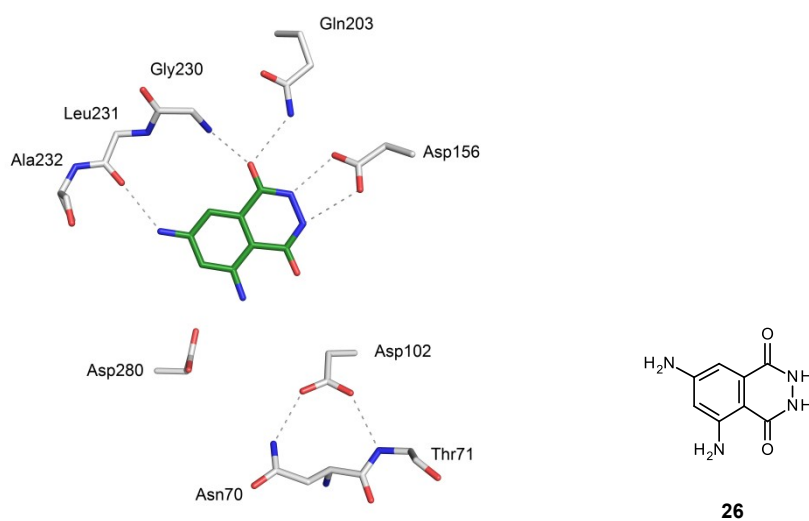


Figure 3.4 Cocrystal structures of *Z. mobilis* TGT in complex with **26** (green, PDB ID: 1F3E [Grädler et al., 2001]). The ligand's C=O function does not provide a hydrogen-bond donor functionality to Asp102 which adopts a down-rotated orientation interacting to Asn70 and Thr71. Displayed hydrogen bonds are between 2.6-3.0 Å.

The emerging space at the bottom of the guanine sub-pocket provoked by the Asp102 rotation is filled with water molecules, which form a well-defined six-membered network (W1–W6) (Figure 3.2b) W1 solvates Asp156 while W3 interacts through an H-bond with N(5) of the ligand. A contact to the rotated Asp102 is built *via* W5 and

W6. Water W3 is also connected to the five-membered water cluster, which is well conserved between Asp102 and Asp280 and already attracted attention in preceding studies [Ritschel, Kohler et al., 2009] (Figures 3.2a,c). For the side chain of Gln107 (not shown), which flanks the guanine sub-pocket, no electron density is visible at the applied contour level. It seems to be solvent-exposed without directed interactions.

For the complexes of ligands **19** and **21**, datasets with resolutions of 1.53 Å and 1.65 Å, respectively, were obtained (Figure 3.5a,b). Their binding mode is analogous to the one observed for **15** (Figure 3.5b). Asp102 is rotated away from the bound ligand, and the newly formed space is filled with five well-defined water molecules that are equally positioned to W1–W4 and W6 in the complex of **15** (Figure 3.2b). The water network described above is apparently highly conserved in the crystal structures. The position of W5 is different due to a change in the network pattern. Gln107 adopts a position facing the guanine sub-pocket in the structures with **19** and **21** and establishes a directed H-bond to W6 (Figure 3.5b).

In the complex with **21** the side chain C=O of Gln107 almost adopts the position of W5. A similar situation is found in the cocrystal structure with **19**, but Gln107 is slightly tilted compared to **21**, and the side chain O-position shifted by about 0.4 Å. Nevertheless, the Gln107 side chain interacts with W6 directly in **21** as well. In the two complexes **19** and **21**, W3 again interacts with N(5) of the ligand. The water positions W1, W2, W4, and W6 also occur in the apo structure (PDB ID: 1P0D [Brenk et al., 2003]; Figure 3.3). In the unoccupied active site, Gln107 shows a different conformation compared to **19** and **21** (Figure 3.3). Nevertheless, in this conformation we also observe an H-bond from the terminal carboxamide C=O to W6 (2.5 Å). Similar to the reported cocrystal structures of C(2)-substituted *lin*-benzoguanines, there is no reasonable electron density seen for the C(2) side chains in **19** and **21**; hence they can be assumed as highly flexible or scattered over multiple conformations [Ritschel, Hörtner et al., 2009]. These side chains are most likely directed towards the flat and solvent-exposed ribose-33 pocket. As a driving force behind the rotation of Gln107 in the complexes of **19** and **21**, an influence of the flexible C(2)-side chain on the active site solvation pattern is imaginable. A different orientation of Asp102 and, in consequence, a varied water network can be found in the complex of TGT with **24** (Figure 3.5c). The parent scaffold contains an extended substituent on C(4) of the tri-

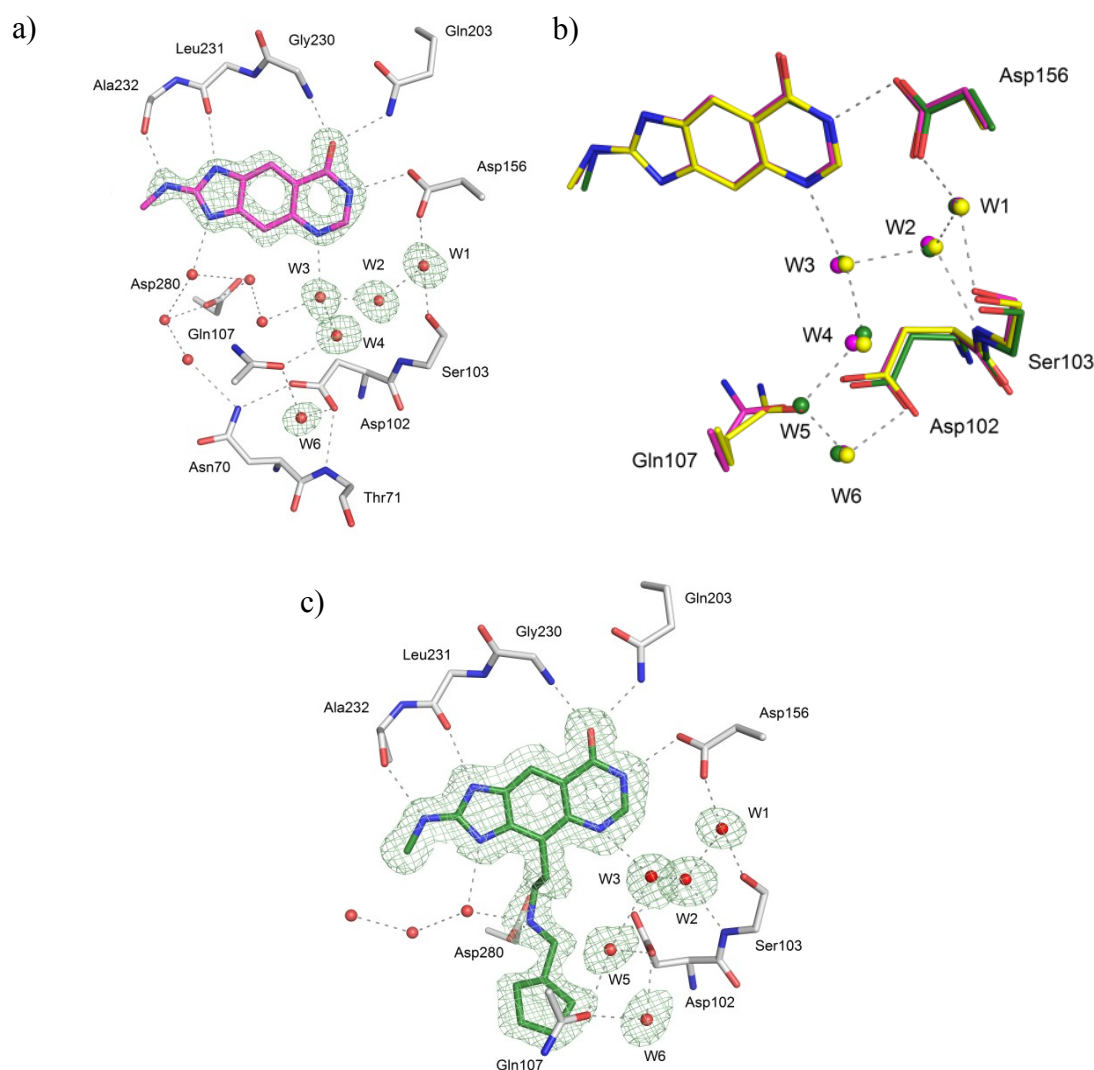


Figure 3.5 X-ray cocrystal structures of *lin*-benzohypoxanthines **15**, **19**, **21** and **24** bound to the active site of *Z. mobilis* TGT. Displayed hydrogen bonds are between 2.5-3.6 Å. a) Cocrystal structure of **19** (C_{ligand} magenta) bound to the active site of TGT (PDB ID: 3GEV). There is no reasonable electron density observable for the N-ethylthiophene side chain which was already found to be highly disordered in an earlier cocrystal structure of **18** bound to TGT [Ritschel, Hörtner et al., 2009]. Gln107 forms with its side chain C=O a bridging H-bond between W4 and W6. After detailed visual inspection of the electron density maps and the B-values, the nitrogen/oxygen orientation of the Gln107 carboxamide side chain has been rotated by 180° deviating from the coordinate file deposited in the PDB. b) Superposition of **15** (C_{ligand} green), **19** (C_{ligand} magenta), and **21** (C_{ligand} yellow, PDB ID: 3V0Y) in complex with TGT. Illustrated are the ligand, the discussed water molecules (shown in **15**: green, **19**: magenta, and **21**: yellow), and the residues involved in the water network. Water positions W1–W4 and W6 are highly conserved in the three structures. The bridging position of W5 in the complex of **15** is adopted by the side chain C=O of Gln107 in the complexes of **19** and **21**. c) Cocrystal structure of **24** bound to the active site of TGT (PDB ID: 3SM0).

cycle that points into the ribose-34 pocket. In analogy to preceding studies, the ethylamine linker is used in order to occupy the polar ribose-34 pocket displacing the water cluster around the most likely negatively charged Asp102 and Asp280 [Ritschel,

Kohler et al., 2009]. The terminal cyclopentyl ring undergoes a hydrophobic interaction with Val45 and Leu68 that form the apolar bottom of the ribose-34 pocket. In contrast to the complexes with **15**, **19**, **21**, the side chain of Asp102 cannot be solvated by an interaction to Asn70 and Thr71. The C(4)-substituent of the ligand hinders the complete rotation of Asp102, hence it stays in a tilted intermediate position. However, this small rotation also opens space in the guanine sub-pocket, which is filled with water molecules building a network (W1–3, W5, W6). W1, W2, W5, and W6 are at the conserved positions as it was seen in the structures with **15**, **19** and **21**. Because of the tilted position of Asp102, the former water molecule W4 is displaced and W3 occupies a shifted position now undergoing H-bonding interactions with Asp102, W2, W5, and N(5) of the ligand.

3.4.5 X-Ray cocrystal structures of C(6)-N-alkylated *lin*-benzoguanines

For the complexes with C(6)-N-alkylated *lin*-benzoguanines **16** and **17**, datasets with resolutions of 1.68 Å and 1.37 Å, respectively, were obtained (Figure 3.6). The adaption of the guanine sub-pocket to the binding of C(6)-N-alkylated *lin*-benzoguanines matches very well with the described binding of *lin*-benzohypoxanthines. Due to the spatial requirements of the C(6)-N-alkyl moieties, the H-bonds to Asp102 are also not formed in these complexes. Hence, Asp102 rotates also here out of the ligand binding pocket and interacts with Asn70 and Thr71. Water molecules fill the cavity beneath the ligand but form a different pattern compared to the complexes with **15**, **19**, **21** and **24** (Figure 3.7).

In the cocrystal structure with **16**, three water molecules (W1–W3) take the above-mentioned enabled space (Figure 3.6a). W1 is located at a supposedly energetically less favorable position surrounded by the hydrophobic parts of the side chains of Asp102, Ile201, and Met153 (Figure 3.8) and only forms hydrogen bonds to the protein with the side chain OH and the backbone NH of Ser103. W1 also interacts with W2, which forms H-bonds to Tyr258 (not shown in Figure 3.6a) and W3. H-Bonds are established between W3 and N(5) of the ligand and one of the well-conserved water molecules between Asp102 and Asp280. Extending *via* three following water molecules (W4–W6), this network also finds its endpoint in an interaction with the side chain of Asp102. The C(6)-N-alkyl moieties of **16** and **17** both adopt the *s-cis* conformation in

the cocrystal structures. An *s-trans* orientation is sterically hindered as it would create a consequent clash if the side chain of Asp156 will not move out of space as Asp102 does in all the studied complexes.

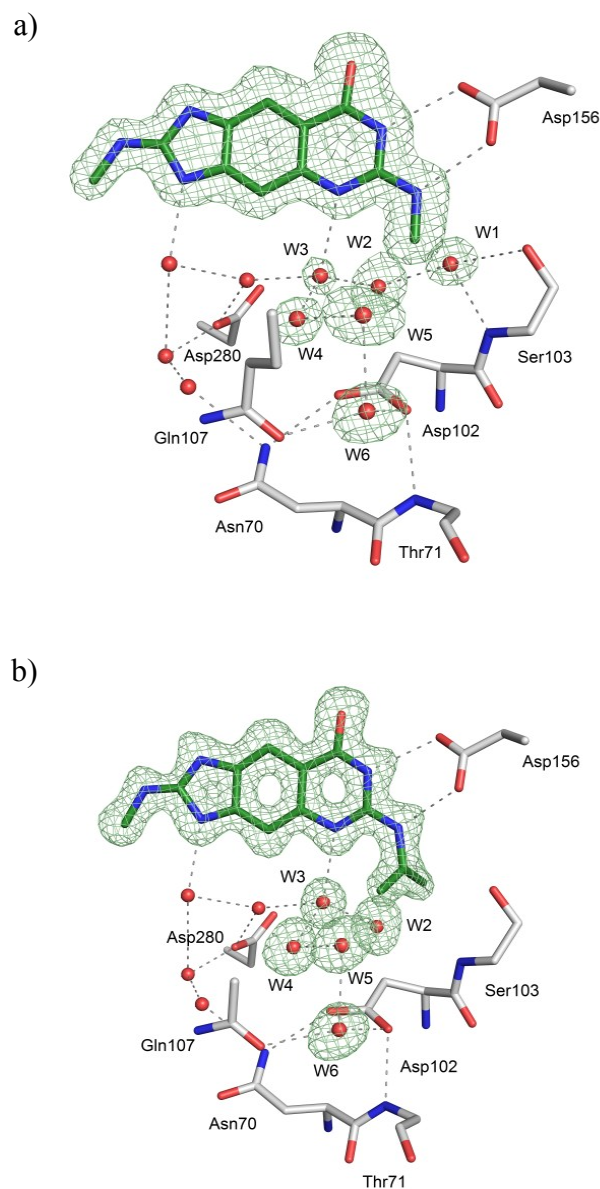


Figure 3.6 X-ray cocrystal structures of *Z. mobilis* TGT with C(6)-N-monoalkylated *lin*-benzoguanines **16** and **17**. Displayed hydrogen bonds are between 2.6-3.6 Å. a) Cocrystal structure of **16** bound to the active site of TGT (PDB ID: 3RR4). For clarity, the residues Met153 and Ile201 which surround W1 are not shown (Figure 3.8). Tyr258, hidden behind the ligand, is also not displayed. b) Cocrystal structure of **17** bound to the active site of TGT (PDB ID: 3TLL). Two conformations of the N-ethyl moiety are observed, one with an occupancy of 36%, with the terminal methyl group pointing towards the hydrophobic cavity around Ser103, and a second, with an occupancy of 64%, in which the terminal methyl group is nearly flipped by 180°, facing the tricyclic ligand scaffold.

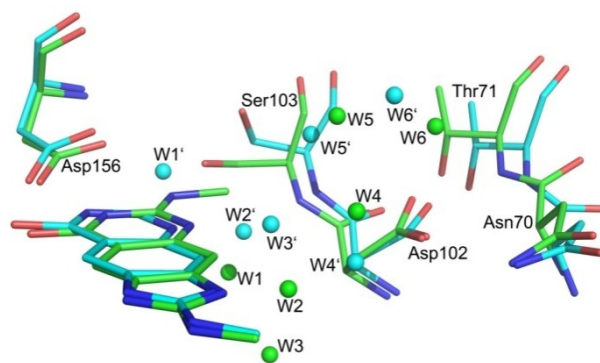


Figure 3.7 Overlay of the cocrystal structures of **15** (PDB ID: 3S1G; C cyan, water molecules W1'–W6' shown as cyan spheres) and **16** (C green, water molecules W1–W6 shown as green spheres). The network of water molecules which surrounds the ligands varies between both complex structures.

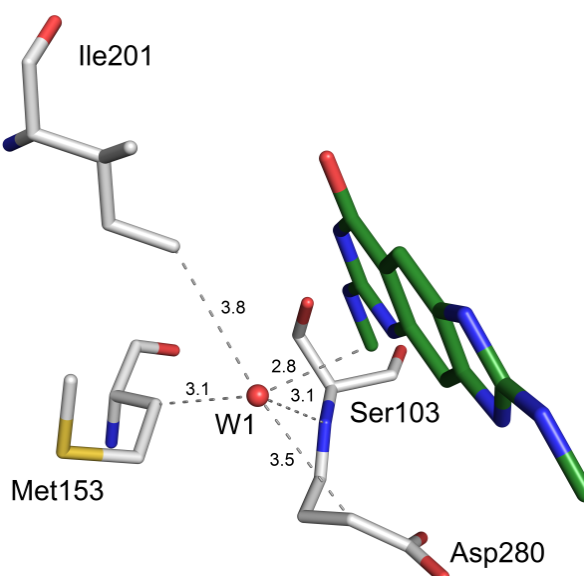


Figure 3.8 Cocrystal structure of **16** (PDB ID: 3RR4) bound to the active site of TGT. W1 is surrounded by a hydrophobic environment lined up by Met153, Ile201, the backbone of Asp102, the methyl group of **16**.

Likely, the movement of Asp102 is also more favored as this movement is expected to occur during catalysis [Xie et al., 2003]. Furthermore, the *s-cis* conformation is also the preferred one in solution, as revealed by DFT calculations at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory (Figure 3.9).

Comparing the cocrystal structures of **16** and **17**, well-conserved positions for the water molecules W2–W6 can be observed. W1 is displaced by the additional carbon of the

N-ethyl residue of **17** which in one of the two observable orientations (occupancy 36%) points into the hydrophobic area of the guanine sub-pocket around Ile201, Met153, and Ser103 (Figure 3.6b and 3.10). This leaves both the NH and OH groups of Ser103 unsolvated. The orientation of the terminal carbon of the N-ethyl moiety additionally produces steric clashes with the side chain of Met260 that can in consequence only be partly observed in the highly conserved conformation (Figure 3.10). In the second orientation (64% occupancy), the terminal carbon of the N-ethyl group of **17** occurs in a nearly 180° rotated orientation and is unfavorably directed towards the backbone NH of Tyr106. Only when the terminal carbon of the N-ethyl moiety adopts the latter conformation, the side chain of Met260 assumes its highly conserved position with a corresponding occupancy.

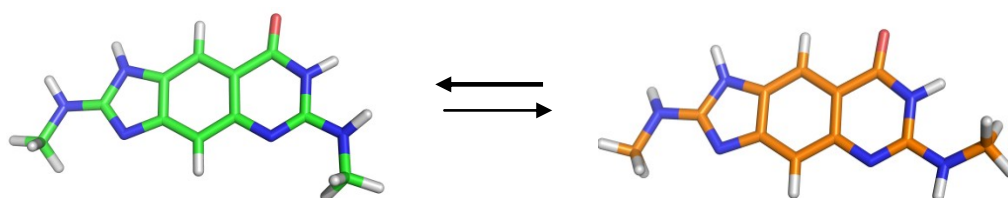


Figure 3.9 Representation of the *s-cis-s-trans* equilibrium of **16**.

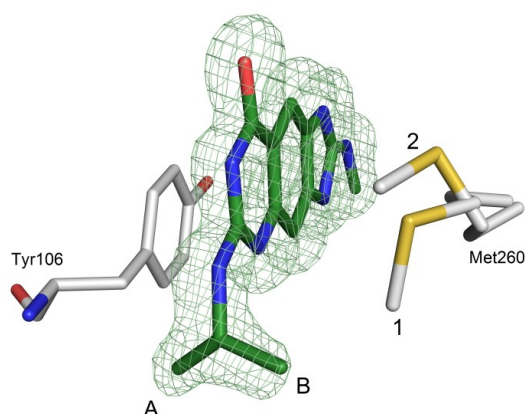


Figure 3.10 Cocrystal structure of inhibitor **17**. The terminal carbon of the N-ethyl moiety in the ligand occurs with an occupancy of 36% in orientation B where it is directed towards Met260 hence Met260 is pushed upwards to conformation 2 with a corresponding occupancy. Met260 populates with 64% conformation 1 when the ligand's terminal methyl group is nearly 180° away in conformation A with a corresponding occupancy.

3.4.6 Origin of differences in biological activity between *lin*-benzoguanines, their N-monoalkylated derivatives, and *lin*-benzohypoxanthines

Taken together, the results from the biological and physicochemical assays and from biostructure analysis allow a detailed insight into the molecular recognition of *lin*-benzoguanines and *lin*-benzohypoxanthines at the active site of TGT. The *lin*-benzohypoxanthines are 80–680 times less potent than the corresponding *lin*-benzoguanines (Table 3.1). The pK_a measurements (Table 3.1) suggest that N(5) (pK_a values 1.8–2.0) of the *lin*-benzohypoxanthine scaffold most probably is not protonated in this part of the scaffold, in contrast to the *lin*-benzoguanines, with corresponding pK_a values 4.0–4.4. Therefore, interaction of the ligand with the carboxylate side chain of Asp102 is unfavorable, which causes this side chain to rotate away from the ligand into a conformation similar to the one adopted in the apoenzyme. However, the largest part of the loss in binding energy, when changing to the *lin*-benzohypoxanthine ligands, most probably originates from the loss of the two short ionic H-bonds, which the exocyclic C(6)-NH₂ groups of the *lin*-benzoguanines form with the carboxylates of Asp102 (e.g. in the complex of **1**: $d(N^{\ominus}O) = 2.8 \text{ \AA}$) and Asp156 ($d(N^{\ominus}O) = 2.8 \text{ \AA}$). Also, a weaker interaction with the OH of Ser103 ($d(N^{\ominus}O) = 3.7 \text{ \AA}$) is lost. The import of a well-conserved water cluster, consisting of 5 to 6 molecules which form a network among each other and a series of H-bonds to the protein, does not compensate for the loss of the H-bonds from the C(6)-NH₂ to the anionic side chains of Asp102 and Asp156.

The bulk of the C(6)-N-methyl and C(6)-N-ethyl groups in ligands **16** and **17** prevents an interaction of the ligand with the side chain of Asp102 which turns away to adopt the conformation seen in the apoenzyme and in the complexes of *lin*-benzohypoxanthines **15**, **19** and **21**. Compared to *lin*-benzoguanines with unsubstituted C(6)-NH₂ group, the two H-bonds to the carboxylate of Asp102 are lost, as well as the weaker interaction with the OH group of Ser103. In the complex of **16**, a water cluster W1-W6 is imported into the space vacated by the conformational change of Asp102. However, this cluster is energetically less favorable as compared to the cluster in the structures of *lin*-benzohypoxanthines **15**, **19** and **21**, as some of the water molecules are forced by the C(6)-N-methyl group into less favorable, more hydrophobic environments. In particular, W1 loses the ionic H-bond to the side chain of Asp156 which is seen in the complexes of **15**, **19** and **21** (Figure 3.7), and the water network chain to N(5) *via* W2 and W3 is

ruptured. As a result, C(6)-N-methylated **16** ($K_i = 28050$ nM) has a 480-fold lower binding affinity compared to the NH_2 derivative **14**. The stability of the complex of N-ethylated **17** ($K_i = 40830$ nM) is even further reduced, by a factor of 700-fold compared to **14**. First of all, the desolvation of the ethyl derivative requires more energy, particular as the ethyl group does not find a favorable hydrophobic environment in the protein. Second, the ethyl substituent displaces W1 from the water cluster. Displacement of water molecules from an environment of uncharged residues appears to be related to a neglectable effect in the free energy, however large compensating contributions in enthalpy and entropy are observed [Petrova et al., 2005; Biela et al., 2012]. If displacement from an environment with charged residues is attempted, also an unfavorable free energy contribution can be observed [Steuber et al., 2007]. The latter is also given for the complexes studied here as W1 is involved in interactions to the charged residue Asp156. Nevertheless, also favorable replacements of water molecules by N-alkyl moieties have been reported, e.g. for inhibitors of catechol-O-methyltransferase [Ellermann et al., 2009]. Furthermore, the backbone NH and the OH group of Ser103 become fully desolvated which should also reduce the overall binding affinity.

3.5 Conclusion

Here, we compared the properties of three series of ligands for *Z. mobilis* TGT, *lin*-benzoguanines, their C(6)-N-alkylated derivatives, and *lin*-benzohypoxanthines. Their physical properties are dominated by the highly polar, basic 2-aminoimidazole moiety which is at the origin of low partitioning and distribution constants and poor membrane permeability. A large difference in the measured $\text{p}K_a$ -value for the $\text{N}(5)\text{H}^+$ moiety, which shifts from ≈ 4 in the *lin*-benzoguanines to ≈ 2 in the *lin*-benzohypoxanthines may have a strong influence on the binding affinity to the protein. Whereas *lin*-benzoguanines bind with K_i values in the single- to double-digit nanomolar range, as a result of ionic H-bonding of the aminopyrimidinone ring to two Asp side chains, *lin*-benzohypoxanthines only show affinities in the single-digit micromolar range or slightly below. C(6)-N-alkylated *lin*-benzoguanines are even weaker ligands with K_i values in the double-digit micromolar range. The origin of the different binding affinities was investigated by X-ray cocrystal structure analysis. The

tricyclic scaffold of all three ligand classes adopts the same binding geometry in the guanine recognition pocket. For the *lin*-benzohypoxanthines lacking the C(6)-NH₂, an ionic H-bond to the carboxylate of Asp156, which remains in a conserved orientation, is lost. Furthermore, the carboxylate of Asp102 no longer binds to the ligand and changes its conformation to adopt a position seen in the apoenzyme which is supposedly important in the catalytic mechanism. This conformational change opens up space which is filled by a conserved water cluster. While the water cluster undergoes several favorable interactions with the protein, they are not sufficient to compensate for the loss of ligand-protein ionic H-bonding, and the overall binding affinity is strongly reduced. The structural data show that the bound C(6)-N-alkyl-*lin*-benzoguanines maintain the double ionic H-bonding to the side chain of Asp156. However, for steric reasons, the bulky C(6)-N-alkyl moiety prevents the interaction with the side chain of Asp102 which again switches to the orientation seen in the apoenzyme. The opened space is again filled by a water cluster, which however interacts in a less favorable way with the protein and the ligand. In particular, the cocrystal structure of the N-ethyl derivative **17** shows a fully desolvated Ser103 residue along with the loss of a water contact to the adjacent charged Asp156 residue, which presumably causes the poorest binding affinity in the entire series. Together with our previous work on the substitution of the water cluster between the two side chains of catalytic Asp102 and Asp280 [Hörtner et al., 2007; Ritschel, Hörtner et al., 2009], this investigation documents that much remains to be learned about the energetics of such water clusters in protein-ligand complexes and of the substitution of individual water molecules in these clusters by ligand parts. It is clear from this work that such knowledge enhancement will have to rely on accurate, high-resolution X-ray cocrystal structure analysis, such as reported in this contribution. Small changes in the ligand may not only lead to losses/gains in protein-ligand H-bonds but may also profoundly affect the solvation and the formation of contiguously connected water networks mediating interactions in such a complex, which makes it even more difficult to assign accurate energetic quantities to lost/formed H-bonds.

3.6 Experimental section

***Z. mobilis* TGT crystallization:** Protein was cloned, overexpressed, and purified as described in detail elsewhere [Romier et al., 1996]. Crystals of TGT appropriate for data collection were obtained using the hanging-drop, vapor diffusion method at 288 K. TGT was cocrystallized with inhibitors. A protein solution (12 mg/mL TGT, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 15% (v/v) Me₂SO) was incubated with 1.5 mM inhibitor. A total of 2 μ L of this solution was mixed with 2 μ L reservoir solution (100 mM MES, pH 5.5, 1 mM DTT, 10% (v/v) Me₂SO, 13% (w/v) PEG 8000). After three weeks of crystal growth, crystals reached dimensions around 0.7 x 0.7 x 0.2 mm³. Compounds **19** and **21** were instead of cocrystallization soaked at a final concentration of 5 mM for one day into wild-type crystals.

X-ray data collection: Crystals were transferred for 10 s into a cryo-protectant containing buffer (50 mM MES, pH 5.5, 300 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 2% (v/v) Me₂SO, 4%(w/v) PEG 8000, 30% (v/v) glycerol). Afterwards, crystals were flash-frozen in liquid nitrogen. All datasets were collected at cryo-conditions (100 K) at the BESSY-PSF Beamline 14.2 in Berlin at a wavelength of $\lambda = 0.91841$ Å. A Rayonix MX225 CCD-detector was used for data collection. TGT crystals exhibited a monoclinic space group *C2* with one monomer per asymmetric unit. Data processing and scaling was done using HKL2000. Unit cell dimensions, data collection, and processing statistics are given in the Appendix.

Structure determination and refinement: For all complexes, the CNS program package was used to perform the initial rigid-body refinement and a cycle of conjugate gradient energy minimization, simulated annealing, and B-factor refinement [Brünger et al., 1998]. The coordinates of the TGT apo structure 1P0D were used as starting model. Due to the high resolution of all datasets, further refinement using SHELXL-97 was performed [Sheldrick et al., 1997]. For each refinement step, at least 20 cycles of conjugate gradient minimization were made with default restraints on bond distances, angles, and B-values. A total of 5% of all data were used for R_{free} -calculation. Intermittent model building was performed using COOT [Emsley et al., 2004]. The ligand, water, and glycerol molecules were placed into the sigma A weighted difference electron density and included in further refinement cycles. Riding hydrogen atoms were added for the protein in a final refinement cycle without using additional parameters.

Model analysis was performed using PROCHECK [Laskowski et al., 1993]. Coordinate files were deposited in the PDB with the following access IDs: 3S1G, 3GEV, 3V0Y, 3SM0, 3RR4, 3TLL.

Inhibition constant determination: Inhibition constants were determined by measuring the incorporation of 8-³H]-guanine (Hartmann Analytic) into *E. coli* tRNA^{Tyr} in presence of different inhibitor concentrations according to the method introduced in our groups. Preparation of *E. coli* tRNA^{Tyr} was realized using RiboMAXTM Large Scale RNA Production System - T7 (Promega). The assay reaction was performed in 100 mM HEPES buffer, pH 7.3, 20 mM MgCl₂, 0.037% (v/v) Tween 20, 5% (v/v) Me₂SO. Me₂SO was at this added to ensure ligand solubility. *Z. mobilis* TGT was used in concentrations from 19 nM to 150 nM incubated with inhibitor at 37°C. Assay reaction was started by adding the substrates 8-³H]-guanine and *E. coli* tRNA^{Tyr} in various concentrations and performed at 37 °C for 8–12 minutes. Turnover was measured by taking 15µL aliquots at four points of time. Aliquots were transferred to glass fiber filters (GC-F, Whatman) and directly quenched in 10% (w/v) trichloroacetic acid. Filters were washed in 5% (w/v) trichloroacetic acid (2x7 min) and 99.8% ethanol (2x 7 min) to remove tRNA-unbounded 8-³H]-guanine. Filters were dried at 60 °C. The tRNA-bound tritium was quantified using liquid scintillation counting. The inhibition constants were calculated as previously reported using Grafit 4.09 (Erithacus Software).

4 Disubstituierte *lin*-Benzopurine als Inhibitoren der TGT

4.1 Einleitung

Die Einführung des trizyklischen 2-Amino-*lin*-Benzoguanin Grundgerüsts führte zu ersten Inhibitoren der *Z. mobilis* TGT mit Inhibitionskonstanten im zweistellig nanomolaren Bereich [Ritschel, Hörtner et al., 2009]. Während das Grundgerüst in der Guanin-Tasche des aktiven Zentrums bindet, adressieren Substituenten ausgehend von C(2) des Trizyklus die flache, solvensexponierte Ribose33-Tasche (Abbildung 4.1, R₁). Substitution an C(4) ermöglicht die Positionierung von Seitenketten in der vorwiegend hydrophoben Ribose34-Tasche (Abbildung 4.1, R₂).

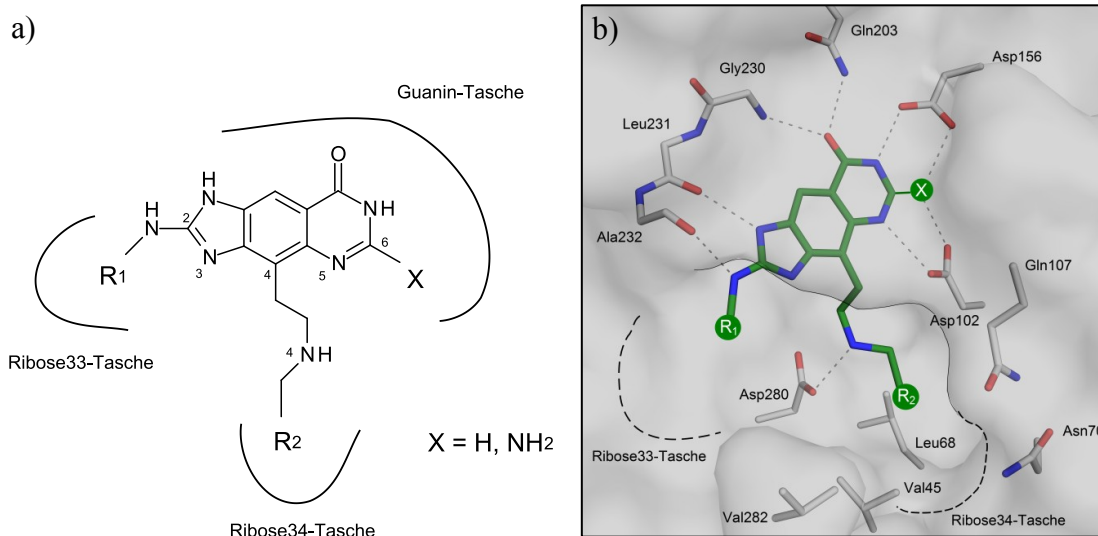


Abbildung 4.1 Darstellung der Ausgangsstruktur, des Substitutionsmusters und der anvisierten Bindetaschen von disubstituierten 2-Amino-*lin*-Benzoguaninen (X = NH₂) und 2-Amino-*lin*-Benzohypoxanthinen (X = H). a) Schematische Darstellung. b) Darstellung im aktiven Zentrum der *Z. mobilis* TGT auf Basis einer Kristallstruktur (PDB ID: 3GE7 [Ritschel, Kohler et al., 2009]).

In vorausgegangenen Arbeiten konnte die Bindungsaffinität der Inhibitoren sowohl durch C(2)-Seitenketten [Ritschel, Hörtner et al., 2009; Hörtner et al., 2007] als auch durch C(4)-Seitenketten [Ritschel, Kohler et al., 2009] erheblich gesteigert werden. In der hier dargestellten Serie von drei disubstituierten 2-Amino-*lin*-Benzoguanin-

Inhibitoren (Tabelle 4.1) sollten nun erstmals alle drei Bindetaschen des aktiven Zentrums gleichzeitig durch den Liganden besetzt werden. Hierbei wurde als C(2)-Substituent eine Phenethyl-Seitenkette gewählt, welche in Interaktion mit den apolaren Resten der Ribose33-Tasche treten sollte. Die angefügten C(4)-Substituenten wurden bereits in einer vorangegangenen Serie von C(4)-monosubstituierten 2-Amino-*lin*-Benzoguaninen als affinitätssteigernd charakterisiert [Ritschel, Kohler et al., 2009]. Im Idealfall könnte sich durch die doppelte Substitution der hier vorgestellten Liganden eine Addition der Affinitätsbeiträge beider Seitenketten ergeben.

Mit einer analogen Zielsetzung wurden für drei Inhibitoren mit 2-Amino-*lin*-Benzohypoxanthin Grundgerüst C(2)- und C(4)-Substituenten kombiniert, welche in vorherigen Studien (siehe Kapitel 3) bereits als affinitätssteigernd charakterisiert worden waren (Tabelle 4.2). Während der C(4)-Substituent hierbei in den drei disubstituierten Verbindungen beibehalten wurde, variiert die C(2)-Seitenkette.

Die im Folgenden dargestellte Studie umfasst die Bestimmung der Bindungsaffinitäten und der Kristallstrukturen aller disubstituierten Inhibitoren gegenüber *Z. mobilis* TGT. Auf diese Weise können die Affinitätsdaten strukturell diskutiert werden. Der Vergleich zu Kristallstrukturen der monosubstituierten Analogliganden der vorausgegangenen Serien deutet hierbei auf kooperative Effekte zwischen C(2)- und C(4)-Seitenkette hin, die zu teils veränderten Bindungsmodi der C(4)-Seitenkette führen. Hierdurch können die teilweise unerwarteten Affinitätstrends strukturell diskutiert werden. Eine weitere Fragestellung dieser Studie war die Charakterisierung struktureller Einflussgrößen auf den Bindungsmodus der C(2)-Seitenketten hinsichtlich Flexibilität bzw. geordneter Bindung innerhalb der Ribose33-Tasche. In diesem Zusammenhang deuten einige der untersuchten Kristallstrukturen auf konformationsstabilisierende Effekt von Wassernetzwerken innerhalb der Ribose33-Tasche hin.

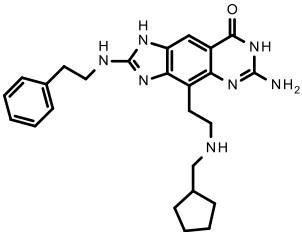
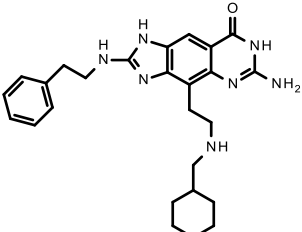
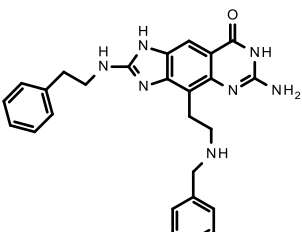
4.2 Resultate

4.2.1 Affinitätsdaten

Die Bindungsaffinitäten der Liganden **27** - **32** gegenüber *Z. mobilis* TGT wurden mittels Thermophorese bestimmt und sind durch die Dissoziationskonstante K_d ausgedrückt (Tabelle 4.1 und 4.2). Die Entfernung der exozyklischen NH_2 -Funktion an C(6) des

2-Amino-*lin*-Benzoguanin Grundgerüsts (Abbildung 4.1) führt zu einem deutlichen Affinitätsverlust der 2-Amino-*lin*-Benzohypoxanthin Liganden **30** - **32** (Tabelle 4.2) gegenüber den hochaffinen 2-Amino-*lin*-Benzoguanin Liganden **27** - **29** (Tabelle 4.1). Innerhalb der Serie disubstituierter 2-Amino-*lin*-Benzoguanine weist Verbindung **27** die höchste Bindungsaffinität auf. Die Erweiterung des terminalen Cyclopentylrestes am C(4)-Substituenten zu einem Cyclohexylrest führt zu einem deutlich verminderten K_d -Wert für Ligand **28** (ca. Faktor 18). Der Austausch des Cyclopentylrings von Ligand **27** gegen einen Phenylrest in Ligand **29** führt hingegen nur zu einem Affinitätsverlust um den Faktor 3.

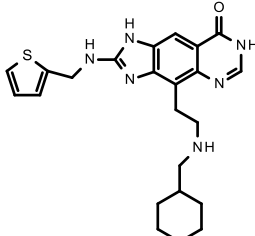
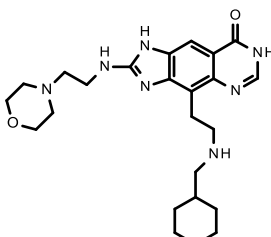
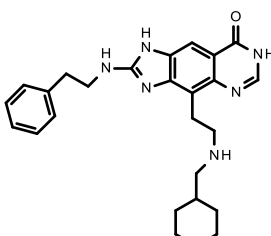
Tabelle 4.1 Dissoziationskonstanten disubstituierter 2-Amino-*lin*-Benzoguanine.

Ligand	Struktur	K_d
27		$0,8 \pm 0,3$ nM
28		$15,1 \pm 5,3$ nM
29		$2,3 \pm 0,3$ nM

Innerhalb der Serie disubstituierter 2-Amino-*lin*-Benzohypoxanthine unterscheiden sich die Verbindungen **30** und **31** nicht signifikant in ihrer Bindungsaffinität. Demgegenüber ist Ligand **32** um etwa den Faktor 2 weniger affin. Der Vergleich der Liganden **28** und **32** unterstreicht den hohen Affinitätsbeitrag der zyklischen Guanidinfunktion im

Pyrimidinanteil des *lin*-Benzoguanin-Kerns. Durch deren Entfernung sinkt die Affinität von **32** gegenüber **28** ca. um den Faktor 130.

Tabelle 4.2 Dissoziationskonstanten disubstituierter 2-Amino-*lin*-Benzohypoxanthine.

Ligand	Struktur	K_d
30		$0,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$
31		$0,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$
32		$2.0 \pm 0,5 \mu\text{M}$

4.2.2 Kristallstrukturen

Für die disubstituierten 2-Amino-*lin*-Benzoguanin-Inhibitoren **27**, **28** und **29** konnten Kristallstrukturen mit einer maximalen Auflösung von 1.53 - 1.97 Å erhalten werden, die eine Analyse des Bindungsmodus der Liganden innerhalb des aktiven Zentrums der *Z. mobilis* TGT ermöglichen (detaillierte Informationen zu Datensätzen und Verfeinerungsstatistiken siehe Appendix). Während die Inhibitoren **27** und **28** kokristallisiert wurden, musste Ligand **29** aufgrund deutlich verschlechterter Diffraktionseigenschaften der Kokristalle durch *soaking* in die Bindetasche eingebracht werden (siehe Material und Methoden, Abschnitt 9.9.1).

Die untersuchten Liganden **27**, **28** und **29** basieren auf einem trizyklischen 2-Amino-*lin*-Benzoguanin Grundgerüst und weisen das bereits in vorhergehenden Arbeiten beschriebene Wechselwirkungsprofil gegenüber der Guanin-Tasche auf [Ritschel, Kohler et al., 2009; Hörtner et al., 2007]. Hierbei bildet der Ligand H-Brücken zu den Seitenketten von Asp102, Asp156 und Gln203, sowie zu den Rückgratatomen von Gly230, Leu231 und Ala232 aus (Abbildungen 4.1b). Unter Berücksichtigung der experimentell und *in silico* bestimmten pKa-Werte des 2-Amino-*lin*-Benzoguanin Grundgerüsts kann die Imidazol-Partialstruktur des Trizyklus als protoniert angenommen werden [Ritschel, Hörtner et al., 2009], wodurch sich eine Ladungsunterstützung für die H-Brücke zu Leu231 ergibt. Ferner handelt es sich bei der Interaktion zwischen N(5) des Trizyklus und Asp102 wahrscheinlich um eine Salzbrücke - aufgrund der unter Kristallisationsbedingungen (pH 5.5) deprotonierten Carbonsäure von Asp102 aber mindestens um eine weitere ladungsgestützte H-Brücke (siehe Kapitel 5). Das trizyklische Grundgerüst wechselwirkt weiterhin über eine π -stacking Interaktion mit den beidseits flankierenden Seitenketten von Tyr106 und Met260 (Abbildungen 4.2b und 4.3b).

Der Substituent an C(4) des Trizyklus ist in die Ribose34-Untertasche gerichtet, wobei eine Ethenbrücke die Positionierung der protonierbaren, sekundären Amin-Funktion zwischen den Carboxylat-Funktionen von Asp102 und Asp280 ermöglicht (Abbildung 4.1b). Durch den auf diese Weise fixierten Vektor werden die zyklischen, hydrophoben Termini der C(4)-Substituenten von **27** - **29** in den von apolaren Resten geformten Teil der Ribose34-Tasche positioniert.

Die Kokristallstruktur mit Ligand **27** weist bei einer maximalen Auflösung von 1.53 Å eine $|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte auf, die den gesamten Liganden definiert (Abbildung 4.2a). Für die Phenethyl-Seitenkette an C(2) des Trizyklus ist aus der weniger scharf abgegrenzten Elektronendichte eine erhöhte Flexibilität dieses in der flachen, solvensexponierten Ribose33-Tasche gebundenen Molekülanteils abzuleiten. Unterstützt wird dieser Eindruck durch den Vergleich der durchschnittlichen B-Werte des Phenylrestes gegenüber dem gesamten Ligandmolekül ($B_{\text{Phenyl}} = 54.3 \text{ \AA}^2$, $B_{\text{Ligand}} = 25.7 \text{ \AA}^2$). Trotz dieser erhöhten Flexibilität interagiert die C(2)-Seitenkette geordnet mit der apolaren Ribose34-Tasche über van-der-Waals Kontakte zu den Seitenketten von Ala232, Cys281, Val282 und Leu283. Hierbei liegt der Phenylrest des Liganden diesen Seitenketten deckelartig auf (Abbildung 4.2b). Innerhalb der Ribose33-

Tasche fällt außerdem ein kristallographisch geordnetes Wassernetzwerk (A - D) auf, welches die Phenethyl-Seitenkette des Liganden ummantelt (Abbildung 4.2b). Wasser B und C bilden hierbei Kontakte von ca. 3.3 Å zum Phenylrest der Seitenkette. Wasser A formt eine wahrscheinlich ladungsgestützte H-Brücke zu Asp267 (2.8 Å) sowie eine weitere H-Brücke zu Wasser B (2.5 Å). Wasser B interagiert mit der C=O Funktion von Gly261 (2.9 Å). Wasser C weist vier Wechselwirkungspartner auf. Hierbei formt es H-Brücken zur Thiolgruppe von Cys281 (3.1 Å), zur C=O Funktion von Gly261 (3.3 Å), zur N-H Funktion von Val282 (3.1 Å) und zu Wasser D (3.0 Å). Wasser D interagiert darüber hinaus durch zwei H-Brücken mit N(3) und N(4) des Liganden (2.8 Å, 3.0 Å). Der terminale Cyclopentylring der C(4)-Substituenten geht van-der-Waals Kontakte zu den Seitenketten von Val45, Leu68 und Val282 ein (Abbildung 4.2a).

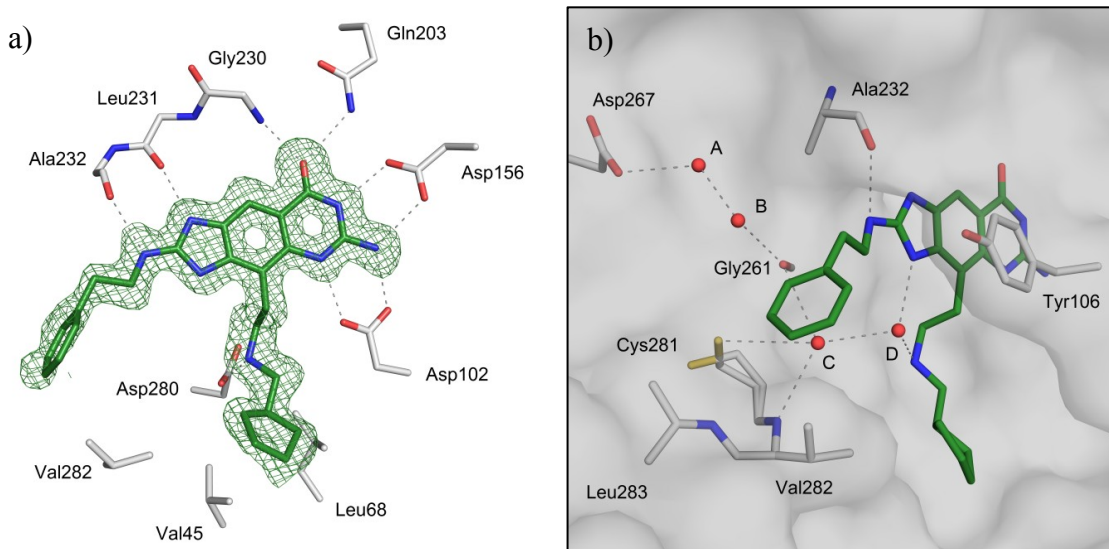


Abbildung 4.2 Kokristallstruktur von Ligand 27 in Komplex mit TGT (PDB ID: 4GKT). Farbcode: C_{Protein} und Proteinoberfläche grau, C_{Ligand} grün, O rot, N blau, Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt. H-Brücken sind als unterbrochene Linien illustriert. Die $|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichte ist bei 2.0σ als grünes Netz angezeigt. Diese Parameter gelten, falls nicht abweichend angegeben, für alle Abbildungen dieses Kapitels. a) Das trizyklische Grundgerüst des Liganden bindet in der Guanin-Tasche über H-Brücken (2.7-3.0 Å), während der Cyclopentylring hydrophobe Wechselwirkungen mit Val45, Leu68 und Val282 eingeht (3.3-4.1 Å). Die Phenethyl-Seitenkette an C(2) des Trizykus weist eine weniger scharf abgegrenzte Differenzelektronendichte auf. b) Bindungsmodus der Phenethyl-Seitenkette innerhalb der Ribose33-Tasche. Die dargestellte Proteinoberfläche verdeutlicht, dass das trizyklische Grundgerüst und der C(4)-Substituent in tief vergrabenen Taschen binden, während die Phenethyl-Seitenkette stärker solvens exponiert ist. Der Phenylring bildet hydrophobe Kontakte (3.3-4.6 Å) zu Cys281, Val282 und Leu283 (Seitenkette kristallographisch ungeordnet). Ein Wassernetzwerk (A - D) umgibt den Phenylring der C(2)-Seitenkette.

Val45 nimmt hierbei eine kristallographisch konservierte Orientierung ein, die bereits in Kapitel 2 als bestimmend für den kristallographischen Ordnungszustand des nachfolgenden $\beta 1\alpha 1$ -loop/Helix $\alpha 1$ charakterisiert wurde. Der kokristallisierte Ligand **27** hat hierbei keinen Einfluss auf die konservierte Anordnung des $\beta 1\alpha 1$ -loop/Helix $\alpha 1$ (Abbildung 4.9a).

Die Kokristallstruktur mit Inhibitor **28** konnte mit einer maximalen Auflösung von 1.75 Å bestimmt werden (Abbildung 4.3).

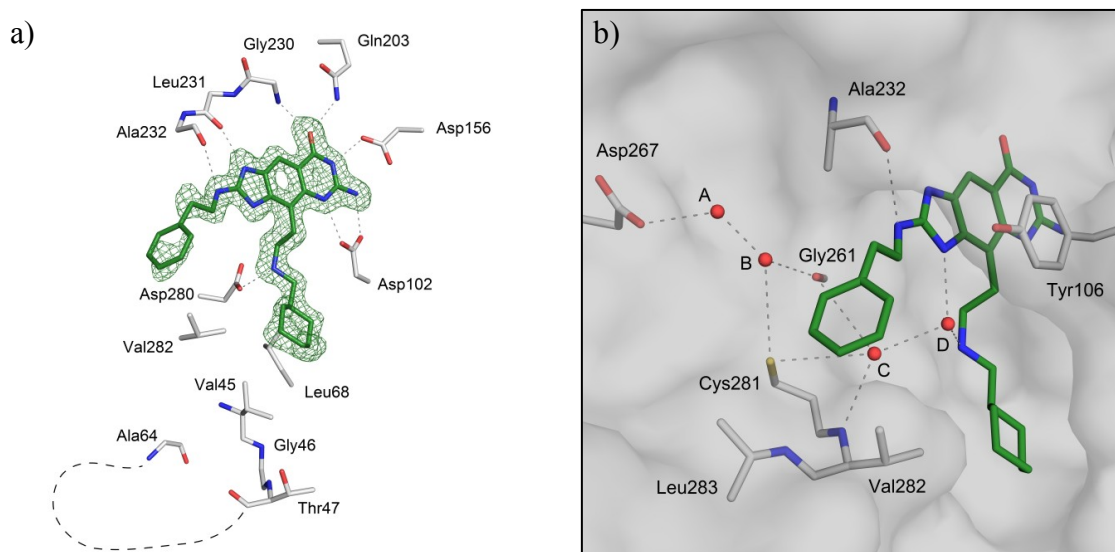


Abbildung 4.3 Kokristallstruktur von Ligand **28** in Komplex mit TGT (PDB ID: 4GIY). a) Das trizyklische Grundgerüst des Liganden bindet in der Guanin-Tasche über H-Brücken (2.7-3.0 Å), während der Cyclohexylring des C(4)-Substituenten hydrophobe Wechselwirkungen mit Leu68 und Val282 eingeht (3.4-4.0 Å). Die Phenethyl-Seitenkette an C(2) des Trizyklus ist trotz reduzierter Differenzelektronendichte definierbar. Der Ligand induziert eine alternative Konformation von Val45. Kausal nehmen Gly46 und Thr47 alternative Orientierungen ein. Die weiteren Reste des $\beta 1\alpha 1$ -loop/Helix $\alpha 1$ (Ala48-Gly63) sind kristallographisch ungeordnet und nicht durch eindeutige Elektronendichte definierbar (illustriert als unterbrochene Linie). b) Bindungsmodus der Phenethyl-Seitenkette innerhalb der Ribose33-Tasche. Der Phenylring bildet hydrophobe Kontakte (3.3-4.4 Å) zu Cys281, Val282 und Leu283 (Seitenkette kristallographisch ungeordnet). Ein Wassernetzwerk (A - D) umgibt den Phenylring der C(2)-Seitenkette.

Analog zu Inhibitor **27** lässt die $|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichte die Definition des gesamten Ligandmoleküls innerhalb des aktiven Zentrums zu. Die in der Ribose33-Tasche gebundene Phenethyl-Seitenkette von **28** weist eine erhöhte Flexibilität gegenüber den weiteren Atomen des Ligandmoleküls auf, welches sich aus einer weniger differenzierten Elektronendichte und erhöhten mittleren B-Werten ableiten lässt

($B_{\text{Phenyl}} = 35.9 \text{ \AA}^2$, $B_{\text{Ligand}} = 18.8 \text{ \AA}^2$). Die Orientierung des Phenylrestes der C(2)-Seitenkette von **28** ist vergleichbar mit der von Ligand **27**, wobei der Phenylrest auch in dieser Struktur über van-der-Waals Wechselwirkungen mit Ala232, Cys281, Val282 und Leu283 interagiert (Abbildung 4.3b).

Die C(2)-Seitenkette von **28** wird auch hier von einem Wassernetzwerk (A - D) umgeben, wobei die Positionen der beteiligten Wechselwirkungspartner gegenüber der Komplexstruktur mit **27** innerhalb der Ribose33-Tasche konserviert sind (Abbildung 4.3b und 4.9a). Die Carbonsäurefunktion von Asp267 bildet eine vermutlich ladungsgestützte H-Brücke zu Wasser A (2.8 Å), das außerdem mit Wasser B interagiert (2.4 Å). Wasser B steht in engem Kontakt zum Phenylrest der Ligandseitenkette (3.1 Å) und interagiert weiterhin mit der C=O Funktion von Gly261 (2.7 Å) und der Thiolgruppe von Cys281 (3.7 Å). Wasser C flankiert den Phenylrest der C(2)-Seitenkette des Liganden (3.9 Å) und bildet ferner H-Brücken zur Thiolgruppe von Cys281 (3.7 Å), zur C=O Funktion von Gly261 (3.6 Å), zur N-H Funktion von Val282 (3.0 Å) und zu Wasser D (2.9 Å). Letztgenanntes wechselwirkt über zwei weitere H-Brücken mit N(3) und N(4) des Liganden (2.8 Å, 2.9 Å).

Der C(4)-Substituent des trizyklischen Ligandgrundgerüsts weist einen terminalen Cyclohexyrling auf, der in gut definierter Sesselkonformation im apolaren Bereich der Ribose34-Tasche positioniert ist und hier über van-der-Waals Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Leu68 und Val282 interagiert (Abbildung 4.3a). Die Orientierung von Val45 ist gegenüber der Kokristallstruktur von Inhibitor **27** ligandinduziert verschoben, wodurch sich Val45 auf ca. 4.3 Å vom Cyclohexyrling entfernt (Abbildung 4.9a). Kausal zu dieser veränderten Orientierung variieren auch die Positionen von Gly46 und Thr47, die sich auf der N-terminalen Seite des $\beta 1\alpha 1$ -loop befinden. Für die nachfolgenden Reste des *loop* (Ala48-Leu54) und der angrenzenden Helix $\alpha 1$ (Lys55-Gly63) ist keine definierte Elektronendichte zu erkennen, woraus sich eine erhöhte Flexibilität dieser Substruktur bzw. deren Aufspaltung in zahlreiche teilbesetzte Konformationen ableiten lässt.

Die $|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichte der *soaking*-Struktur mit Inhibitor **29** (maximale Auflösung 1.97 Å) definiert den Liganden nur teilweise (Abbildung 4.4). Während das trizyklische Grundgerüst und der C(4)-Substituent in der Elektronendichte sichtbar sind, ist die an C(2) substituierte Phenethyl-Seitenkette auch bei niedrigem *contour level*

nicht klar detektierbar. Gegenüber den oben dargestellten Komplexstrukturen von **27** und **28** erscheint die C(2)-Seitenkette in **29** kristallographisch deutlich ungeordneter bzw. über multiple, teilbesetzte Konformationen aufgespalten. Während die Wasserpositionen C und D auch in Struktur **29** besetzt sind, sind Wasser A und B in der Elektronendichtekarte nicht detektierbar, was möglicherweise die Folge einer Verdrängung durch die flexible C(2)-Seitenkette von **29** ist (Abbildung 4.10). Der terminale Phenylrest des C(4)-Substituenten bindet innerhalb der Ribose34-Tasche abweichend von dem oben dargestellten Cyclopentyl- bzw. Cyclohexyling der Liganden **27** und **28**. Während die Cycloalkylreste von **27** und **28** tief in die Ribose34-Tasche eintauchen, liegt der Phenylrest von **29** deckelartig den apolaren Resten der Tasche auf (Abbildung 4.4). Hierbei entstehen van-der-Waals Kontakte zu Val45, Leu68 und Val282. Die kristallographisch konservierte Orientierung von Val45 sowie der hohe Ordnungszustand des nachfolgenden $\beta 1\alpha 1$ -loop werden hierbei durch den Liganden nicht beeinflusst.

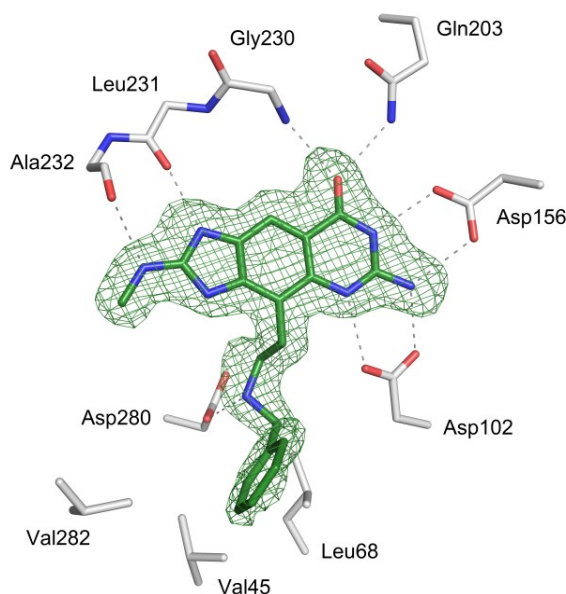


Abbildung 4.4 Soaking-Kristallstruktur von Ligand **29** in Komplex mit TGT (PDB ID: 4GI4). Die Differenzelektronendichte definiert das trizyklische Grundgerüst und den C(4)-Substituenten des Liganden während die in die Ribose33-Tasche gerichtete Phenethyl-Seitenkette an C(2) des Trizyklus nicht detektierbar ist. Der Ligand interagiert mit der Guanin-Tasche über H-Brücken (2.6-3.0 Å). Der terminale Phenylring der C(4)-Seitenkette bildet hydrophobe Kontakte zu Val45, Leu68 und Val282 (3.3-4.1 Å). Val45 nimmt die kristallographisch konservierte Orientierung am Boden der Ribose34-Tasche ein. Die nachfolgende, geordnete $\beta 1\alpha 1$ -loop/Helix $\alpha 1$ Substruktur ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Für die disubstituierten *lin*-Benzohypoxanthin-Inhibitoren **30** - **32** konnten Kokristallstrukturen mit einer maximalen Auflösung von 1.45 - 2.06 Å bestimmt werden. Die kokristallisierten Liganden basieren auf dem bereits in Kapitel 3 eingeführten 2-Amino-*lin*-Benzohypoxanthin Grundgerüst, welches sich vom *lin*-Benzoguanin durch den Wegfall der exozyklischen NH₂-Gruppe an C(6) des Trizyklus unterscheidet (Abbildung 4.1). Hieraus ergibt sich ein im Vergleich zu oben beschriebenen *lin*-Benzoguaninen **27** - **29** verändertes Interaktionsprofil des aromatischen Trizyklus innerhalb der Guanin-Tasche. Infolge des Wegfalls der zyklischen Guanidino-Funktion des Liganden wird die gerichtete Wechselwirkung zu Asp102 nicht aufgebaut. Alternativ nimmt Asp102 eine der Guanintasche abgewandte, zur Ringebene geneigte Orientierung ein (Abbildungen 4.5a, 4.6, 4.7). Die übrigen, oben beschriebenen Interaktionen zwischen trizyklischem Grundgerüst und Guanin-Tasche werden auch von den hier vorgestellten 2-Amino-*lin*-Benzohypoxanthinen **30** - **32** ausgebildet. Ebenfalls analog ist das Substitutionsmuster des trizyklischen Grundgerüsts der Liganden **30** - **32**, wobei Substituenten an C(2) in die Ribose33-Tasche reichen, während C(4)-Substituenten in die Ribose34-Tasche gerichtet sind.

Die Differenzelektronendichte der Komplexstruktur mit Ligand **30** (maximale Auflösung 1.48 Å) definiert das gesamte Ligandmolekül innerhalb des aktiven Zentrums (Abbildung 4.5a). Der Cyclohexylring des C(4)-Substituenten liegt auch in dieser Struktur in der Sesselkonformation vor und bindet in der Ribose34-Tasche über van-der-Waals Kontakte zu Val45, Leu68 und Val282. Hierbei ist Val45 in dieser Kokristallstruktur nicht durch den Liganden aus der kristallographisch konservierten Orientierung gedrängt (Abbildung 4.5a und 4.11). Der Cyclohexylring von **30** nimmt hingegen Einfluss auf die Orientierung von Thr47, das nun in einer alternativen Konformation vorliegt (Abbildung 4.11). Die weiteren Reste des β 1a1-*loop* werden weder durch den Liganden noch durch die ligandinduzierte Thr47-Orientierung beeinflusst. Der Thiophenring der C(2)-Seitenkette ist in der Ribose33-Tasche positioniert und bildet eine lange H-Brücke zu Tyr106 aus (3,8 Å, Abbildung 4.5b). Darüber hinaus besteht eine schwache hydrophobe Wechselwirkung zur Seitenkette von Ala232. Die gegenüber dem Durchschnittswert des gesamten Liganden erhöhten mittleren B-Werte des Thiophenrings deuten auch hier einen Bindungsmodus mit Restflexibilität des Liganden in der Ribose33-Tasche an ($B_{\text{Thiophen}} = 47.2 \text{ \AA}^2$, $B_{\text{Ligand}} = 24.3 \text{ \AA}^2$). Vergleichbar zu den Phenethyl-Seitenketten von **27** und **28** ist die

Thiophenylmethyl-Seitenkette in **30** durch ein Wassernetzwerk umgeben, das allerdings noch um die zwei Wassermoleküle E und F erweitert ist (Abbildung 4.5b). Wasser A formt H-Brücken zur Seitenkette von Asp267 (2.3 Å), zum Rückgrat von Lys264 (2.9 Å) und zu Wasser B (2,7 Å). Wasser B steht in engem Kontakt zum Thiophenring des Liganden (3.0 Å) und interagiert außerdem mit der C=O Funktion von Gly261 (2.6 Å) und Wasser E (3.2 Å). Letztgenanntes formt eine weitere H-Brücke zur Thiolgruppe von Cys281 (3.0 Å) und flankiert das Thiophen der C(2)-Seitenkette (4.0 Å). Wasser F ummantelt diesen ebenfalls (4.2 Å) und interagiert weiterhin mit der Seitenkette von Cys281 (3.0 Å) und Wasser C (2.4 Å). Dies bildet zwei weitere H-Brücken zum Rückgrat von Val282 (2.6 Å) und Wasser D (3.1 Å). Außerdem komplettiert Wasser C die Hülle von kristallographisch geordneten Wassermolekülen um den Thiophenring (4.2 Å). Wasser D wechselwirkt durch zwei H-Brücken mit N(3) und N(4) des Liganden (2.9 Å, 3.1 Å).

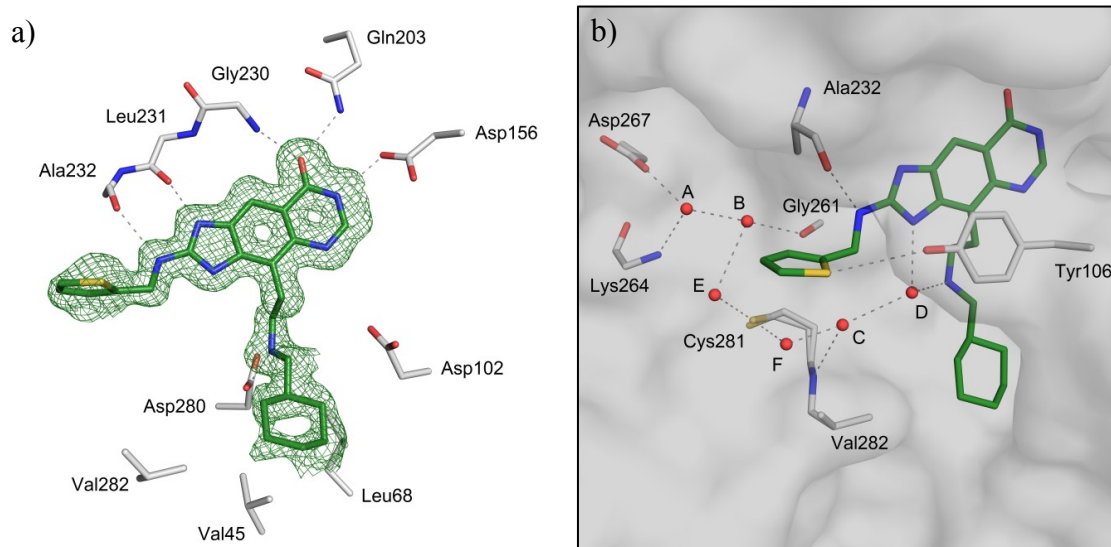


Abbildung 4.5 Kokristallstruktur von Ligand **30** in Komplex mit TGT (PDB ID: 4GG9). a) Die Differenzelektronendichte definiert den gesamten Liganden. Durch den Wegfall der exozyklischen NH₂-Gruppe an C(6) des Benzopurinkerns bildet Asp102 keine Wechselwirkung zum Trizyklus aus und verbleibt in einer geneigten, den C(4)-Substituenten flankierenden Orientierung. Es werden sechs, teilweise ladungsgestützte H-Brücken zwischen Guanin-Tasche und Ligand ausgebildet (2.7-2.9 Å). Der Cyclohexylring des C(4)-Substituenten formt hydrophobe Kontakte zu Val45, Leu68 und Val282 (3.6-3.8 Å). Val45 nimmt die kristallographisch konservierte Orientierung am Boden der Ribose34-Tasche ein. b) Bindungsmodus der Thiophenomethyl-Seitenkette innerhalb der Ribose33-Tasche. Der Thiophen-Schwefel interagiert über eine H-Brücke (3.8 Å) mit Tyr106 und bildet einen hydrophoben Kontakt zur Seitenkette von Ala232 (4.2 Å). Ein sechsgliedriges Wassernetzwerk (A - F) umgibt den Thiophenring.

Die Kokristallstruktur mit Inhibitor **31** konnte mit einer maximalen Auflösung von 1.45 Å bestimmt werden (Abbildung 4.6). Im Gegensatz zu den übrigen Anteilen des Ligandmoleküls ist die Morpholinoethyl-Seitenkette an C(2) des Trizyklus in der $|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte unabhängig vom eingestellten *contour level* nicht detektierbar und kann daher als flexibel bzw. über multiple Konformationen verteilt angenommen werden. Der terminale Cyclohexylring des C(4)-Substituenten geht hydrophobe Kontakte zu Val45, Leu68 und Val282 ein. In Analogie zu Struktur **30** entspricht die Val45-Orientierung der kristallographisch konservierten Konformation ohne Anzeichen einer Repulsion durch den Cyclohexylring (Abbildungen 4.6 und 4.11). Die bereits für die Struktur **30** beschriebene alternative Konformation von Thr47 tritt auch in der Struktur **31** - ohne Beeinflussung des Ordnungszustandes des $\beta 1\alpha 1$ -loop - auf (Abbildung 4.11).

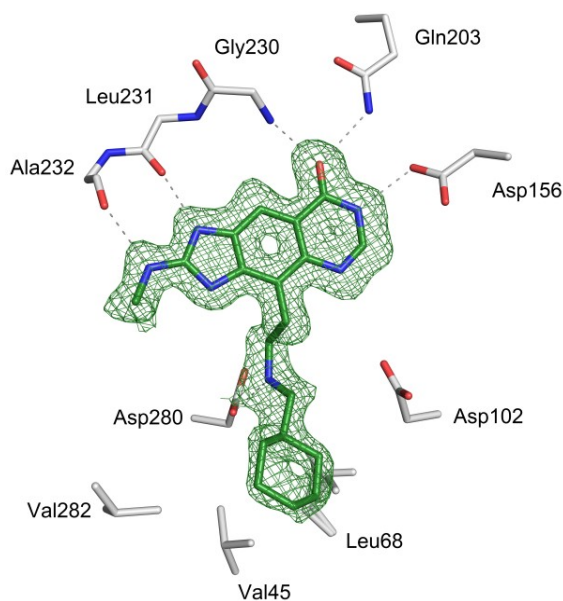


Abbildung 4.6 Kokristallstruktur von Ligand **31** in Komplex mit TGT (PDB ID: 4GH1). Die Differenzelektronendichte definiert das trizyklische Grundgerüst und den C(4)-Substituenten des Liganden während die Morpholinoethyl-Seitenkette an C(2) des Trizyklus nicht detektierbar ist. Asp102 nimmt eine geneigte Orientierung ohne Wechselwirkung zum Benzopurin-Kern des Liganden ein. Der Ligand interagiert mit der Guanin-Tasche über H-Brücken (2.7-2.9 Å). Der terminale Cyclohexylring der C(4)-Seitenkette bildet hydrophobe Kontakte zu Val45, Leu68 und Val282 (3.3-3.8 Å).

Die $|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte der Kokristallstruktur mit Ligand **32** (maximale Auflösung 2.06 Å) definiert das trizyklische Grundgerüst des Liganden eindeutig, während die C(2)-Seitenkette nicht und die C(4)-Seitenkette nur unvollständig

detektierbar sind (Abbildung 4.7). Für die entsprechenden Molekülteile kann folglich eine erhöhte Flexibilität angenommen werden. Val45 und die nachfolgenden $\beta 1\alpha 1$ -loop/ Helix $\alpha 1$ werden durch den kokristallisierten Liganden **32** nicht aus der kristallographisch konservierten Ordnung gedrängt. Demgegenüber steht die fehlende Elektronendichte für den Cyclohexylring der C(4)-Seitenkette.

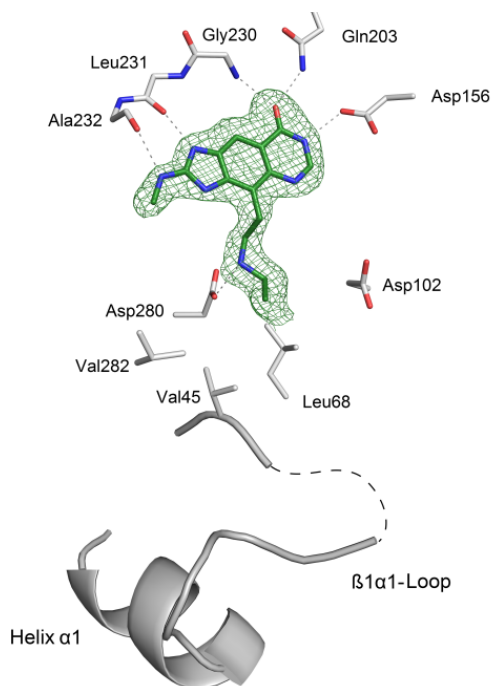


Abbildung 4.7 Kokristallstruktur von Ligand **32** in Komplex mit TGT (PDB ID: 4GH3). Während weite Teile des Ligandmoleküls durch die Differenzelektronendichte definiert sind, ist die C(2)-Seitenkette sowie der terminale Cyclohexylring des C(4)-Substituenten auch bei niedrigem *contour leveln* nicht detektierbar. Die sichtbaren Anteile des Liganden bilden H-Brücken zur Guanin-Tasche aus (2.7-2.8 Å). Val45 liegt in einer kristallographisch konservierten Orientierung vor. Der nachfolgende $\beta 1\alpha 1$ -loop und Helix $\alpha 1$ (gezeigt als cartoon) sind in ihrer kristallographischen Ordnung durch den Liganden unbeeinflusst. Lediglich Thr47 und Ala48 sind in der Elektronendichtekarte nicht detektierbar (angedeutet durch unterbrochene Linie).

4.3 Diskussion

Der Vergleich der Bindungsaffinitäten der disubstituierten Liganden **27** - **29** mit den in vorhergehenden Arbeiten charakterisierten C(4)-monosubstituierten Analoga ergibt unerwartete Veränderungen der Affinitätstrends innerhalb der Ligandserien. Für die C(4)-monosubstituierten Verbindungen (Abbildung 4.1, $R_1 = \text{CH}_3$, $X = \text{NH}_2$) ergaben sich absteigende Bindungsaffinitäten [Ritschel, Kohler et al., 2009]:

$R_2 = \text{Cyclopentyl}$ ($K_i = 2 \text{ nM}$) > $R_2 = \text{Cyclohexyl}$ ($K_i = 4 \text{ nM}$) > $R_2 = \text{Phenyl}$ ($K_i = 25 \text{ nM}$).

Beide Serien sind konsistent hinsichtlich der höchsten Bindungsaffinität für die Liganden mit einem Cyclopentylring in der Ribose34-Tasche. Aus der Überlagerung der Komplexstruktur von **27** mit dem analogen C(4)-monosubstituierten Liganden (PDB ID: 3GE7 [Ritschel, Kohler et al., 2009]) geht hierbei eine übereinstimmende Positionierung des trizyklischen Grundgerüsts beider Liganden in der Guanin-Tasche hervor (Abbildung 4.8).

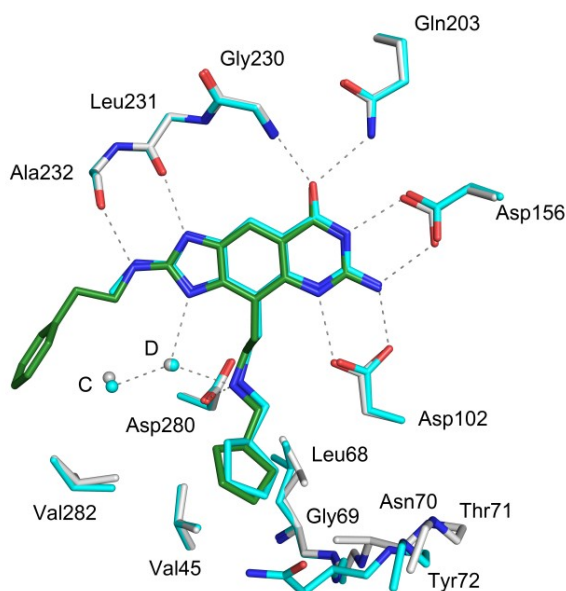


Abbildung 4.8 Kristallstruktur von Ligand **27** (PDB ID: 4GKT, Wasser: graue Kugeln) überlagert mit der Komplexstruktur des C(4)-monosubstituierten Analogliganden (PDB ID: 3GE7 [Ritschel, Kohler et al., 2009], $C_{\text{Protein/Ligand}}$ cyan, Wasser: cyanfarbene Kugeln) nach einer $C\alpha$ -Alinierung der Guanin-Taschen beider Strukturen. Der terminale Cyclopentylring des C(4)-Substituenten von **27** ist im Vergleich minimal tiefer in der Ribose34-Tasche vergraben, wodurch sich engere hydrophobe Kontakte zu Val45, Leu68 und Val282 ergeben. Die Proteinhauptkette von Gly69-Tyr72 ist in Struktur **27** etwa 2 Å verschoben, wobei die Seitenkette von Asn70 im Unterschied zur Vergleichsstruktur kristallographisch ungeordnet ist. Die Wassermoleküle C und D sind im Vergleich beider Strukturen minimal versetzt.

Diskrete Unterschiede zeigen sich in der Konformation des Cyclopentylrings in der Ribose34-Tasche, welcher bei **27** um etwa 0.2 Å in die Tasche verschoben ist. Hieraus resultieren für **27** kürzere van-der-Waals Kontakte zu den apolaren Seitenketten der Ribose34-Tasche als in der Vergleichsstruktur (Val45: 3.7 Å / 3.8 Å, Leu68: 3.3 Å / 3.8 Å, Val282: 4.1 Å / 4.7 Å). Der leicht verschobene Cyclopentylring von **27** hat

außerdem strukturellen Einfluss auf die Seitenkette von Asn70. Anders als in der Vergleichsstruktur ist diese vermutlich infolge einer leichten Repulsion durch den Liganden kristallographisch ungeordnet. Ferner ist die Proteinhauptkette der Reste Gly69 - Tyr72 um etwa 2 Å taschenerweiternd verschoben. Die Wassermoleküle C und D sind in beiden Strukturen vorzufinden, wobei in Struktur **27** beide Moleküle vermutlich durch die potentiell engen Kontakte zum C(2)-Phenethyl-Substituenten um etwa 0.2 Å versetzt sind. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen verschobenen Wassermolekülen C und D und der alternativen Cyclopentyl-Konformation von **27** ist mit Blick auf repulsive Interaktionen dagegen nicht feststellbar.

Ligand **28** unterscheidet sich von **27** nur am Terminus des C(4)-Substituenten. Der Austausch des Cyclopentyl- durch einen Cyclohexylring führt allerdings zu einer ca. um den Faktor 18 reduzierte Bindungsaffinität während sich die C(4)-monosubstituierten Analogverbindungen nur um den Faktor 2 unterscheiden [Ritschel, Kohler et al., 2009]. Die verschlechterte Affinität von **28** gegenüber **27** ist mit Blick auf die repulsiven Wechselwirkungen zwischen dem Cyclohexylring des C(4)-Substituenten und der Seitenkette von Val45 erklärbar, welche bei der Bindung von **27** nicht auftreten (Abbildungen 4.9a). In Kapitel 2 wurde gezeigt, dass Val45 und der nachfolgenden $\beta 1\alpha 1$ -loop/Helix $\alpha 1$ -Bereich in Lösung flexibel vorliegen und erst während der Kristallisation einen höheren Ordnungszustand einnehmen. Aufgrund der kristallographischen Befunde ist anzunehmen, dass der Cyclohexylring von **28** die konformativen Freiheitsgrade von Val45 auch in Lösung einschränkt, während der sterisch weniger anspruchsvolle Ligand **27** diesbezüglich zu keinen Begrenzungen führt.

Die Überlagerung von **28** mit der C(4)-monosubstituierten Analogstruktur (PDB ID: 3EOS [Ritschel, Kohler et al., 2009]) weist eine zunächst überraschende Verschiebung des Cyclohexylrings in der Ribose34-Tasche auf (Abbildung 4.9b). Hierbei ist der Cyclohexylring des einfach substituierten Liganden um etwa 0.5 Å weniger tief in der Ribose34-Tasche vergraben, was für die Seitenkette von Val45 den benötigten Platz zur Einnahme der kristallographisch konservierten Position schafft. Folglich sind auch der nachfolgende $\beta 1\alpha 1$ -loop sowie Helix $\alpha 1$ in dieser Struktur durch entsprechende Elektronendichte klar definiert. Die Wassermoleküle C, D und G sind im Vergleich beider Strukturen vermutlich unter dem Einfluss der Phenethyl-Seitenkette von **28** leicht verschoben. Die Positionen von Wasser D und G aus der Struktur mit **28**

würden dabei allerdings zu keinen repulsiven Kontakten mit dem Cyclohexylring in der Konformation des C(4)-monosubstituierten Liganden führen. Die Wasserverschiebung in der Ribose34-Tasche kann folglich nicht als Ursache der Cyclohexyl-Verschiebung von **28** interpretiert werden.

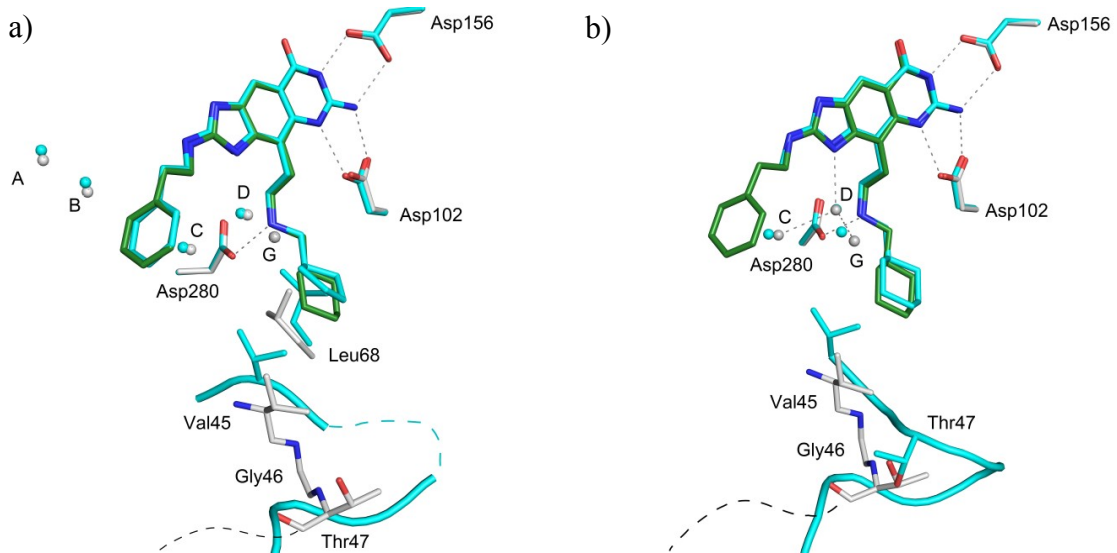


Abbildung 4.9 Kokristallstruktur von Ligand **28** (PDB ID: 4GIY, Wasser: graue Kugeln) überlagert mit a) Kokristallstruktur von Ligand **27** (PDB ID: 4GKT, $C_{\text{Protein/Ligand}}$ und cartoon: cyan, Wasser: cyanfarbene Kugeln) und b) *Soaking*-Struktur des monosubstituierten Analogons von **28** (PDB ID: 3EOS [Ritschel, Kohler et al., 2009], $C_{\text{Protein/Ligand}}$ und cartoon: cyan, Wasser: cyanfarbene Kugeln) jeweils nach einer α -Alinierung der Guanin-Taschen der Strukturen. Ligand **28** wirkt repulsiv auf Val45 und überführt die Reste Val45-Thr47 in eine aus der Ribose34-Tasche gerichtete Orientierung. Der nachfolgende $\beta 1\alpha 1$ -loop und Helix $\alpha 1$ sind in der Folge kristallographisch ungeordnet (angedeutet durch unterbrochene schwarze Linie). a) Der Cyclopentylring von **27** lässt im Gegensatz zum Cyclohexylring in **28** eine der Ribose34-Tasche zugewandte Konformation von Val45 zu, wodurch ein weitgehend geordnetes Arrangement des $\beta 1\alpha 1$ -loop/Helix $\alpha 1$ ermöglicht wird (*loop* gezeigt als cartoon, kristallographisch ungeordnetes Thr47 und Ala48 als unterbrochene cyanfarbene Linie gezeigt) Die den Phenylrest der C(2)-Seitenkette umgebenden Wassermoleküle A - D sind in beiden Strukturen konserviert. b) Der Cyclohexylring von Ligand **28** dringt etwa 0.5 Å tiefer in die Ribose34-Tasche ein. In der *soaking*-Struktur 3EOS nimmt Val45 die kristallographisch konservierte Position ein, welche eine geordnete Ausbildung des $\beta 1\alpha 1$ -loop/Helix $\alpha 1$ ermöglicht (*loop* gezeigt als cartoon). Die Wasserpositionen C, D und G sind zwischen beiden Strukturen geringfügig versetzt.

Viel wahrscheinlicher ist hingegen der Einfluss des Kristallisationsprotokolls. Während **28** mit dem Protein kokristallisiert wurde, ist der einfach substituierte Analogligand durch *soaking* in Proteinkristalle eingebracht worden. In Kapitel 2 konnte gezeigt werden, dass ein entsprechend konstituierter Ligand zwar die geordnete Formierung des $\beta 1\alpha 1$ -loop/Helix $\alpha 1$ während der Kristallisation stören kann, die einmal formierten gerichteten Wechselwirkungen im Dimer *interface* aber nicht wieder aufbricht. Vor

diesem Hintergrund ist anzunehmen, dass der verschobene Cyclohexylring von Ligand **28** ein rein kristallographisches Phänomen ist und folglich keine signifikanten Unterschiede zwischen **28** und der Vergleichsverbindung hinsichtlich des Bindungsmodus innerhalb der Ribose34-Tasche bestehen. Für eine abschließende Klärung sollte aber in einer zukünftigen Arbeit versucht werden, eine Kokristallstruktur des C(4)-monosubstituierten Liganden zu erhalten.

In der oben beschriebenen Serie einfach substituierter 2-Amino-*lin*-Benzoguanine (Abbildung 4.1, $R_1 = \text{CH}_3$, $X = \text{NH}_2$) ist die Affinität des Liganden mit dem Substituent $R_2 = \text{Phenyl}$ am geringsten und um ca. den Faktor 12 gegenüber der affinsten Verbindung dieser Serie ($R_2 = \text{Cyclopentyl}$) reduziert. Der Vergleich der analogen, disubstituierten Liganden **27** und **29** zeigt den dagegen nur geringgradigen Affinitätsverlust um ca. den Faktor 3. Die Überlagerung von **29** mit der an C(4) einfach substituierten Analogverbindung (PDB ID: 3GC4 [Ritschel, Kohler et al., 2009]) weist einen weitgehend gleichen Bindungsmodus für beide Liganden auf (Abbildung 4.10).

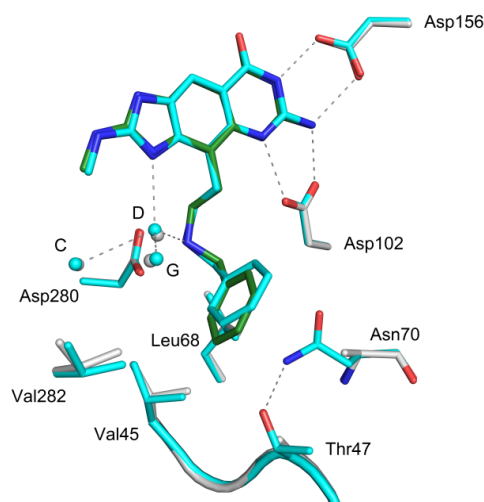


Abbildung 4.10 Kristallstruktur von Ligand **29** (PDB ID: 4GI4, Wasser: graue Kugeln) überlagert mit Komplexstruktur des monosubstituierten Analogliganden (PDB ID: 3GC4 [Ritschel, Kohler et al., 2009], $C_{\text{Protein/Ligand}}$ und cartoon cyan, Wasser: cyanfarbene Kugeln) nach einer $C\alpha$ -Alinierung der Guanin-Taschen beider Strukturen. Der terminale Phenylring des C(4)-Substituenten von **29** ist ca. 1 Å in die Ribose34-Tasche verschoben. Im Gegensatz zur Vergleichsstruktur wirkt der verschobene Phenylrest von **29** repulsiv auf die Seitenkette von Thr47, die gemeinsam mit der interagierenden Seitenkette von Asn70 kristallographisch ungeordnet erscheint. Hierdurch werden die Positionen von Val45 und kristallographisch geordnete Konformation des $\beta 1\alpha 1$ -loop und Helix $\alpha 1$ nicht beeinflusst (loop gezeigt als cartoon). Die Wassermoleküle C, D und G sind im Vergleich beider Strukturen leicht versetzt, wobei die Wasserpositionen D und G der Struktur 4GI4 mit der Phenyl-Konformation des Liganden in Struktur 3GC4 zu engen Atomkontakten führen würden (3.4 Å, 3.9 Å).

Beide Liganden wurden via *soaking* in den Proteinkristall eingebracht. Der Phenylrest des C(4)-Substituenten von **29** ist um ca. 1 Å in Richtung der Ribose34-Tasche verschoben. Hieraus resultieren für **29** dichtere van-der-Waals Kontakte zu den apolaren Seitenketten der Ribose34-Tasche als in der Vergleichsstruktur (Val45: 3.3 Å / 3.9 Å, Leu68: 4.1 Å / 4.3 Å, Val282: 3.8 Å / 4.0 Å). Val45 wird hierbei durch die Liganden nicht aus der konservierten Orientierung gedrängt. Auch die nachfolgenden β 1 α 1-*loop*/Helix α 1 sind durch beide Liganden unbeeinflusst. Lediglich die Seitenkette von Thr47 wird durch den versetzten Phenylrest von **29** in kristallographische Unordnung versetzt. Die Seitenkette von Asn70 erscheint wahrscheinlich durch den Wegfall der H-Brücke zur Seitenkette von Thr47 kristallographisch ungeordnet. Möglicherweise sind die im Vergleich der beiden Strukturen leicht versetzten Wassermoleküle C, D und G ursächlich für die Verschiebung des Phenylrestes von **29**. Der ungeordnete Phenethyl-Substituent an C(2) der Verbindung **29** verschiebt wahrscheinlich Wasser C und D relativ zum Ligandmolekül, wodurch auch das mit Wasser D interagierende Wasser G mitversetzt wird. Gegenüber der C(4)-Phenylkonformation des einfach substituierten Liganden entstünden nun enge Wasserkontakte zu Wasser D (3.4 Å) und Wasser G (3.9 Å). Durch die leichte Verschiebung des Phenylrestes in **29** werden diese Kontakte auf 3.5 Å bzw. 4.2 Å geweitet. Die stärkeren van-der-Waals Kontakte von **29** im Vergleich zu denen des C(4)-monosubstituiertem Analogons sind eine mögliche Erklärung für die abweichenden Affinitätstrends im Vergleich beider Serien.

Für die disubstituierten 2-Amino-*lin*-Benzohypoxanthine **30** und **31** ergibt sich bezüglich der Beziehung zwischen dem Cyclohexylring der C(4)-Seitenkette des kokristallisierten Liganden und der Orientierung von Val45 mit nachfolgenden β 1 α 1-*loop*/Helix α 1 eine andere Konstellation als in der Kokristallstruktur mit **28** (Abbildung 4.11). Hierbei sind die Cyclohexylringe von **30** und **31** gegenüber **28** um etwa 0.5 Å aus der Ribose34-Tasche verschoben. Val45 kann hierdurch die konservierte Orientierung am unteren Rand der Ribose34-Tasche einnehmen, die eine geordnete Formierung des β 1 α 1-*loop*/Helix α 1 ermöglicht. Der C(4)-Substituent von **30** und **31** beeinflusst innerhalb des β 1 α 1-*loop* lediglich die Reste Thr47 und Ala48, welche im Vergleich mit der apo-Struktur (PDB ID: 1P0D [Brenk et al., 2003]) in eine alternative Konformation übergehen (Abbildung 4.11). Auf Basis der Kristallstrukturen lässt sich für die Interaktion in Lösung annehmen, dass die Liganden **30** und **31** die konformativen Freiheitsgrade von Val45 und kausal der gesamten β 1 α 1-*loop*/Helix α 1 Substruktur

weniger einschränken als Ligand **28**. Die Verschiebung der Cyclohexyl-Reste von **30** und **31** gegenüber **28** ist hierbei wahrscheinlich die Folge einer diskret veränderten und in den C(4)-Substituenten fortgesetzten Bindungspose des 2-Amino-*lin*-Benzohypoxanthin-Kerns innerhalb der Guanin-Tasche (Abbildung 4.11). Hierbei sind die Trizyklen von **30** und **31** gegenüber **28** - wahrscheinlich infolge des Wegfalls der Interaktion zur Seitenkette von Asp102 - um etwa 0.3 Å in den oberen Bereich der Guanin-Tasche verschoben.

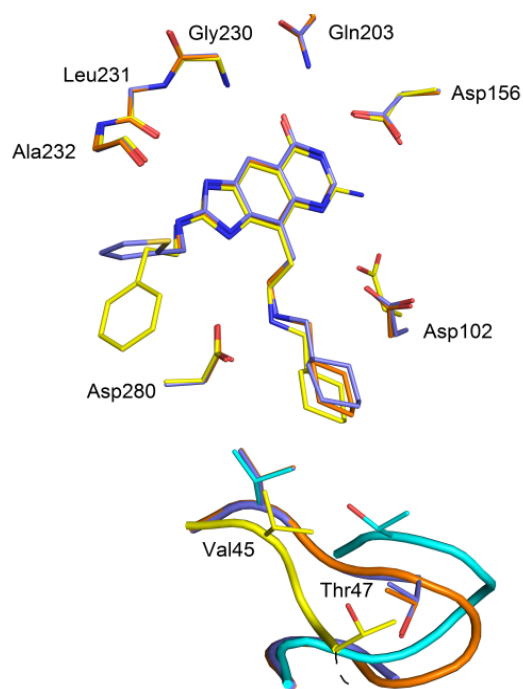


Abbildung 4.11 Überlagerung der auf die C α -Atome der Guanin-Taschen alinierten Kokristallstrukturen von **28** (PDB ID: 4GIY, C_{Protein/Ligand} und Cartoon gelb), **30** (PDB ID: 4GG9, C_{Protein/Ligand} und Cartoon blau) und **31** (PDB ID: 4GH1, C_{Protein/Ligand} und Cartoon orange) mit der apo-Struktur (PDB ID: 1P0D [Brenk et al., 2003], C und Cartoon cyan, zur Übersichtlichkeit sind die Reste der Guanin-Tasche nicht dargestellt). Das trizyklische Grundgerüst von **30** und **31** ist um ca. 0.3 Å an den oberen Rand der Guanin-Tasche verschoben. Der Cyclohexylrest des C(4)-Substituenten von **30** und **31** ist um ca. 0.5 Å gegenüber **28** verschoben, wodurch sich verschiedene Orientierungen für Val45 und den nachfolgenden β 1 α 1-loop ergeben. Der β 1 α 1-loop mit der nachfolgenden Helix α 1 ist in der Struktur mit **28** kristallographisch ungeordnet (angedeutet durch unterbrochene Linie). Thr47 würde in der Orientierung der apo-Struktur in engem Kontakt zu Ligand **30** (3.9 Å) bzw. **31** (3.8 Å) stehen und nimmt in diesen beiden Strukturen eine zur apo-Struktur alternative Konformation an.

Die gleiche Verschiebung des trizyklischen Grundgerüsts ist auch für den kokristallisierten Liganden **32** festzustellen (Abbildung 4.7). Im Gegensatz zu den Kokristallstrukturen von **30** und **31** fehlt für den Cyclohexylring des C(4)-Substituenten

von **32** klar definierte Elektronendichte, wodurch ein flexiblerer Bindungsmodus innerhalb der Ribose34-Tasche diskutiert werden kann. Dieser hätte eine Reduzierung der van-der-Waals-Kontakte zu Val45, Leu68 und Val282 zur Folge, welche die verminderte Bindungsaffinität gegenüber **30** und **31** erklären würde. Der Vergleich der Strukturen von **32** und **28** gibt außerdem einen Hinweis auf den Einfluss des trizyklischen Grundgerüsts auf die Flexibilität der C(2)-Seitenkette.

Der Einfluss von Flexibilität der C(2)-Seitenkette in der Ribose33-Tasche auf die Bindungsaffinität entsprechend substituierter *lin*-Benzohypoxanthine lässt sich durch den Vergleich der Strukturen mit **30** und **31** einschätzen. Während die gut solvatisierbare Morpholinoethyl-Seitenkette in **31** kristallographisch ungeordnet ist, weist die eher hydrophobe Thiophenomethyl-Seitenkette in **30** einen geordneten Bindungsmodus in der Ribose33-Tasche auf (Abbildungen 4.5 und 4.6). Basierend auf diesem kristallographischen Befund sind für die beiden Liganden sehr unterschiedliche thermodynamische Bindungsprofile zu erwarten, wobei die Affinitäten beider Liganden als Resultanten enthalpischer und entropischer Bindungsbeiträge davon nicht signifikant beeinflusst werden. Dieser Vergleich unterstreicht, dass gerichtete Protein-Ligand-Wechselwirkungen nicht generell die Voraussetzung für positive Affinitätsbeiträge von Ligandsubstituenten sind.

Eine mögliche strukturelle Ursachen für den rigiden Bindungsmodus des C(2)-Substituenten von **30** ergibt sich aus der Überlagerung mit der C(2)-monosubstituierten Analogverbindung **19** (PDB ID: 3GEV, siehe Kapitel 3). Bei letzterer erscheint die Thiophenomethyl-Seitenkette an C(2) des Trizyklus kristallographisch ungeordnet (Abbildung 4.12). Bei vergleichbar positionierten Trizyklen ist die Seitenkette von Tyr106 im Komplex mit **30** gegenüber der Vergleichsstruktur um ca. 1 Å verschoben, wobei diese alternative Konformation möglicherweise durch enge C-C-Kontakte zwischen Tyr106 und dem C(4)-Substituenten von **30** begünstigt ist. Durch die versetzte Seitenkette von Tyr106 im Komplex mit **30** wird eine schwache H-Brücke zwischen der phenolischen OH-Funktion und dem Schwefelatom des Thiophenrings ermöglicht (3.8 Å). Die in der Vergleichsstruktur definierte Konformation von Tyr106 ist hingegen von der Schwefelposition des Liganden **30** deutlich weiter entfernt (4.4 Å). In einem solchen, hypothetischen Arrangement ist der Aufbau einer H-Brücke mit fixierender Wirkung auf die Thiophenomethyl-Seitenkette als sehr unwahrscheinlich einzuschätzen. Bei der

Gegenüberstellung beider Strukturen fällt weiterhin das oben beschriebene, sechsgliedrige Wassernetzwerk (A - F) auf, welches sich um die geordnete C(2)-Seitenkette von **30** ausbildet (Abbildungen 4.5b und 4.12). Hierbei ist lediglich Wasser D in beiden Strukturen vorzufinden. In der Vergleichsstruktur (PDB ID: 3GEV) ist Wasser D Teil eines andernorts detailliert beschriebenen, konservierten Wassernetzwerkes (D, H - K) welches zwischen Asp102 und Asp280 lokalisiert ist (Abbildung 4.12) [Ritschel, Kohler et al., 2009]. Dieses Wassernetzwerk wird durch die C(4)-Seitenkette von **30** verdrängt bzw. im Falle von Wasser D um 0.5 Å verschoben. Die um den Thiophenring von **30** mantelartig positionierten Wasser A - C, E und F bilden nur im Zusammenhang mit dieser konformationsstabilen C(2)-Seitenkette ein Netzwerk aus, welches den verfügbaren Raum für alternative Konformationen der Seitenkette innerhalb der Ribose33-Tasche einschränkt.

Ein vergleichbarer, die C(2)-Seitenkette in einer Konformation stabilisierender Effekt ist auch für die netzwerkartig organisierten Wasser A - D der Komplexstrukturen **27** und **28** denkbar (Abbildungen 4.2b und 4.3b).

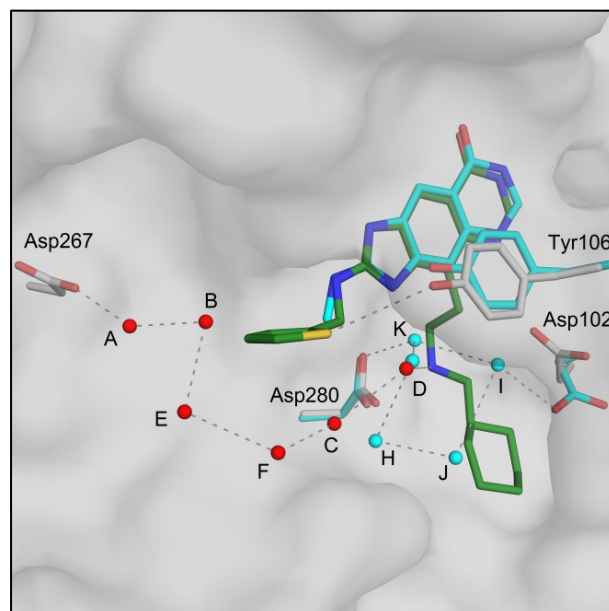


Abbildung 4.12 Überlagerung der auf die C α -Atome der Guanin-Taschen alinierten Kristallstrukturen von **30** (PDB ID: 4GG9) und des an C(2)-monosubstituierten analogen Liganden **19** (PDB ID: 3GEV, C_{Protein/Ligand} cyan, Wasser: cyanfarbene Kugeln). Durch die C(4)-Seitenkette von **30** werden vier Wasser (H - K) verdrängt, während Wasser D um 0.5 Å verschoben wird. Die den Thiophenring von **30** ummantelnden Wasser A - C, E, F sind nur in der Komplexstruktur mit **30** detektierbar. Die Seitenkette von Tyr106 nimmt im Komplex mit **30** eine leicht geneigte Konformation ein, welche eine H-Brücke zum Thiophen-Schwefel ermöglicht.

4.4 Zusammenfassung

Die disubstituierten 2-Amino-*lin*-Benzoguanine **27** - **29** konnten als hochaffine Inhibitoren der TGT mit pikomolaren bis niedrig nanomolaren Dissoziationskonstanten charakterisiert werden. Speziell für die aktuell höchstaffinste *lin*-Benzoguanin-basierte Verbindung **27** konnten die zwei Designkonzepte - Expansion des trizyklischen Grundgerüsts durch Substituenten an C(2) und C(4) - erfolgreich kombiniert werden. Während die Bindungsmodi der in **27** - **29** eingesetzten C(4)-Substituenten schon in vorausgehenden Arbeiten für die C(4)-monosubstituierten Analogverbindungen beschrieben worden sind, konnten in den Komplexstrukturen von **27** und **28** erstmals kristallographisch geordnete Konformationen für den C(2)-Substituenten definiert werden.

Im Rahmen der in Kapitel 2 vorgestellten Arbeiten zu Schlüsselinteraktionen innerhalb des Dimer *interface* der TGT konnten die Charakteristika des direkt an die Ribose34-Tasche anschließenden $\beta 1\alpha 1$ -*loop* beschrieben werden, wobei die ungehinderte konformative Freiheit von Val45 während des Kristallisationsprozesses Voraussetzung für die Ausbildung der konservierten, geordneten *loop*-Konformation ist. Val45 ist außerdem Teil des hydrophoben Bodens der Ribose34-Tasche und somit ein für van-der-Waals-Kontakte anvisierter Interaktionspartner der terminalen Cycloalkylreste der Ligandseitenketten. Die so identifizierte Schnittstelle zwischen Ribose34-Tasche und Dimer *interface* eröffnet eine neue Sichtweise auf die kristallographischen Effekte der C(4)-substituierten Liganden im Zusammenhang mit deren Affinitätsdaten. So erscheint der deutliche Affinitätsverlust zwischen **27** und **28** erst durch den Vergleich beider Kokristallstrukturen erklärbar. Diese Kokristallstrukturen bilden den Bindungsmodus innerhalb der Ribose34-Tasche deutlich näher an der Bindungssituation in Lösung ab als die in früheren Serien bestimmten *soaking*-Strukturen. Hiernach schränkt der Cyclohexylring des C(4)-Substituenten von **28** im Gegensatz zum Cyclopentylring in **27** die konformativen Freiheitsgrade von Val45 während der Kristallisation und somit sehr wahrscheinlich auch in Lösung ein, was zu einer verringerten Bindungsaffinität führt. Die Dekoration der C(4)-Seitenkette mit einem Cyclopentylring erscheint als guter Kompromiss zwischen engen van-der-Waals Wechselwirkungen zur Ribose34-Tasche ohne affinitätsmindernde, repulsive Kontakte zu Resten, die in die Formierung des Dimer *interface* involviert sind.

Die im Vergleich zur C(4)-monosubstituierten analogen Serie unerwartet hohe Affinität von **29** gegenüber **27** verdeutlicht, dass sich die Affinitätsbeiträge der einzelnen Substituenten nicht additiv verhalten. Die Strukturüberlagerung von **29** mit der einfach substituierten Analogverbindung gibt deutliche Hinweise auf eine Kooperativität zwischen C(2)- und C(4)-Seitenkette, welche wahrscheinlich über leicht verschobene konservierte Wassermoleküle innerhalb der Ribose34-Tasche vermittelt ist. Durch einen auf diese Weise verschobenen, tiefer in die hydrophobe Tasche eindringenden Phenylrest von **29** tritt eine Verstärkung der hydrophoben Kontakte auf, die als ursächlich für die vergleichsweise hohe Affinität des Liganden diskutiert werden kann. Die in vorausgegangenen Arbeiten [Ritschel, Kohler et al., 2009] als eher nachteilig diskutierte deckelartige Orientierung des C(4)-Phenylrestes gegenüber der Ribose34-Tasche erscheint im Rahmen dieser Studie unter zwei Aspekten als vorteilhaft. Zum einen können trotz der eher aufliegenden als eindringenden Bindungsgeometrie enge hydrophobe Kontakte zur Tasche ausgebildet werden, zum anderen tritt der aufliegende C(4)-Phenylrest nicht in repulsive Wechselwirkung mit der Seitenkette von Val45.

Mit den disubstituierten 2-Amino-*lin*-Benzohypoxanthinen **30** und **31** konnten erstmals Inhibitoren dieser Grundstruktur mit einer dreistellig nanomolaren Bindungsaffinität charakterisiert werden. Der massive Affinitätseinbruch gegenüber den *lin*-Benzoguanin-Liganden kann aber erwartungsgemäß auch durch Disubstitution am Trizyklus nicht ausgeglichen werden. Die Überlagerung der Strukturen **30** und **31** mit **28** unterstreicht, dass selbst minimale Veränderungen im Bindungsmodus des Liganden deutliche strukturelle Veränderungen am Protein nach sich ziehen können. Diese beeinflussen sicher auch die Bindungsaffinität in Lösung. Eine direkte Übertragung affinitätssteigernder Substituenten aus *lin*-Benzoguanin- auf *lin*-Benzohypoxanthin-Serien und umgekehrt scheint vor dem Hintergrund der hier präsentierten Ergebnisse nur bedingt zielführend zu sein.

Der gegenüber **30** und **31** deutlich ungeordnetere und durch eine niedrigere Affinität wiedergespiegelte Bindungsmodus von **32** deutet nochmals auf eine Kooperativität zwischen C(2)- und C(4)-Substituent hin, welcher in dieser konkreten Gegenüberstellung allerdings strukturell nicht klar nachvollziehbar ist.

Für die Liganden **27**, **28** und **30** konnten erstmals geordnete C(2)-Seitenketten in der Differenzelektronendichte detektiert werden. Während die Thiophenomethyl-

Seitenkette von **30** nur über eine schwache H-Brücke zu Tyr106 mit dem Protein interagiert, bildet der Phenethyl-Substituent von **27** und **28** lediglich ungerichtete hydrophobe Kontakte zur Ribose33-Tasche aus. Umso bedeutsamer sind möglicherweise die in diesen Strukturen feststellbaren Wassernetzwerke, welche die hydrophoben Seitenketten ummanteln und den verfügbaren Raum für alternative Konformationen nur zum Preis der Wasserverdrängung freigeben.

Der Affinitätsbeitrag einer geordneten Interaktion zwischen C(2)-Seitenkette und Ribose33-Tasche ist basierend auf der Gegenüberstellung der Dissoziationskonstanten und Komplexstrukturen von **30** und **31** als gering zu bewerten. Der Affinitätsbeitrag einer gut solvatisierbaren, flexiblen Morpholinoethyl-Seitenkette ist bei wahrscheinlich deutlich differierendem thermodynamischen Profil nicht signifikant verschieden vom Beitrag eines schlechter solvatisierbaren, geordnet gebundenen Thiophenomethyl-Substituenten.

5 Kristallographische Untersuchungen einer TGT (Asp102Asn)-Variante

5.1 Einleitung

Der Ladungszustand eines Arzneistoffs unter physiologischen pH-Bedingungen ist eine entscheidende Determinante für seine Fähigkeit durch Lipiddoppelmembranen zu permeieren und den Wirkort innerhalb des Organismus zu erreichen. In diesem Zusammenhang sind stark saure und basische Funktionalitäten als Träger permanenter formaler Ladung häufig problematisch, was z.B. deren Überführung in ladungsneutrale Prodrugs notwendig machen kann. Auf der anderen Seite sind gegebenenfalls gerade geladene Funktionalitäten im Bezug auf die Bindungsaffinität eines Arzneistoffes gegenüber einem Zielprotein durchaus erwünscht. Hier können ladungsgestützte H-Brücken oder auch Salzbrücken zwischen Arzneistoff und Protein einen deutlichen negativen Freien Bindungsenthalpie-Beitrag liefern. Ein idealtypischer Arzneistoff vereint die Aspekte Bioverfügbarkeit bei möglichst hoher Bindungsaffinität, beispielsweise indem die sauren bzw. basischen Funktionalitäten unter physiologischen pH-Bedingungen - also während des Transports zum Wirkort - ungeladen vorliegen und erst durch die Bindung an das Zielprotein protoniert bzw. deprotoniert werden.

In vorangegangenen Arbeiten wurden derartige Gesichtspunkte für eine Serie von *lin*-Benzoguanin-basierten Inhibitoren der *Z.mobilis* TGT untersucht [Ritschel, Hörtner et al., 2009]. Hierbei wurden zunächst die pK_a -Werte der Liganden in Lösung experimentell bestimmt. Anschließend wurden die pK_a -Werte der Aminosäuren im aktiven Zentrum des Proteins mittels *in silico* Methoden berechnet, woraus sich deren Protonierungszustände unter verschiedenen pH-Bedingungen ableiten ließen. Bei der Berechnung der pK_a -Werte der Liganden unter Einbeziehung der Proteinumgebung ergab sich, dass der Einfluss der interagierenden Reste die pK_a -Werte der Liganden um bis zu zwei Einheiten verschieben kann. Die damalige Studie beschäftigte sich strukturell mit der Protonierung der zyklischen Guanidin-Funktion des Imidazol-Anteils der 2-Amino-*lin*-Benzoguanin Liganden (Abbildung 5.1). Diese Partialstruktur ist allerdings nicht die einzige protonierbare Funktion des *lin*-Benzoguanin Grundgerüsts.

Die an C(6) des Trizyklus substituierte NH_2 -Funktion ist Teil einer weiteren protonierbaren Guanidingruppierung im Pyrimidinanteil des Ligandgrundgerüsts. Für N(5) des in Abbildung 5.1 dargestellten *lin*-Benzoguanin-Liganden ($\text{X} = \text{NH}_2$) wurde hierbei ein pK_a -Wert von 4.4 in Lösung festgestellt, welcher weitgehende Ladungsneutralität dieser Partialstruktur unter physiologischen pH-Bedingungen (pH 7.3) nach sich zieht (siehe Kapitel 3). Das zyklische Guanidin um N(5) interagiert innerhalb der Guanin-Tasche der TGT mit den unmittelbar benachbarten Seitenketten von Asp102 und Asp156 (Abbildung 5.2). Sehr wahrscheinlich ist die Erhöhung der Basizität von N(5) durch diese Interaktionspartner. So sollten die aufgrund der *in silico* Ergebnisse als deprotoniert angenommenen Carboxylat-Funktionen von Asp102 und Asp156 eine positive Ladung des Liganden deutlich stabilisieren.

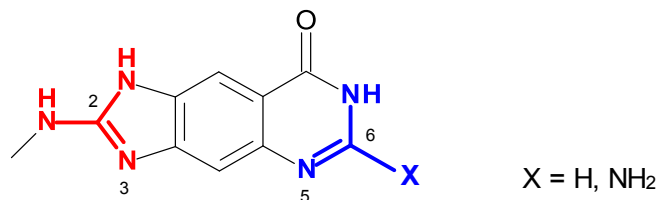


Abbildung 5.1 Schematische Darstellung eines 2-Amino-*lin*-Benzoguanins ($\text{X} = \text{NH}_2$) bzw. 2-Amino-*lin*-Benzohypoxanthins ($\text{X} = \text{H}$). Farblich unterlegt sind die basischen Partialstrukturen (rot: zyklisches Guanidin assoziiert mit der 2-Amino-Imidazolpartialstruktur des *lin*-Benzoguanins/*lin*-Benzohypoxanthins, blau: zyklisches Guanidin assoziiert mit der Pyrimidinpartialstruktur des *lin*-Benzoguanins).

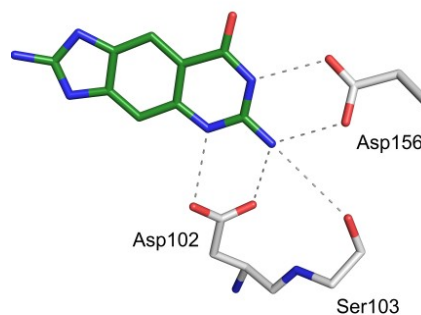


Abbildung 5.2 Die Seitenketten von Asp102 und Asp156 interagieren über H-Brücken mit den Stickstoffatomen des zyklischen Guanidins der Pyrimidinpartialstruktur (2.7 - 2.9 Å), gezeigt anhand einer TGT / *lin*-Benzoguanin Komplexstruktur (PDB ID: 2Z7K [Ritschel, Hörtner et al., 2009], Farbcode: C_{Ligand} grün, $\text{C}_{\text{Protein}}$ grau, O rot, N blau. H-Brücken gezeigt als unterbrochene Linie. Diese Parameter gelten, soweit nicht anders vermerkt, für alle Abbildungen dieses Kapitels). Ser103 interagiert über eine schwache H-Brücke mit dem Liganden (3.7 Å).

In dieser Studie sollen Hinweise auf den Protonierungszustand von Asp102 bei pH 5.5 kristallographisch ermittelt werden. Hierzu wurde ein von C. Romier [Romier, 1997] erzeugtes Plasmid einer TGT(Asp102Asn)-Mutante in einen Expressionsstamm von *E. coli* transformiert und das entsprechende Zielprotein überexprimiert und aufgereinigt (siehe Materialien und Methoden, Abschnitt 9.5.2 und 9.5.3). Die TGT Variante wurde mit dem in Kapitel 3 charakterisierten Liganden **15** (Abbildung 5.1, X=H) bei pH 5.5 kristallisiert. Die erhaltene Kristallstruktur wurde mit apo- und Komplexstrukturen des TGT Wildtyps (pH 5.5) verglichen und hinsichtlich des Protonierungszustands von Asp102 diskutiert. Die Mutation von Asp102 zu Asn102 ermöglichte hierbei das Fingieren eines permanent protonierten Asp102 in der Guanin-Tasche der TGT.

In zukünftigen Studien soll dann der Einfluss von Asp102 und Asp156 auf den pK_a von N(5) experimentell quantifiziert werden, wobei isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) die Bestimmung von Protonenübergängen während eines Bindungsereignisses ermöglicht. Voraussetzung für eine eindeutige Interpretation der ITC-Messungen ist die experimentelle Beurteilung der Protonierungszustände von Asp102 und Asp156 unter physiologischen pH-Bedingungen.

5.2 Kristallstrukturanalyse und Diskussion

Die Kristallstruktur von TGT(Asp102Asn) in Komplex mit Ligand **15** konnte mit einer maximalen Auflösung von 2.0 Å bestimmt werden (Abbildung 5.3a, Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistik siehe Appendix). Die $|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichte definiert den Liganden, welcher über H-Brücken mit den Seitenketten von Asp156 und Gln203, den C=O Funktionen von Leu231 und Ala232, sowie der N-H Funktion von Gly230 interagiert. Die $3|F_o| - 2|F_c|$ -Elektronendichte lässt die eindeutige Bestimmung von Asn102, Asn70 und Thr71 zu. Asn102 nimmt eine dem Liganden abgewandten Orientierung ein und bildet H-Brücken zur Seitenkette von Asn70 (3.1 Å) und zur NH-Gruppe des Rückgrats von Thr71 (2.6 Å) aus. Zum strukturellen Vergleich wurden die TGT(Asp102Asn)-Ligand **15**-Struktur mit zwei apo-Strukturen (PDB ID: 1P0D [Brenk et al., 2003], 1PUD [Romier et al., 1996]) sowie Komplexstrukturen mit den C(2)-monosubstituierten Liganden **19** und **21** (PDB ID: 3GEV, 3V0Y, siehe Kapitel 3) überlagert (Abbildung 5.3b). Bei ansonsten konservierten Positionen von Resten und Liganden wird eine 80°-Rotation der Seitenkette von Asn70 in der TGT(Asp102Asn)-

Struktur deutlich. Diese Orientierung tritt bei keiner der unter analogen Bedingungen gewonnenen, analysierten Wildtyp-Strukturen auf und kann folglich auf den Wechselwirkungspartner Asn102 bzw. die eingeführte H-Brücken-Donorfunktion der amidischen NH₂-Gruppe zurückgeführt werden. Im Umkehrschluß ist anzunehmen, dass Asp102 in den alinierten Wildtyp-Strukturen über keine solchen Donoreigenschaften verfügt und hier folglich als deprotoniertes Carboxylat vorliegt.

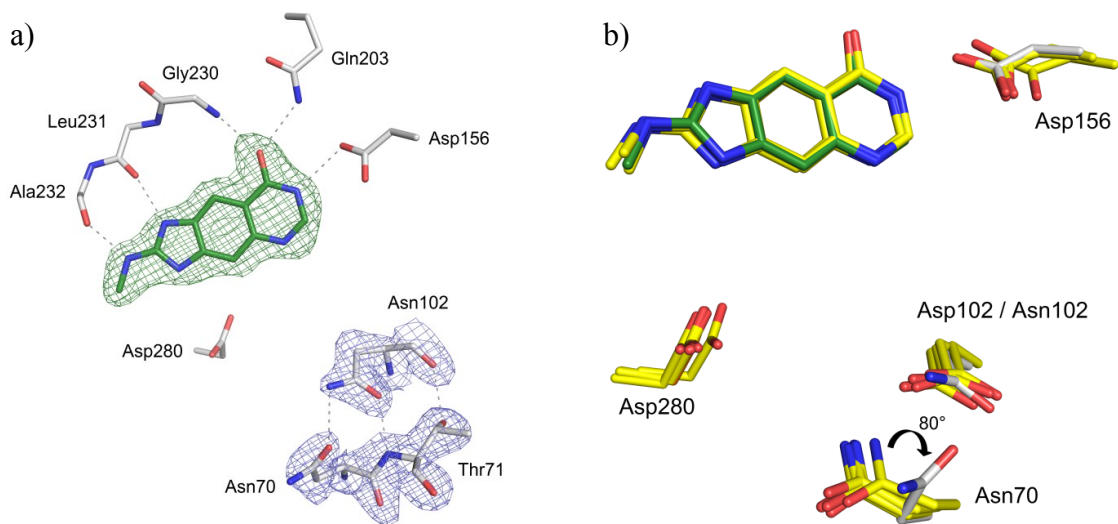


Abbildung 5.3 Kristallstruktur von TGT(Asp102Asn) mit Ligand **15** (PDB ID: 4GHR). a) Der Ligand ist durch die $|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte bei 3σ klar definiert (gezeigt als grünes Netz). Die Reste Asn102, Asn70 und Thr71 sind in der $3|F_o|-2|F_c|$ -Elektronendichte bei 1.2σ detektierbar (gezeigt als blaues Netz). Der Ligand bindet über H-Brücken an die Reste der Guanin-Tasche (2.5-2.9 Å). Asn102 formt H-Brücken zu Asn70 und Thr71. b) Überlagerung mit zwei apo-Strukturen und den Komplexstrukturen der Liganden **19** und **21** (PDB ID: 1P0D [Brenk et al., 2003], 1PUD [Romier et al., 1996], 3GEV, 3V0Y, Farbcode: C_{Protein/Ligand} gelb). Asn102 nimmt eine analoge Position zu den überlagerten Asp102 ein, während Asn70 um ca. 80° rotiert ist.

Zur Festigung dieser Strukturinterpretation wurde eine Recherche bezüglich dokumentierter Asn/Asn- und Asp/Asn-Bindungsgeometrien in der CSD-Datenbank [Allen, 2002] durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.4 als *scatter plot* visualisiert, wobei Asp102 bzw. Asn102 als Bezugspunkte für die umgebenden, in der jeweilig beobachteten Bindungsgeometrie gezeigten Interaktionspartner gewählt wurden. Aus Abbildung 5.4a geht hervor, dass das Arrangement von Asn70 zu Asn102 in der TGT(Asp102Asn)-Struktur eine Positionierung des amidischen Sauerstoffs von Asn70 ergibt, welche innerhalb der größten Population entsprechend interagierender Sauerstoffatome in der Datenbank liegt. Die Position der amidischen NH₂-Gruppe von

Asn70 befindet sich dagegen außerhalb hochpopulierter Bindungsgeometrien. Ursächlich hierfür ist vermutlich die Einbeziehung des amidischen Sauerstoffs von Asn102 in eine kurze H-Brücke zur NH-Gruppe von Thr71 (Abbildung 5.3a).

Die CSD-Datenbanksuche nach Bindungsgeometrien zwischen ungeladenen, nicht deprotonierten Aspartaten und Asparaginen ergab, dass das u.a. in der Komplexstruktur von TGT Wildtyp mit Ligand **15** beobachtete Arrangement von Asp102 und Asn70 (grün) deutlich außerhalb hochpopulierter Geometrien liegt (PDB ID: 3S1G, Abbildung 5.4b). Die um 80° geneigte Konformation von Asn70 in der TGT(Asp102Asn)-Struktur (weiß) läge dagegen hinsichtlich der Position des amidischen Sauerstoffs innerhalb der größten Population entsprechend interagierender Sauerstoffatome in der CSD-Datenbank.

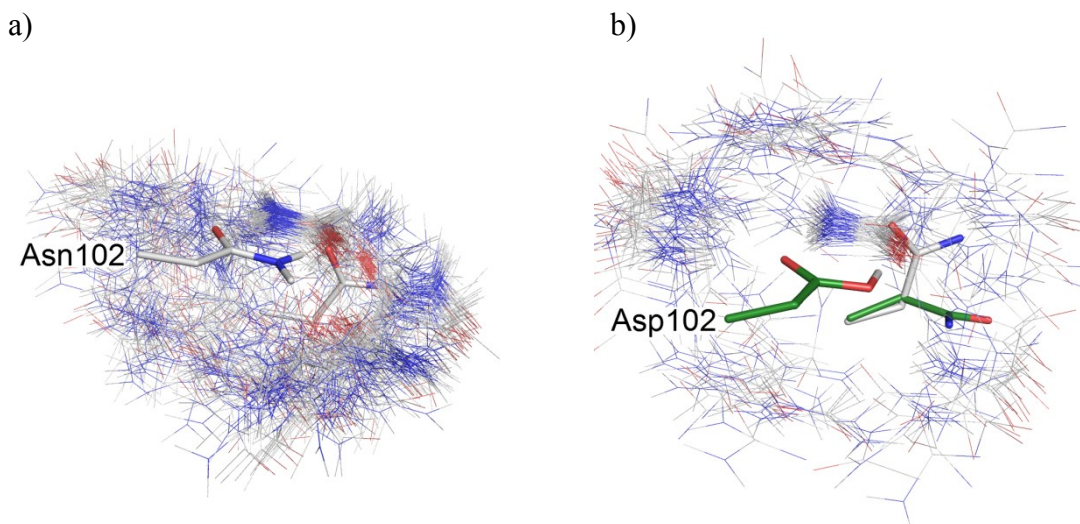


Abbildung 5.4 Ergebnis einer CSD-Datenbanksuche zu a) Asn/Asn Kontakten und b) Kontakten zwischen nicht deprotonierten Asp und Asn, jeweils gezeigt als *scatter plot* überlagert mit den entsprechenden Kristallstrukturen (gezeigt als sticks). a) Positionen von Asn102 und Asn70 in der Kristallstruktur der TGT(Asp102Asn)-Mutante mit Ligand **15** (PDB ID: 4GHR) überlagert mit - auf Asn102 alinierten - Asn/Asn Kontakten der CSD- Datenbank (828 Einträge, gezeigt als Linien). b) Positionen von Asp102 und Asn70 der Kristallstruktur von TGT Wildtyp mit Ligand **15** (PDB ID: 3S1G, C_{Protein} grün) überlagert mit Asn70 aus der analogen TGT(Asp102Asn)-Struktur (PDB ID: 4GHR, C_{Protein} grau) und - auf Asp102 alinierten - Asp(ungeladen) / Asn-Kontakten der Datenbank (148 Einträge, gezeigt als Linien).

Folgende zwei Schlussfolgerungen erscheinen auf Basis der oben gezeigten Ergebnisse sinnvoll: (1) Wäre die Carbonsäurefunktion von Asp102 in den gezeigten Wildtyp-Strukturen nicht deprotoniert würde Asn70 die Orientierung der TGT(Asp102Asn)-Struktur annehmen. Die konformativen Freiheitsgrade bestehen hierzu. (2) In den

Wildtyp-Strukturen liegt Asp102 deprotoniert vor und fungiert gegenüber der amidischen NH₂-Gruppe von Asn70 als H-Brückenakzeptor.

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die Kristallstruktur der TGT(Asp102Asn)-Variante in Komplex mit dem *lin*-Benzohypoxanthin **15** weist strukturelle Unterschiede gegenüber den Wildtyp-Strukturen auf, welche Rückschlüsse auf den Protonierungszustand von Asp102 bei pH 5.5 zulassen. Hierbei sprechen die kristallographischen Befunde zusammen mit den Ergebnissen einer CSD-Datenbanksuche für ein deprotoniertes Asp102, womit die pK_a-Berechnungen einer vorausgegangenen Studie bekräftigt werden [Ritschel, Hörtnner et al., 2009]. Dieses Ergebnis ermöglicht eine detailliertere Bewertung der Wechselwirkungen zwischen Asp102 und *lin*-Benzoguanin Liganden. Die ausgebildete H-Brücke ist mindestens ladungsgestützt - eventuell wird der pK_a-Wert von N(5) des Trizyklus durch die umgebenden Aspartate sogar soweit erhöht, dass die Wechselwirkung mit Asp102 eher den Charakter einer Salzbrücke aufweist. Geplante ITC-Experimente können diesen Sachverhalt wahrscheinlich weiter aufklären.

Der Protonierungszustand von Asp102 ist auch im Hinblick auf den Mechanismus der TGT-katalysierten tRNA-Modifizierung von Interesse (siehe Kapitel 1, Abbildung 1.4). Hierbei wurde Asp102 in vorausgegangenen Arbeiten die Funktion des Protonenakzeptors im initialen Schritt und die des Protonendonors in einem späteren Schritt der Basenaustauschreaktion zugewiesen [Xie et al., 2003]. Auch wenn der gezeigte Protonierungsstatus von Asp102 konsistent mit der genannten Hypothese ist, erscheint die Funktion von Asp102 als generelle Base der Reaktion vor dem Hintergrund der irreversiblen preQ₁-Inkorporation in die tRNA als fraglich (siehe auch Abschnitt 1.8).

6 Affinitätsbestimmung von tRNA^{Tyr} gegenüber *Z. mobilis* TGT

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d als Maß für die Affinität des Substrates tRNA^{Tyr} gegenüber der TGT ist durch Messung des Thermophoreseprofils des Proteins in Abhängigkeit von der vorhandenen tRNA^{Tyr}-Konzentration möglich. Die Methode basiert auf einem durch einen Infrarotlaser erzeugten Temperaturgradienten, welcher eine gerichtete Bewegung des Proteins in Lösung hervorruft (Thermophorese). Die Thermophorese ist wiederum von der Größe, der Faltung und der Hydrathülle des Proteins beeinflusst, wobei alle diese Parameter durch die Bindung eines Liganden verändert werden können. Durch Messen der Thermophorese des fluoreszenzmarkierten Proteins in Gegenwart verschiedener Ligandkonzentrationen ist die direkte Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d möglich (siehe Abschnitt 9.8). Hierbei wird für die Protein-Ligand Lösungen jeweils die Differenz der normierten Fluoreszenzwerte zu Beginn und am Ende des über 10 Sekunden angelegten Temperaturgradienten gemessen (Abbildung 6.1). Diese Differenz (ΔF_{norm}) wird dann gegen die jeweilige Ligandkonzentration aufgetragen (Abbildung 6.2). Der Wendepunkt der eingepassten sigmoidalen Kurve definiert den K_d -Wert des Protein-Ligand Komplexes.

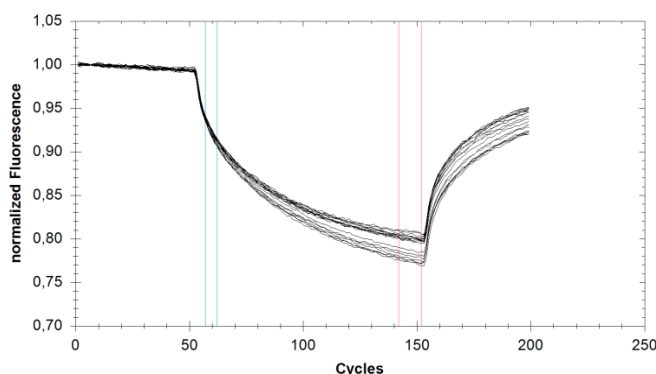


Abbildung 6.1 Messung der Thermophorese von 16 verschiedenen zusammengesetzten TGT-Ligand-Lösungen. Die emittierte, auf den Wert 1,00 normierte Fluoreszenz wird innerhalb des Fokus des Infrarotlasers gemessen und gegen die Zeit aufgetragen (10 Cycles = 1 Sekunde). Der Infrarotlaser wird zwischen Cycle 50 und 150 aktiviert. In dieser Zeit fällt die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration unterschiedlich stark ab. Die Fluoreszenz wird zu Beginn der Thermophorese (blaue Balken) und zu deren Ende (rote Balken) gemessen. Nach Ausschalten des Lasers tritt eine Rückdiffusion des Proteins in den zuvor erhitzten Bereich der Lösung ein.

Der auf diese Weise bestimmte $K_d(\text{TGT}/\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$ beträgt $36.2 \pm 5.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Abbildung 6.2). Die Dissoziationskonstante des Komplexes liegt damit deutlich unter dem im Rahmen dieser Studie bestimmten $K_m(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$ von $0.9 \pm 0.2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, welcher als indirekter Affinitätsparameter verwendet wird. Der Grund dieser Diskrepanz ist sehr wahrscheinlich die Bindung zwischen Guanin und TGT im kinetischen Assay (siehe Abschnitt 9.7). Guanin stellt hierbei wohl nicht nur das Kosubstrat der Basenaustauschreaktion dar, sondern fungiert parallel als kompetitiver Inhibitor gegenüber der tRNA^{Tyr}. Da Guanin im kinetischen Assay in Sättigungskonzentration vorliegt, führt eine Ableitung der Bindungsaffinität der tRNA^{Tyr} gegenüber TGT auf Basis des K_m -Wertes zu einer Unterschätzung der wahren Bindungsaffinität. Die hier vorgestellte Messung der Thermophorese ermöglicht erstmals eine Bestimmung der Affinität ohne kompetitiv bindendes Guanin im Messansatz.

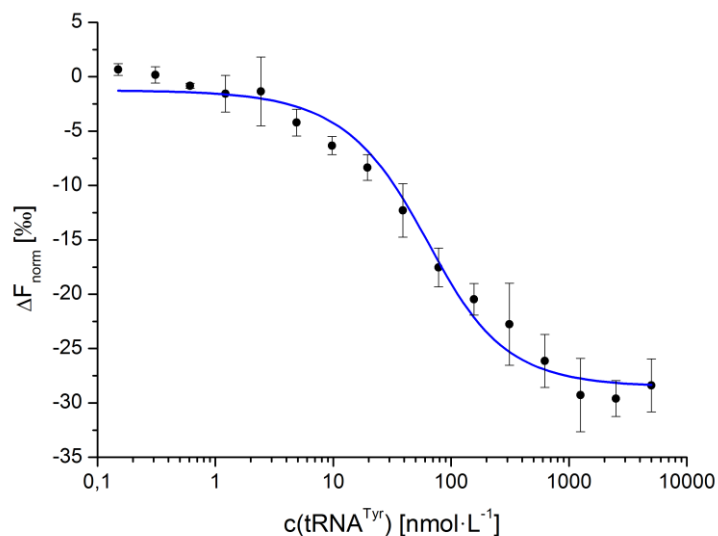


Abbildung 6.2 Auftragung der Fluoreszenzdifferenzen gegen die eingesetzte tRNA^{Tyr}-Konzentration.

7 Conclusion and Outlook

In this thesis different methods of structure-based drug design have been applied to develop TGT inhibitors suiting the manifold purposes of the tackled projects. TGT is not only a putative target for the treatment of Shigellosis, but additionally represents a well-accessible model system to study more general aspects of drug design. In the course of this thesis, the focus was on a more detailed understanding of the architecture of the protein-protein interaction between the associated TGT monomers; insights in the importance of water networks with respect to their interference with different ligand scaffolds and furthermore, the impact of sidechain cooperativity and residual mobility for ligand's binding affinity.

The presented results are mostly received from X-ray crystallography and binding affinity measurements. For the latter determinations, a new method - microscale thermophoresis - has been introduced. To characterize binding of TGT ligands, the newly established protocol largely replaces the expensive and time-consuming kinetic assay based on radioactive labeled guanine. The experimental perspective has been further expanded by a point mutation study, methods of computational chemistry and non-covalent nanoESI mass spectrometry.

The latter technique provided crucial information about the dimer stability of TGT in solution and upon the impact of ligands, designed to perturb the anticipated hot spot interactions of the dimer interface (section 2). For the first time, a dimer destabilization in solution has been verified induced by needle-type decorated ligands which spike into the interface region. However, these ligands were not able to fully disrupt the dimer which questions the importance of the targeted substructures for dimer stability. A detailed crystal structure analysis of three TGT-ligand complexes complemented with collected affinity data could unravel the role of the targeted helix-loop-substructure, assumed to be crucial for dimer stability due to preceding mutation studies. Despite the involvement of this substructure in several, crystallographically conserved directed interactions between the monomer mates this helix-loop-motif is most likely flexible in solution and just conveyed into a well-ordered arrangement upon crystallization. Supported by molecular modeling and MD-simulations it was possible to provide an explanation for the discrepancy between the discovered minor importance of these

helix-loop associated directed interactions and the observed ligand-induced dimer destabilization in solution. The loop covers in a lid-like fashion - and even in presence of a bound spiking ligand - a hydrophobic contact region formed by a triad of three residues. This aromatic triad, which is located on a helix-turn-helix motif, could be figured out as putative interaction hot spot of the TGT dimer interface as it is maintained in all studied ligand complexes. This perception is furthermore supported by the high structural integrity of the helix-turn-helix motif which is surprisingly not affected by ligand sidechains spiking into this region. The remarkable structural conservation and the conformational stability has been shown for a glutamate residue which resides at the turn substructure of the helix-turn-helix motif once capping both helices. Most likely, this position largely contributes to the stability of the entire helix-turn-helix motif and in consequence - with respect to the associated aromatic triad - to dimer stability. For further ligand-based studies on the TGT dimer interface, the hydrophobic contact region between both monomers is a promising target to achieve an increased ligand-induced dimer destabilization. Following this strategy, new ligand sidechains should be less flexible avoiding an evasive orientation into the solvent. A symmetric disubstitution of the aromatic moieties, located at the apex of the studied needle-type ligand sidechains, could provide further enforced interference with the substructures of the dimer interface. As the discussed goals are associated with high molecular weights of the compounds, the design strategy should strongly consider ligand solubility.

A further experimental perspective on the TGT dimer could be a point mutation study replacing the helix capping glutamate by an apolar or positively charged residue. The results could provide some insights into the structural importance of a capping residue for the integrity of an entire helix-turn-helix motif.

In section 3 two series of TGT inhibitors have been developed - each corresponding to another variation of the *lin*-benzoguanine scaffold. The *lin*-benzohypoxanthines - lacking the exocyclic amino function at C(6) - and the C(6)-N-alkylated *lin*-benzoguanines have been analyzed with respect to their membrane permeability, pK_a-profile, binding mode in crystal structures and binding affinity. Finally these characteristics have been compared to the parental *lin*-benzoguanines studied in previous works.

For the pyrimidine portion of *lin*-benzohypoxanthines a shift of ca. two pK_a units to increased acidity could be achieved compared to the analog *lin*-benzoguanines. However, despite the reduced tendency to be charged, *lin*-benzohypoxanthines showed no improved membrane permeability. Most likely, the maintained 2-aminoimidazole core prevents a more advantageous profile with respect to drug-likeness and dominates the charge and polarity of all studied compounds.

The *lin*-benzohypoxanthines exhibit strongly reduced binding affinities in the micromolar range which could be reasoned by the loss of two H-bonds formed between the exocyclic amino function of parental *lin*-benzoguanines and two aspartates of the binding pocket. A water cluster was identified as a crystallographically conserved arrangement being picked up upon binding of *lin*-benzohypoxanthines. This cluster experiences several favorable interactions to the protein and to the ligand and was partially found also in the apo structure. Despite this water cluster cannot compensate the loss in affinity for *lin*-benzohypoxanthines, the potential large impact of favorable water-protein interactions on the ligand's binding affinity could be demonstrated by crystal structure analysis of two C(6)-N-alkylated *lin*-benzoguanines. Here, the ligand's alkyl moieties enforce an arrangement of surrounding water molecules which provide less favorable interactions between the water molecules and the protein. Especially the full desolvation of a serine could be figured out as an explanation for the lowest binding affinity of C(6)-N-alkylated *lin*-benzoguanines in the overall comparison.

Further design of TGT active site inhibitors should strongly consider the presented negative effects on binding affinity caused by the displacement of water molecules which are crucial for the solvation of protein residues. With respect to this impact, newly designed *lin*-benzoguanines will exhibit sidechains which mimic better the natural substrate of TGT. Ribose derivatives as C(4)-sidechains of the parental tricycle could point into the ribose34-pocket and form favorable interactions to the protein. The OH-functions of these sugar moieties can presumably replace water networks without provoking too large penalties in binding affinity.

In section 4, a series of disubstituted *lin*-benzoguanines and *lin*-benzohypoxanthines has been characterized in terms of their binding mode and affinity.

The combination of substituents simultaneously targeting the ribose33- and ribose34-pocket yielded the first TGT inhibitor exhibiting picomolar binding affinity. However,

the comparison of disubstituted compounds with their monosubstituted analogs revealed that the overall binding affinity is not necessarily improved by sidechain combination to result in additivity of affinity contributions. Cooperative effects could be obtained between ligand's sidechains. Presumably mediated via slightly shifted water molecules, contacts between the influenced sidechain and the environmental binding pocket could be improved or diminished. In two obtained complex structures the ligand's C(2)-sidechain influenced the binding mode of the C(4)-sidechain within the ribose34-pocket which provided an explanation for the unexpected trends in affinity.

The results presented in section 2 concerning the flexibility of a dimer interface-associated helix-loop substructure also affect the interpretation of crystal structures in section 4. The apolar region at the bottom of the ribose34-pocket contributes just as much to the binding pocket as it resides at the interface-building loop motif. The latter loop comprises a valine residue which could be identified as a kind of switch between a crystallographically well-ordered arrangement of the helix-loop motif and massive disorder of this region. The ordered arrangement requires a conserved orientation for the valine residue. Even slightly oversized ligand portions within the ribose34-pocket most likely restrict conformational space of valine and the following loop in solution. This is reflected by a reduced binding affinity and accordingly a ligand-induced disorder of the helix-loop motif in cocrystal structures. The presented characteristics at the end of the ribose34-pocket should be considered for further ligand design. In addition, cocrystal structures should be used to predict structural properties of TGT-ligand complexes as cocrystallization in contrast to soaking reflects the binding mode in solution much better.

In section 4, a more rigid, crystallographically defined binding mode within the ribose33-pocket could be obtained for the C(2)-substituents of three compounds of the analyzed series. Notably, the apolar C(2)-sidechains are covered by well-defined water networks presumably stabilizing an ordered conformation. Major impact of the more fixed binding mode onto the overall binding affinity cannot be detected. In a further study beyond the scope of this thesis, the thermodynamic profile of the presented compounds should be characterized using isothermal titration calorimetry (ITC). Based on the crystallographic results, significant differences in binding-entropy and -enthalpy can be expected.

In section 5, a mutationally introduced asparagine within the TGT recognition pocket can be used as a model for a permanently protonated aspartate, which is involved in ligand binding and catalysis. Detailed comparative crystal structure analyses reveal the aspartate under consideration to be deprotonated even at low acidic pH-conditions. A follow up ITC study is suggested to quantify the influence of the adjacent aspartates on the pK_a value of the ligand's *lin*-benzopurine core.

In section 6, microscale thermophoresis measurements enabled for the first time a direct determination of the dissociation constant of tRNA with respect to TGT. Microscale thermophoresis will allow the determination of ligand dissociation constants independent of the catalytic activity of TGT. The latter property is easily influenced by site-directed mutagenesis especially within the active site which made conclusive determinations of binding properties impossible.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Inhibitoren der TGT unter verschiedenen Gesichtspunkten entwickelt und untersucht. Hierbei kamen zahlreiche Methoden des strukturbasierten Wirkstoffdesigns zum Einsatz. Die TGT stellt nicht nur eine potentielle Zielstruktur zur antibiotischen Therapie der Shigellose dar, sondern ist darüber hinaus ein experimentell gut zugängliches Modellsystem zur Untersuchung allgemeinerer Fragestellungen der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung.

Die vorliegende Dissertation behandelt verschiedene inhaltliche Schwerpunkte, wobei ein detaillierteres Verständnis für die Architektur der Protein-Protein-Interaktion des TGT Homodimers erarbeitet werden konnte; die Bedeutung von Wassernetzwerken hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit verschiedenen Ligandgrundgerüsten und der Proteinumgebung beleuchtet wurde; der Einfluss von Seitenkettenkooperativität und Restbeweglichkeiten gebundener Liganden im Bezug auf ihre Bindungsaffinität ermittelt werden konnte.

Die dargestellten Ergebnisse basieren größtenteils auf der Untersuchung von Proteinkristallen mittels Röntgenstrukturanalyse und der Bestimmung von Bindungsaffinitäten der entwickelten Liganden. Mit dem Messprinzip der Thermophorese konnte im Rahmen dieser Arbeit ein neues System zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten gegenüber der TGT etabliert werden, welches den zuvor eingesetzten zeit- und kostenintensiven kinetischen Radioaktivassay ersetzt hat. Ferner wurde der experimentelle Blickwinkel auf die gegebenen Fragestellungen dieser Arbeit durch die Charakterisierung einer punktmutierten TGT-Variante, Methoden der computergestützten Chemie sowie nicht-kovalente nanoESI-Massenspektrometrie erweitert.

Letztgenannte Technik war essentiell für die Untersuchung der TGT-Dimerstabilität in Lösung und deren Beeinflussbarkeit durch Liganden (Kapitel 2). Die Liganden waren zuvor mit der Zielsetzung, potentielle *hot spot* Interaktionen des Dimer *interface* zu stören, strukturbasiert entwickelt worden. Erstmals konnte eine ligandinduzierte Destabilisierung des Homodimers in Lösung nachgewiesen werden, welche auf die nadelartig in die *interface*-Region reichenden Ligandseitenketten zurückgeführt werden konnte. Die untersuchten Liganden waren dabei aber nicht in der Lage, die vollständige

Dissoziation des Homodimers zu bewirken. Die strukturelle Bedeutung der ligandbeeinflussten vermeintlichen Schlüsselinteraktionen des Dimer *interface* erscheint vor dem Hintergrund dieses Befundes als fraglich. Die detaillierte Analyse von drei TGT-Ligand-Komplexstrukturen, komplementiert mit entsprechenden Affinitätsdaten, konnte den Einfluss der angesteuerten Helix-*loop*-Substruktur auf die Dimerstabilität offenlegen. War diese aufgrund vorausgegangener Mutationsstudien noch als entscheidend für den Zusammenhalt der assemblierten TGT-Monomere eingeschätzt worden, ist das Strukturelement, trotz seiner Beteiligung an zahlreichen kristallographisch konservierten Wechselwirkungen zum korrespondierenden Monomer, von nur geringer Bedeutung für die Dimerstabilität. Höchstwahrscheinlich wird die Helix-*loop*-Struktur erst während des Kristallisationsvorgangs in das konservierte, geordnete Arrangement überführt, während sie in Lösung konformativ flexibel vorliegt. Die sich ergebende Widersprüchlichkeit zwischen der ligandinduzierten Dimerdestabilisierung in Lösung und der offensichtlich geringen Bedeutung der Helix-*loop*-assoziierten gerichteten Wechselwirkungen konnte durch *molecular modelling* und Molekulardynamik-Simulationen aufgeklärt werden. Die kristallstrukturbasierten Simulationen zeigten, dass die beschriebene *loop*-Struktur - auch in Gegenwart eines gebundenen, nadelartig dekorierten Liganden - einer hydrophoben Kontaktfläche zwischen beiden Monomeren deckelartig aufliegt. Eine hydrophobe Triade bestehend aus drei aromatischen Resten ist an der Bildung dieser Kontaktfläche beteiligt und konnte aufgrund ihrer Konservierung in allen untersuchten Ligandkomplexen als wahrscheinliche *hot spot*-Interaktion des Dimer *interface* ausgemacht werden. Die Triade ist auf einem Helix-*turn*-Helix-Motiv lokalisiert, dessen hohe strukturelle Stabilität durch die untersuchten Kristallstrukturen gezeigt werden konnte. Überraschenderweise wird die Integrität dieses Motivs auch durch entsprechend ausgerichtete, potentiell repulsiv wirkende Ligandseitenketten nicht beeinflusst. In diesem Zusammenhang konnte weiterhin die außerordentliche Konservierung und konformative Stabilität für einen Glutamatrest innerhalb der *turn*-Substruktur gezeigt werden. Dieser fungiert für beide Helices als Terminus im Sinne eines Helix *capping*. Das Glutamat trägt sehr wahrscheinlich zur Stabilität des gesamten Helix-*turn*-Helix Motivs bei und stabilisiert im Hinblick auf die assoziierte aromatische Triade indirekt auch das Homodimer.

Für weitergehende ligandbasierte Studien stellt die hydrophobe Kontaktregion eine vielversprechende Zielstruktur zur verstärkten Destabilisierung des Dimer *interface* dar. Zukünftige Liganden sollten Seitenketten mit erhöhter Rigidität aufweisen, wodurch eine ausweichende Orientierung in das umgebende Solvent wahrscheinlich vermieden werden kann. Denkbar ist etwa eine Erweiterung der terminalen aromatischen Gruppen der nadelartigen Ligandseitenketten durch symmetrische Disubstitution. Eine entsprechende Designstrategie sollte dabei auch die Löslichkeit der Liganden berücksichtigen, welche bei den zu erwartenden hohen Molekulargewichten wahrscheinlich reduziert ist.

In einem weiteren experimentellen Ansatz zur Untersuchung des Dimer *interface* könnte das o.g. Glutamat mittels positionsgerichteter Mutagenese durch einen positiv geladenen Rest ersetzt werden. Hierdurch könnte der als stabilisierend angenommene Effekt einer negativ geladenen Funktionalität am Terminus beider Helices nachgewiesen werden.

In Kapitel 3 wurden zwei Serien von TGT Inhibitoren entwickelt und untersucht. Jede Serie basiert auf einer Variation des in vorangegangenen Arbeiten entwickelten *lin*-Benzoguanin-Grundgerüsts. Die *lin*-Benzohypoxanthine, bei denen die exozyklische Aminofunktion an C(6) des Trizyklus entfernt wurde, und die C(6)-N-alkylierten *lin*-Benzoguanine wurden hinsichtlich Membranpermeabilität, pK_a-Profil, Bindungsmodus in Kristallstrukturen und Bindungsaffinität charakterisiert. Die festgestellten Eigenschaften wurden mit den analogen *lin*-Benzoguaninen verglichen.

Für die Pyrimidin-Partialstruktur der *lin*-Benzohypoxanthine konnte eine Verschiebung von zwei pK_a-Einheiten zu erhöhter Azidität gegenüber den analogen *lin*-Benzoguaninen erzielt werden. Trotz verminderter Protonierbarkeit der *lin*-Benzohypoxanthine konnte aber keine verbesserte Membranpermeabilität erreicht werden. Sehr wahrscheinlich wird ein günstigeres biopharmazeutisches Profil durch die in allen untersuchten Verbindungen erhaltene, leicht protonierbare 2-Aminoimidazol-Partialstruktur verhindert.

Die untersuchten *lin*-Benzohypoxanthine weisen im Vergleich zu den analogen *lin*-Benzoguaninen eine deutlich reduzierte Bindungsaffinität im mikromolaren Bereich auf, die durch den Wegfall von zwei H-Brücken zwischen der exozyklischen Aminogruppe der *lin*-Benzoguanine und zwei Aspartat-Seitenketten der Bindungstasche

erklärbar ist. Ein Wassernetzwerk konnte als ein mit der Bindung von *lin*-Benzohypoxanthinen assoziiertes, kristallographisch konserviertes Arrangement dargestellt werden. Das teilweise auch in der apo-Struktur sichtbare Netzwerk bildet günstige Wechselwirkungen sowohl zu gebundenen *lin*-Benzohypoxanthinen als auch zu Resten der Bindetasche aus. Obgleich das Netzwerk den Affinitätsverlust gegenüber den *lin*-Benzoguaninen nicht kompensieren kann, konnte anhand der Komplexstrukturen zweier C(6)-N-alkylierter *lin*-Benzoguanine der potentiell große Einfluss günstiger Protein-Wasser- und Ligand-Wasser-Interaktionen auf die Bindungsaffinität gezeigt werden. Der Alkylrest der C(6)-N-alkylierten *lin*-Benzoguanine erwirkt eine ungünstige Anordnung der umgebenden Wassermoleküle hinsichtlich der gebildeten Wechselwirkungen zu Protein und Ligand. Im Speziellen konnte die ligandbedingte vollständige Desolvatation eines Serins die insgesamt geringste Bindungsaffinität eines C(6)-N-ethylierten Liganden strukturell begründen.

Zukünftiges Design von TGT-Inhibitoren sollte die gezeigten nachteiligen Effekte der Verdrängung bestimmter, an der Solvation der Bindetasche beteiligter Wassermoleküle berücksichtigen. Vor diesem Hintergrund wird in einer geplanten Serie von *lin*-Benzoguaninen die Seitenkette an C(4) des Trizyklus dem natürlichen Substrat der TGT ähnlicher sein. Ribosederivate sollen in der Ribose34-Tasche positioniert werden und neben direkten Interaktionen zum Protein Wassermoleküle möglichst affinitätsneutral durch OH-Funktionen ersetzen.

In Kapitel 4 wurde eine Serie disubstituierter *lin*-Benzoguanine und *lin*-Benzohypoxanthine im Hinblick auf den kristallographischen Bindungsmodus und die Bindungsaffinität charakterisiert. Die Kombination zweier Substituenten am trizyklischen Grundgerüst ermöglicht die zeitgleiche Bindung der Liganden in der Ribose33- und Ribose34-Tasche. Hierdurch konnte erstmals eine pikomolare Bindungsaffinität für einen TGT-Inhibitor erreicht werden. Der Vergleich der beschriebenen disubstituierten Verbindungen mit ihren monosubstituierten Analoga machte jedoch deutlich, dass sich die Beiträge der einzelnen Substituenten zur Bindungsaffinität nicht zwingend additiv zusammensetzen - somit disubstituierte *lin*-Benzoguanine und *lin*-Benzohypoxanthine nicht generell affiner sind als ihre monosubstituierten Ausgangsverbindungen. Diese Beobachtung konnte anhand der untersuchten Komplexstrukturen begründet werden. Die Seitenketten disubstituierter Inhibitoren können sich im Sinne kooperativer Effekte beeinflussen, welche

wahrscheinlich durch diskret verschobene Wassermoleküle zwischen beiden Substituenten vermittelt werden. So kann der C(2)-Substituent in der Ribose33-Tasche die Kontakte des C(4)-Substituenten zur Ribose34-Tasche verbessern bzw. verschlechtern. Für zwei unter diesen Aspekten untersuchte Liganden konnten zunächst überraschende Affinitätstrends erklärt werden.

Die in Kapitel 2 beschriebene Flexibilität eines Dimer *interface*-assoziierten Helix-*loop*-Motivs war auch für die Interpretation der Kristallstrukturen in Kapitel 4 entscheidend. Die räumliche Nähe des aktiven Zentrums zum Dimer *interface* führt dazu, dass die apolaren Reste am Boden der Ribose34-Tasche gleichermaßen zur Protein-Protein-Interaktion beitragen und hierbei den N-Terminus der o.g. *loop*-Struktur bilden. Ein Valinrest der Ribose34-Tasche konnte als "Schalter" zwischen geordnetem, kristallographisch konserviertem Arrangement des Helix-*loop*-Motivs und massiver Unordnung dieser Region identifiziert werden. Nur wenn das genannte Valin eine definierte Konformation am Boden der Ribose34-Tasche ungestört einnehmen kann, tritt auch die geordnete Anordnung des Helix-*loop*-Motivs auf. Vor diesem Hintergrund konnte die von nur geringgradig erweiterten Ligandseitenketten verursachte kristallographische Unordnung des Helix-*loop*-Motivs im Zusammenhang mit reduzierten Bindungsaffinitäten diskutiert werden. Letztgenannte sind hierbei wahrscheinlich durch ligandbedingte Einschränkungen der konformativen Freiheitsgrade des Valinrestes und der nachfolgenden Helix-*loop*-Struktur in Lösung bedingt. Für das weitere Design neuer TGT-Inhibitoren sollte die dargestellte Charakteristik der Ribose34-Tasche stärker berücksichtigt werden. Außerdem sollten zukünftige strukturelle Analysen von TGT-Ligand-Komplexen möglichst auf Kokristallstrukturen basieren, da diese den Bindungsmodus der Liganden in Lösung gegenüber *soaking*-Strukturen besser abbilden.

Weiterhin konnte in Kapitel 4 erstmals ein kristallographisch geordneter Bindungsmodus für die C(2)-Seitenketten dreier Liganden in der Ribose33-Tasche festgestellt werden. Auffällig ist hierbei die Ummantelung der apolaren Seitenketten durch kristallographisch definierte Wassernetzwerke, welche die geordneten Konformationen vermutlich stabilisieren. Ein signifikanter Einfluss des geordneteren Bindungsmodus auf die Bindungsaffinität der entsprechenden Liganden ist hingegen nicht festzustellen. In einer weiterführenden Studie könnte das thermodynamische Bindungsprofil der dargestellten Liganden mittels isothermer Titrationskalorimetrie

(ITC) untersucht werden. Aufgrund der kristallographischen Befunde sind für die hier untersuchten Verbindungen deutliche Unterschiede hinsichtlich Bindungsenthalpie und -entropie zu erwarten.

Kapitel 5 beschreibt eine TGT-Variante, in deren Bindetasche ein Aspartat mittels positionsgerichteter Mutagenese durch ein Asparagin ersetzt wurde. Letztgenanntes fungiert als Modell eines permanent protonierten Aspartats. Das ersetzte Aspartat ist aufgrund seiner Beteiligung an der Ligandbindung und der TGT-katalysierten Basenaustauschreaktion von Interesse. Durch vergleichende Kristallstrukturanalyse von Wildtyp und Variante konnte der Protonierungszustand des Aspartats abgeleitet werden - es liegt auch unter leicht sauren pH-Bedingungen deprotoniert vor. Die gezeigten Ergebnisse stellen die Vorarbeit einer ITC-Studie dar, in welcher der Einfluss umgebender Aspartate auf das pK_a -Profil von *lin*-Benzopurinen ermittelt werden soll.

In Kapitel 6 konnte mittels Thermophoresemessungen erstmals die Dissoziationskonstante der tRNA gegenüber TGT direkt bestimmt werden. Die Messung der Thermophorese kann für zukünftige Studien die Bestimmung von Ligandaffinitäten - unabhängig von der katalytischen Aktivität der TGT - ermöglichen. Letztgenannte Größe ist durch Punktmutationen im aktiven Zentrum leicht beeinflussbar. In vorangegangenen Arbeiten waren entsprechende Affinitätsbestimmungen daher nur bedingt möglich.

9 Material und Methoden

9.1 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien sind in Tabelle 9.1 aufgeführt.

Tabelle 9.1 Eingesetzte Chemikalien und deren Hersteller in alphabetischer Reihenfolge.

Name	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid (30% / 0,8%)	ROTH
Agar-Agar	ROTH
Alexa Fluor®647 Succinimidylester	Invitrogen
Chloramphenicol	ROTH
Chloroform:Isoamylalkohol 24:1	Sigma Aldrich
Complete™ mini protease inhibitor, EDTA free	Roche
Coomassie Brilliant Blue R250	ROTH
Dimethylsulfoxid (DMSO) p.a.	ROTH
1,4-Dithiothreitol (DTT)	ROTH
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Glycerol	Merck
[8- ³ H]-Guanin	Sigma Aldrich
Guanin HCl	Sigma Aldrich
Hefeextrakt	ROTH
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES)	ROTH
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	ROTH
Kanamycinsulfat	AppliChem
β-Mercaptoethanol	Merck
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	ROTH
Pepton aus Casein	ROTH
PEG8000	Sigma Aldrich
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1	Sigma Aldrich
Rotiphorese Gel 30	ROTH
Rotiszint™ Scintillation cocktail für lipophile Proben	ROTH
Trichloressigsäure (TCA)	Fluka
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	ROTH
Tween20	Sigma Aldrich

9.2 Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Geräte sind in Tabelle 9.2 aufgeführt.

Tabelle 9.2 Eingesetzte Geräte und deren Hersteller in alphabetischer Reihenfolge.

Gerät	Hersteller
ÄKTA FPLC	GE Healthcare
Feinwaage Typ 404/13	Sauter
Five easy pH-Meter	Mettler Toledo
Heizrührer IKA-COMBIMAG REG	Janke & Kunkel
Hera Safe Sterilbank	Thermo Scientific
Monolith NT.015T	NanoTemper Technologies
Monolith NT.115 standard treated capillaries	NanoTemper Technologies
NAP5 sephadex column	GE Healthcare
Phenylsepharosesäule XK 16	Amersham Bioscience
Pipetten	Eppendorf
Q-Sepharosesäule XK26	Amersham Bioscience
Schüttelinkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific
Schüttelinkubator Innova 4300	New Brunswick Scientific
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
SDS-Gelelektrophoresekammer Mini-V8*10	Life Technologies
Szintillationszähler	Packard
Thermomixer comfort 2mL	Eppendorf
Ultraschall Sonifier 250	Branson
UV-Vis-Spektrometer Smart Spec 3000	BioRad
Vakuumpumpe DNA Mini	Jouan Nordic
Vivaflow 200 10.000 MWCO Hydrosart	Sartorius
Vortexer VF2	Janke & Kunkel
Waage Typ 572/45	Kern
Zeba spin desalting columns 7K MWCO	Thermo Scientific
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3	Heraeus

9.3 Lösungen und Puffer

In Tabelle 9.3 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt. Sofern nicht anders vermerkt ist das Lösungsmittel entmineralisiertes Wasser. Fehlende Volumenanteile wurden mit entmineralisiertem Wasser aufgefüllt. pH-Werte wurden mit Natriumhydroxid-Lösung (0,1 mol/L) und Salzsäure (37% m/m) am pH-Meter eingestellt.

Tabelle 9.3 Eingesetzte Lösungen und Puffer in alphabetischer Reihenfolge.

Name	Zusammensetzung
Alexa647-Lsg.	1 g/L Alexa Fluor®647 Succinimidylester in DMSO
APS-Lsg.	10% (m/v) Ammoniumpersulfat
Chloramphenicol-Lsg.	34 mg/mL Chloramphenicol, steril filtriert
Coomassie-Blue Entfärberlsg.	10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol
Coomassie-Blue Färbelsg.	10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol, 1 g/L Coomassie Brilliant Blau R250
IPTG-Lsg.	1 M IPTG, steril filtriert
Laemml-Puffer	0,25 M Tris, 2M Glycerin, 1% (m/v) SDS, pH 8,3
SDS-Sammelgepuffer	1 M Tris, pH 6,8
SDS-Probenpuffer	250 mM Tris, 8% (m/v) SDS, 40% (v/v) Glycerol, 0,04% (m/v) Bromphenolblau, 8%(v/v) β -Mercaptoethanol, pH 6,8
SDS-Trenngepuffer	1 M Tris, pH 8,8
TGT-Puffer A	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,8
TGT-Puffer B	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 M NaCl, pH 7,8
TGT-Puffer C	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,8
Hochsalzpuffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 7,8
Kristallisationspuffer	100 mM MES, 1 mM DTT, 10% (v/v) DMSO, 13% (m/v) PEG8000, pH 5,5
Kryopuffer	50 mM MES, 0,5 mM DTT, 0,3 M NaCl, 2% (v/v) DMSO, 4% (m/v) PEG8000, 30% (v/v) Glycerol, pH 5,5
LB-Medium	1% (m/v) Pepton aus Casein, 0,5% (m/v) Hefe, 1% (m/v) NaCl, autoklaviert
Agar-LB-Medium	1% (m/v) Pepton aus Casein, 0,5% (m/v) Hefe, 1% (m/v) NaCl, 1,5% (m/v) Agar-Agar, autoklaviert
Kanamycinlsg.	30 mg/mL Kanamycinsulfat in 96% (v/v) Ethanol, steril filtriert
Lysepuffer	20 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 Tablette/50 mL Complete™, pH 7,8
TGT-Assaypuffer	100 mM HEPES, 20 mM MgCl_2 , 323 μM Tween20, pH 7,3
TCA 5%	TCA 5% (m/v)
TCA 10%	TCA 10% (m/v)
MST-Labelingpuffer	50 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 8,1
MST-Puffer A	100 mM HEPES, 323 μM Tween20, pH 7,3
MST-Puffer B	100 mM HEPES, 323 μM Tween20, 5% (v/v) DMSO, pH 7,3
MST-Stopp-Puffer	200 mM Tris, pH 8,1

9.4 Bakterienstämme und Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 9.4 beschrieben. Als Vektoren fungierten die in Tabelle 9.5 aufgeführten Plasmide.

Tabelle 9.4 Verwendete Stämme von *E. coli* mit genetischen Eigenschaften und Herstellern.

Stamm	Genotyp	Hersteller
XL2-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac^fZΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R</i>]	Stratagene
BL21(DE3) pLysS	F' <i>dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻)galλ(DE3)</i>	Stratagene

Tabelle 9.5 Verwendete Plasmide mit Eigenschaften und Herstellern.

Name	Eigenschaften	Hersteller
pET9d-ZM4	Cm ^r , Km ^r ; ColEI-origin, <i>tac</i> -promotor, kodiert für <i>laq^fmalE lacZα</i> ; eingefügtes TGT-Gen as 1.3 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Nco</i> I-Fragment	[Reuter, Ficner et al., 1995]
pET9d-ZM4-Asp102Asn ptRNA2	Cm ^r , Km ^r , TGT-Asp102Asn Amp ^r ; <i>E.coli tRNA^{Tyr}</i> als <i>Bst</i> NI-Fragment unter Kontrolle des T7-promotors in pTZ18U	[Romier, 1997] [Curnow et al., 1995]

9.5 Molekularbiologische Methoden

9.5.1 Mutation des TGT Wildtyp

Das verwendete Plasmid pET9d-ZM4-Asp102Asn (Tabelle 9.5) wurde von C. Romier dargestellt [Romier, 1997]. Nach Transformation in kompetente XL2 Blue Zellen wurde das Plasmid präpariert und zur Kontrolle bei der Firma Eurofins MWG Operon sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung ist im Appendix gezeigt. Anschließend wurde das Plasmid in kompetente BL21(DE3) pLysS-Zellen (Tabelle 9.4) transformiert.

9.5.2 Transformation von Plasmiden

Plasmide können durch kommerziell erhältliche *kompetente* Bakterienzellen im Zuge einer Hitzeschock-Transformation aufgenommen werden. Die entsprechend behandelten Bakterien in etwa 50 µL Kulturvolumen werden mit 100-200 ng Plasmid für 10 min auf Eis in einem Eppendorf-Cup inkubiert. Anschließend wird mit einem

Schüttelinkubator der Hitzeschock für 45 sek bei 42°C durchgeführt. Nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis wird die Bakterienkultur mit LB-Medium auf 500 µL aufgefüllt und bei 37°C für 45 min inkubiert. Die plasmidkodierte Antibiotikaresistenz bildet sich während dieser Zeit aus. Anschließend wird das Zellpellet abzentrifugiert und auf ausgehärtetem Agar-LB-Medium (0,1% (v/v) Kanamycinlsg. und 0,1% (v/v) Chloramphenicolsg.) unter Sterilbedingungen ausplattiert. Kolonien entstehen während der Inkubation bei 37°C für 12 h im Brutschrank nur aus erfolgreich transformierten Klonen.

9.5.3 Überexpression und Aufreinigung

Das durchgeführte Überexpressions- und Aufreinigungsprotokoll basiert auf der von Romier *et al.* eingeführten Verfahrensweise und wurde für Wildtyp-Protein und die dargestellte mutierte Variante gleichsam angewendet [Romier, Ficner et al., 1996].

Der Expressionsstamm *E.coli* BL21(DE3)pLysS (Tabelle 9.4) beinhaltet den entsprechenden Plasmid-Vektor (Tabelle 9.5) und wird in 4 x 10 mL LB-Medium (0,1% (v/v) Kanamycinlsg. und 0,1% (v/v) Chloramphenicolsg.) über 12 h bei 37°C vorkultiviert. Die Hauptkultur, bestehend aus 4 x 1000 mL LB-Medium (0,1% (v/v) Kanamycin- und Chloramphenicolsg.), wird mit je 10 mL der Vorkultur angeimpft und bei 37°C mit 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 inkubiert. Die Überexpression wird dann durch Zugabe von IPTG-Lsg. (1 mM finale Konzentration) induziert. Die Hauptkultur wird für 24 h bei 14°C und 250 rpm inkubiert. Das Zellpellet wird dann durch Zentrifugation abgetrennt (4000 rpm, 10 min, 4°C) und anschließend in Lysepuffer resuspendiert. Die Zellyse erfolgt mittels Ultraschallbehandlung über 4 x 5 min unter Kühlung mit Eis. Das lösliche Protein im Überstand wird von den unlöslichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation abgetrennt (20.000 rpm, 45 min, 4°C).

Die Aufreinigung des Proteins erfolgt über eine zweistufige Affinitätschromatographie (ÄKTA FPLC) und eine finale Mikrokristallisation des Proteins durch Salzzug während der Dialyse. Zunächst wird das Zellysat auf eine Q-Sepharosesäule (äquilibriert mit TGT-Puffer A) aufgetragen. Im Zuge einer Gradientenelution (lineare Erhöhung des Anteils TGT-Puffer B von 0 - 100%, 4 mL/min Säulendurchfluss) wird das Protein von einer Vielzahl von Verunreinigungen getrennt. Das Eluat wird mittels

SDS-PAGE auf das Zielprotein hin untersucht. Anschließend wird die entsprechende Eluat-Fraktion auf eine Phenylsepharosesäule (äquibriert mit TGT-Puffer C) aufgetragen. Der linear zunehmende Anteil von TGT-Puffer A in der mobilen Phase (0 - 100%, Säulendurchfluss 2 mL/min) bewirkt die Elution des Zielprotein. Die entsprechende Fraktion wird mittels SDS-PAGE ermittelt und auf etwa 3 mg/mL Proteinkonzentration aufkonzentriert. Das Konzentrat wird für 12 h bei 4°C gegen 5000 mL TGT-Puffer A dialysiert. Die im Zuge eines inversen Einsalzeffekts entstandenen Mikrokristalle des Zielproteins werden nun abzentrifugiert (4000 rpm, 20 min, 4°C), in Hochsalzpuffer rückgelöst und bei -20°C gelagert.

9.5.4 In-vitro Transkription und Aufreinigung von tRNA

Die angewendete Methode zur Darstellung von *E. coli* tRNA^{Tyr} (ECY2) basiert auf dem von Curnow *et al.* eingeführten Verfahren [Curnow et al., 1995] unter Anwendung des T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production SystemTM (Promega). Das entsprechende Plasmid (Tabelle 9.5) wird hierbei gemäß der Herstellerangabe behandelt. Anschließend wird ein einheitliches 3'-Ende der tRNA durch Inkubation mit Calf Intestine Alkaline PhosphataseTM (Fermentas) entsprechend der Herstellerangaben erzeugt.

9.6 Konzentrationsbestimmung von Protein, DNA und tRNA

Die Konzentrationen von Protein-, DNA- und tRNA-Lösungen werden mittels UV-Spektrometrie nach Nullabgleich gegen die entsprechenden analytenfreien Puffer durchgeführt. Die Konzentrationen errechnen sich nach folgenden Beziehungen:

Z.mobilis TGT:

$$1 \text{ mg/mL (23,4 } \mu\text{M) } Z.mobilis \text{ TGT entspricht } 0,778 A_{280}$$

[Swiss Institute of Bioinformatics, 2012]

E.coli tRNA^{Tyr}:

$$1 \mu\text{M tRNA}^{\text{Tyr}} \text{ entspricht } 0,703 A_{260} \text{ [Curnow et al., 1995]}$$

Ein Quotient $A_{260}/A_{280} > 1,8$ zeigt eine Probenreinheit von mindestens 90% an [Sambrook et al., 1989].

DNA:

$$\text{DNA-Konzentration} = A_{260} \times 50 \mu\text{g/mL} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

9.7 Enzymkinetische Untersuchungen

Die verwendete Methodik zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten (K_i) kompetitiver TGT-Inhibitoren basiert auf der Arbeit von Stengl et al. [Stengl et al., 2005].

Die Inhibitoren liegen quantitativ gelöst in DMSO vor. Aufgrund der schlechteren Löslichkeit im wässrigen Milieu wird ein finaler DMSO-Anteil von 5% (v/v) im Messansatz eingestellt. Es wird eine Verdünnungsreihe mit fünf verschiedenen Inhibitorkonzentrationen in TGT-Assaypuffer erstellt. Das Protein (Konzentration: 150 nM in TGT-Assaypuffer) wird in fünf Ansätzen mit Inhibitor in entsprechend verschiedenen Konzentrationen bei 37°C für 10 min preinkubiert. Parallel wird Protein mit inhibitorfreiem DMSO zur Aktivitätskontrolle inkubiert. Die enzymkatalysierte Reaktion wird durch Zugabe der nötigen Substrate zur TGT-Inhibitor Mischung gestartet. Hierbei wird eine Mischung aus *E.coli* tRNA^{Tyr} und Guanin/[8-³H]-Guanin zugegeben. Der quantitative Reaktionsverlauf wird durch Probennahme nach festen Zeitintervallen ermittelt. Hierbei werden 15 μL Aliquote alle 2 min aus dem Reaktionsansatz entnommen und auf Glasfilterplättchen (GC-F, Whatmann) pipettiert. Die Reaktion stoppt durch direktes Überführen der Glasfilterplättchen in 10% TCA-Lösung. Die folgenden Waschschrte dienen der Entfernung von freiem, nicht in die tRNA inkorporiertem [8-³H]-Guanin, während die modifizierte tRNA am Trägermaterial haftet. Es wird zweimal mit 5% TCA-Lsg. und zweimal mit 96% Ethanol gewaschen. Die Glasfilterplättchen werden bei 60°C für 30 min getrocknet und in je einem Probengefäß mit 4 mL RotiszintTM (ROTH) versetzt. Die radioaktiv markierte tRNA^{Tyr} wird szintigraphisch quantifiziert, wobei die zeitliche Zunahme des Produktes der Enzymreaktion in Abhängigkeit von der herrschenden Inhibitorkonzentration die Ermittlung der Inhibitionskonstante K_i nach Dixon ermöglicht [Dixon, 1953]. Die Anfangsgeschwindigkeit v_i der Enzymreaktion ist bei gegebener Inhibitorkonzentration [I] definiert als:

$$v_i = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (\text{Gleichung 9.1})$$

Die geringe Reproduzierbarkeit der maximalen, durch die Michaelis-Menten Gleichung (Gleichung 9.2) [Michaelis, Menten, 1913] definierten Reaktionsgeschwindigkeit v_0 macht eine neue Ermittlung in jeder Versuchsreihe notwendig. Die Inhibitionskonstante wird durch Kombination der Gleichungen 9.1 und 9.2 bestimmbar gemäß Gleichung 9.3:

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Gleichung 9.2})$$

$$v_i = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \cup v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \Rightarrow \frac{v_0}{v_i} \cdot \frac{K_m + [S]}{K_m} = \frac{1}{K_i} \cdot [I] + \left(\frac{[S]}{K_m} + 1\right)$$

(Gleichung 9.3)

v_0 , Anfangsgeschwindigkeit ohne Inhibitor

v_i , Anfangsgeschwindigkeit mit Inhibitor

K_m , Michaelis-Menten Konstante der tRNA^{Tyr}

[S], tRNA^{Tyr} Konzentration

[I], Inhibitorkonzentration

K_i , kompetitive Inhibitionskonstante

Die Auswertung der Umsatz-Zeit-Beziehung wurde mit dem Programm Grafit 4.09TM (Erithacus Software) durchgeführt.

9.8 Thermophoresemessungen

Z. mobilis TGT wurde auf eine Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ in MST-Labelingpuffer eingestellt. Anschließend wurde diese Lösung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor®647 Succinimidylester (finale Konzentration: 40 mg/L) für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Das molare Verhältnis von Protein zu Farbstoff beträgt hierbei etwa 1 : 3. Freier, nicht kovalent an das Protein gebundener Farbstoff wurde mittels Größenausschlusschromatographie (NAP5 sephadex columnTM) abgetrennt. Die Säule wurde zuvor mit Hochsalzpuffer äquilibriert und diente somit der

parallelen Rücküberführung des Proteins in stabilisierende Pufferbedingungen. Die Effizienz der Markierungsreaktion wurde mittels UV-Spektrometrie durch Parallelbestimmung der Farbstoffkonzentration ($\lambda = 650 \text{ nm}$) und der Proteinkonzentration ($\lambda = 280 \text{ nm}$) überprüft. Hierbei lag das molare Verhältnis von Farbstoff zu Protein typischerweise bei ca. 0,8. Für die Thermophoresemessung wurde die Lösung des nun markierten Proteins auf eine möglichst unter dem erwarteten K_d -Wert des zu untersuchenden Liganden liegende Konzentration in MST-Puffer B eingestellt (gewählte Proteinkonzentration: 20 nM für *lin*-Benzoguanin-Liganden, 200 nM für *lin*-Benzohypoxanthin-Liganden, 100 nM für tRNA^{Tyr}). Die Lösung des markierten Proteins enthielt final 300 mmol/L NaCl. Die verschiedenen, in DMSO gelösten Liganden wurden zunächst in MST-Puffer A verdünnt, wobei ein finaler DMSO-Anteil von 5% (v/v) eingestellt wurde. Die weiteren Verdünnungsschritte dieser Ligandenlösung wurden mit MST-Puffer B durchgeführt. Hierdurch konnte eine die Messung störende Konzentrationsverschiebung von DMSO über die Verdünnungsreihe der Liganden verhindert werden. Die ebenfalls charakterisierte tRNA^{Tyr} wurde abweichend von den *lin*-Benzoguanin/hypoxanthin - Liganden in MST-Puffer A (20 mmol/L MgCl₂) gelöst und weiter verdünnt. Ebenso wurde in dieser Messreihe das Protein in MST-Puffer A (20 mmol/L MgCl₂, final: 300 mmol/L NaCl) verdünnt. Die gewählten Ligand/tRNA^{Tyr}- Konzentrationen in den Verdünnungsreihen richteten sich nach den ungefähr zu erwartenden K_d -Werten der Analyten. Für die hochaffinen *lin*-Benzoguanin-Liganden wurden 12 Verdünnungen (1:1) durchgeführt (1,25 $\mu\text{mol/L}$ - 305 pmol/L). Für die niedriger affinen *lin*-Benzohypoxanthin-Liganden und die tRNA^{Tyr} wurden 15 Verdünnungen (1:1) durchgeführt (10 $\mu\text{mol/L}$ - 305 pmol/L). Für die Messung der Thermophorese wurden je 10 μL der Lösung des markierten Proteins 1 : 1 mit einer Lösung der Ligand- bzw. tRNA^{Tyr}-Verdünnungsreihe gemischt und unter Lichtausschluss für 10 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Messlösungen für 10 min bei 10.000 x g (8°C) zentrifugiert und weitere 10 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Etwa 2 μL jeder Messlösung wurden in Glaskapillaren (Monolith NT.115 standard treated capillariesTM, NanoTemper Technologies) überführt. Die Messung der Thermophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit dem Messgerät Monolith NT.015TM (NanoTemper Technologies) bei 100% LED Leuchtstärke und 60% Infrarotlaser-Stärke. Jede Messlösung wurde an mindestens drei Kapillarpositionen vermessen, wobei die erhaltenen Datenpunkte gemittelt wurden. Die Analyse der Messkurven und die Berechnung der Dissoziationskonstante K_d wurde mit

dem Programm Origin 7TM (Origin Lab) basierend auf der Gleichung 9.4 durchgeführt [Wienken et al., 2010]:

$$T = U + (B - U) \cdot \frac{(c_p + c_i + K_d) - \sqrt{(c_p + c_i + K_d)^2 - 4 \cdot c_p \cdot c_i}}{2 \cdot c_p} \quad \text{(Gleichung 9.4)}$$

T = Thermophoresis-Signal

U = minimales Signal (Freies Protein)

B = maximales Signal (Protein gesättigt mit Ligand)

c_p = Konzentration des fluoreszenzmarkierten Proteins

c_i = Ligand-Konzentration

K_d = Dissoziationskonstante

Die erhaltenen Messkurven sind im Appendix dargestellt.

9.9 Röntgenstrukturanalyse

9.9.1 *Z. mobilis* Kristallisation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur Kristallisation von TGT im Komplex mit verschiedenen Liganden angewendet. Bei der Kokristallisation ist der Ligand während des gesamten Kristallisationsprozesses anwesend, während bei der alternativen *soaking*-Methode der Ligand erst nach erfolgter Kristallisation zum Kristallisationsansatz hinzu gegeben wird.

Kristalle wurden mittels der *hanging-drop vapour diffusion* - Methode bei 288 K gewonnen. Das Reservoir der Kristallisationskammer wurde mit 500 μ L Kristallisationspuffer gefüllt. Vorbereitend zur *soaking*-Methode wurden 2 μ L Proteinlösung (12 mg/mL in Hochsalzpuffer) mit 2 μ L Kristallisationspuffer gemischt. Nach wenigen Tagen wurden Kristalle mit einer ungefähren Größe von 0,7 x 0,7 x 0,2 mm erhalten. Die Kristalle wurden für ca. 24 h in eine 5 mM Lösung des jeweiligen Liganden in Kristallisationspuffer transferiert. Der Begriff *soaking* beschreibt hier das Eindiffundieren des Liganden in die Proteinkristalle.

Zur Kokristallisation wurde eine Proteinlösung mit dem in DMSO gelösten Liganden gemischt (final: 12 mg/mL Protein in Hochsalzpuffer, 10% (v/v) DMSO, 1,5 mM Ligand). Auch hier wurden nach wenigen Tagen Kristalle mit einer ungefähren Größe von 0,7 x 0,7 x 0,2 mm erhalten. Mit Ausnahme der Verbindung **29** wurden alle in dieser Arbeit kristallographisch untersuchten Liganden im Komplex mit TGT kokristallisiert. Für Ligand **7** wurde sowohl *soaking* als auch Kokristallisation durchgeführt. Die Diffraktionseigenschaften der untersuchten Kristalle ermöglichten hochaufgelöste Datensatzsammlungen.

9.9.2 Datensammlung

Zur Minimierung von Strahlenschäden wurden die Kristalle unter kryogenen Bedingungen (100 K) vermessen. Zuvor wurden die Kristalle für etwa 60 sek. in den Kryopuffer überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Datensätze wurden entweder *in-house* am Institut für Pharmazeutische Chemie in Marburg oder am Helmholtzzentrum für Materialien und Energie, BESSY II in Berlin gemessen (siehe Appendix). *In-house* Datensätze wurden durch Exposition der Kristalle gegen CuK α -Strahlung ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) erhalten. Als Strahlenquelle diente eine Incoatec I μ S microfocus sourceTM fokussiert mit einer Incoatec Montel Optik. Die Diffraktionsbilder wurden mit einem mar dtb imaging plate systemTM detektiert.

Datensätze wurden weiterhin an der BESSY-PSF Beamline 14.2 gesammelt. Die Kristalle wurden hier Synchrotronstrahlung ($\lambda = 0.91841 \text{ \AA}$) ausgesetzt, während die Diffraktionsbilder mittels eines Rayonix MX-225TM CCD-Detektors aufgezeichnet wurden.

Alle untersuchten TGT-Kristalle wiesen eine monokline Raumgruppe *C2* mit einem TGT-Monomer pro asymmetrischer Einheit auf. Die Datenprozessierung und Skalierung wurde mit dem Programmpaket HKL2000TM (HKL Research, Inc.) durchgeführt. Zellparameter sowie Datensatz- und Verfeinerungsstatistiken sind im Appendix dargestellt.

9.9.3 Strukturbestimmung und Verfeinerung

Für alle gemessenen Datensätze wurde das CNS-Programmpaket [Brünger et al., 1998] zur initialen *rigid-body*-Verfeinerung, einem zyklischen *simulated annealing* und einer Verfeinerung des B-Werts genutzt. Die Koordinaten einer TGT-apo-Struktur (PDB ID: 1P0D [Brenk et al., 2003]) dienten hierbei als Startmodell. Aufgrund der hohen Auflösung aller Datensätze wurden die weiteren Verfeinerungszyklen mit dem Programm SHELXL-97 durchgeführt [Sheldrick et al., 1997]. In jedem Verfeinerungszyklus wurden 20 *conjugate gradient* - Minimierungen unter Anwendung der Standardeinstellungen hinsichtlich der Beschränkungen für zulässige Bindungslängen, Bindungswinkel und B-Werte durchgeführt. Im Rahmen der Kreuzvalidierung wurden 5% der verwendeten Daten zur Berechnung des R_{free} -Wertes herangezogen. Zwischen den einzelnen Verfeinerungszyklen wurde das Proteinmodell mittels des Programms COOT [Emsley et al., 2004] entsprechend der berechneten Elektronendichte manuell moduliert. Anschließend wurden das Ligandmolekül sowie Wasser- und Glycerolmoleküle in die sigmaA-gewichtete Differenzelektronendichte eingepasst und in weitere Verfeinerungszyklen einbezogen. In einem finalen Verfeinerungszyklus wurden Wasserstoffatome im Rahmen des Reitermodells ohne Parametererweiterung hinzugefügt. Die Analyse des so verfeinerten Modells wurde mit dem Programm PROCHECK [Laskowski et al., 1993] durchgeführt. Alle im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Kristallstrukturen wurden in der PDB (<http://www.rcsb.org>) deponiert (PDB ID: siehe Appendix).

10 Appendix

10.1 Sequenzierung des TGT(Asp102Asn)-Plasmids

Das Ergebnis der Sequenzierung wurde mit der DNA-Sequenz von TGT Wildtyp aligniert (untere Reihe):

```

EMBOSS_001      1 MVEATAQETDRPRFSFSIAAREGKARTGTIEMKRGVIRTPAFMPVGTAAAT
EMBOSS_001      1 MVEATAQETDRPRFSFSIAAREGKARTGTIEMKRGVIRTPAFMPVGTAAAT

EMBOSS_001     51 VKALKPETVRATGADIILGNTYHMLRPGAERIAKLGGLHSFMGWD RPIL
EMBOSS_001     51 VKALKPETVRATGADIILGNTYHMLRPGAERIAKLGGLHSFMGWD RPIL

EMBOSS_001    101 TNSGGYQVMSLSSLTKQSEEGVTFKSHLDGSRHMLS PERSIEIQHLLGSD
EMBOSS_001    101 TDSGGYQVMSLSSLTKQSEEGVTFKSHLDGSRHMLS PERSIEIQHLLGSD

EMBOSS_001    151 IVMAFDECTPYPATPSRAASSMERSMRWAKRSRDAFDSRKEQAENAALFG
EMBOSS_001    151 IVMAFDECTPYPATPSRAASSMERSMRWAKRSRDAFDSRKEQAENAALFG

EMBOSS_001    201 IQQGSVFENLRQQSADALAEIGFDGYAVGGLAVGEGQDEMFRVLDFSVPM
EMBOSS_001    201 IQQGSVFENLRQQSADALAEIGFDGYAVGGLAVGEGQDEMFRVLDFSVPM

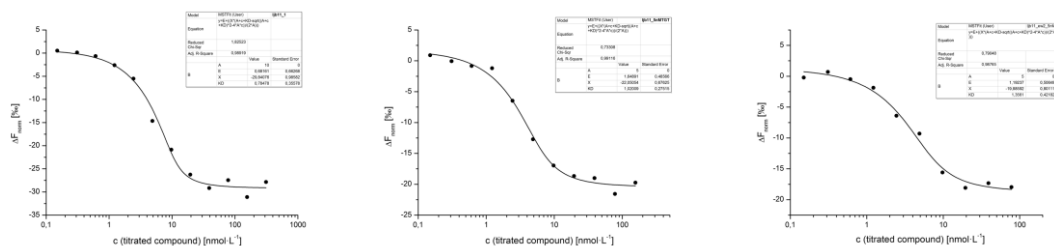
EMBOSS_001    251 LPDDKPHYLMGVGKPPDDIVGAVERGIDMFDCVLPTRSGRNGQAFTWDGPI
EMBOSS_001    251 LPDDKPHYLMGVGKPPDDIVGAVERGIDMFDCVLPTRSGRNGQAFTWDGPI

EMBOSS_001    301 NIRNARFSEDLKPLDSECHCAVCQKWSRAYIHHLIRAGEILGAMLMEHN
EMBOSS_001    301 NIRNARFSEDLKPLDSECHCAVCQKWSRAYIHHLIRAGEILGAMLMEHN

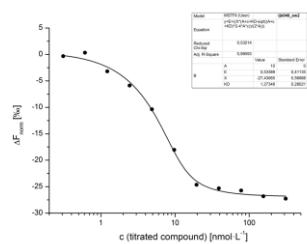
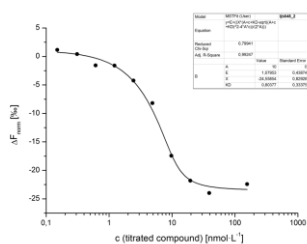
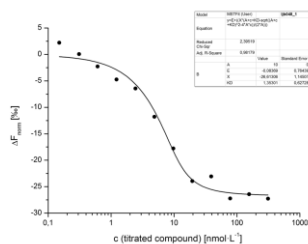
EMBOSS_001    351 IAFYQQLMQKIRDSISEGRFSQFAQDFRARYFARNS 386
EMBOSS_001    351 IAFYQQLMQKIRDSISEGRFSQFAQDFRARYFARNS 386
    
```

10.2 Bestimmung von Dissoziationskonstanten durch Thermophorese

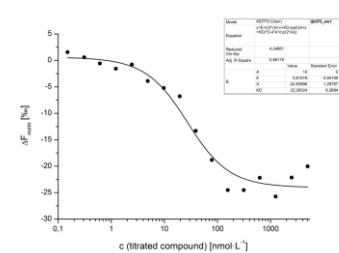
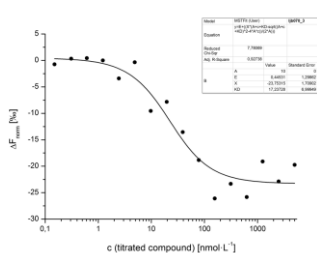
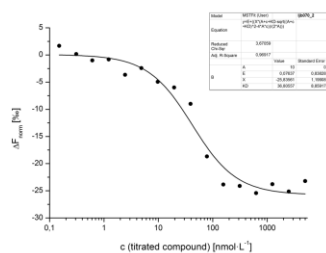
Ligand 1



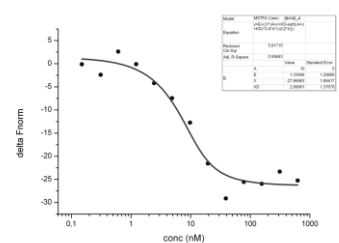
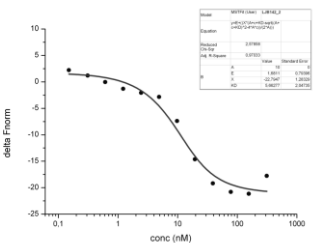
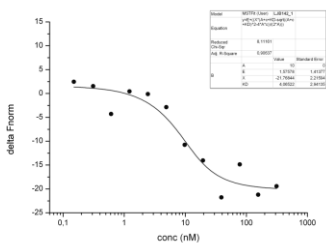
Ligand 3



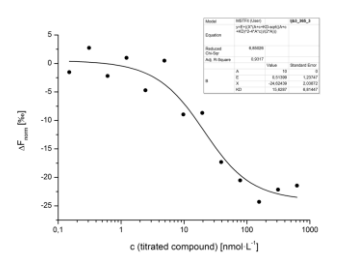
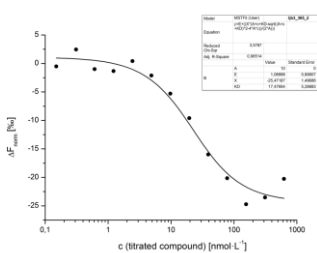
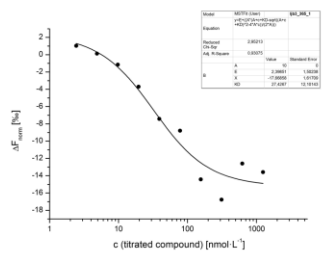
Ligand 4



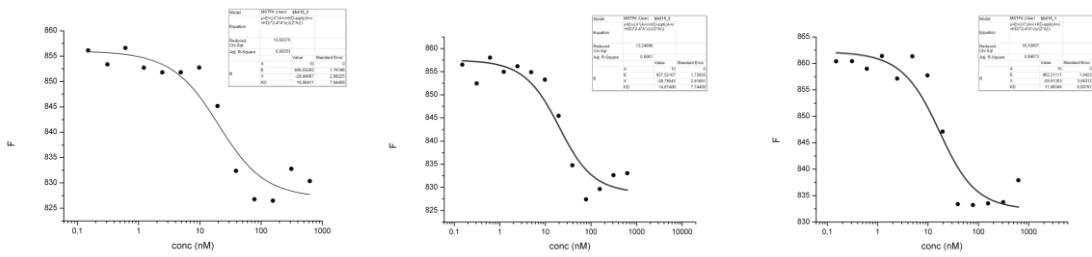
Ligand 7



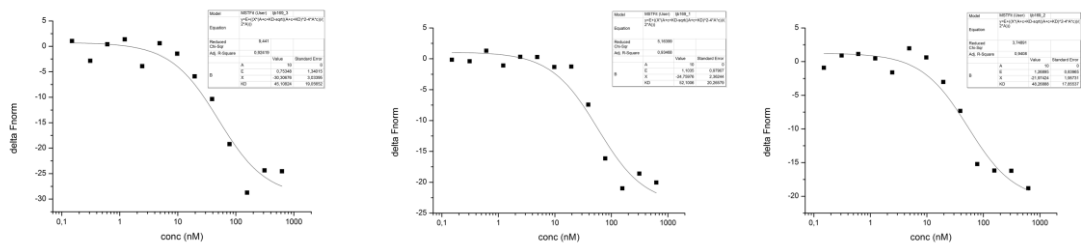
Ligand 8



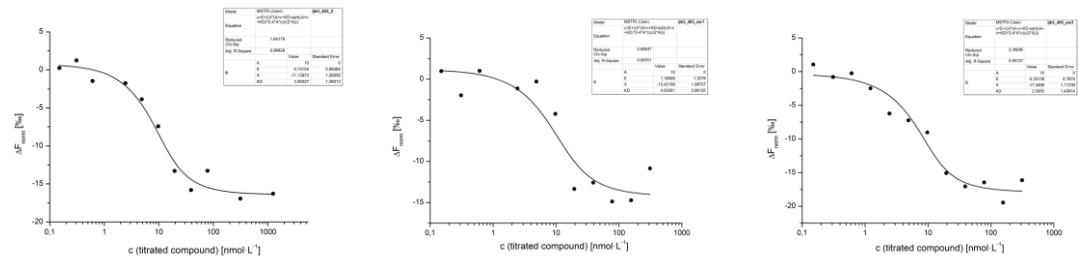
Ligand 9



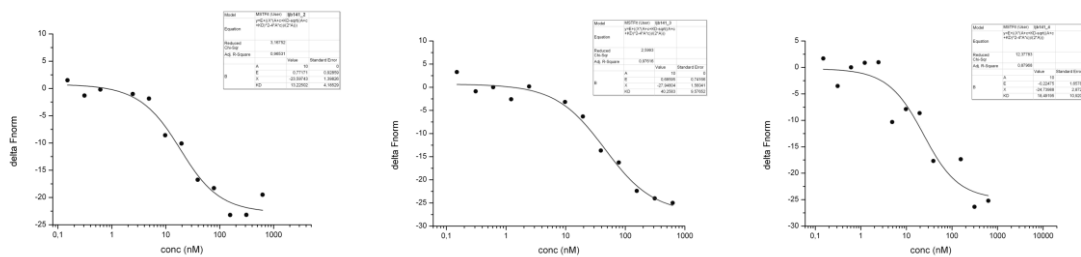
Ligand 10



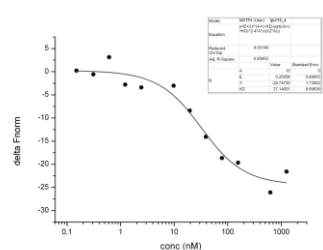
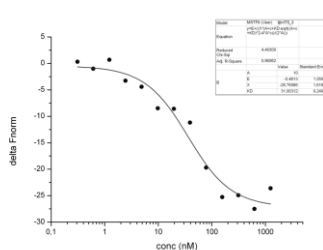
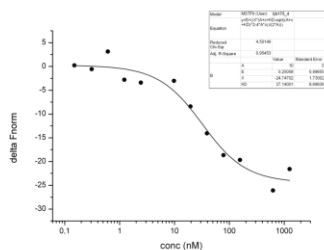
Ligand 11



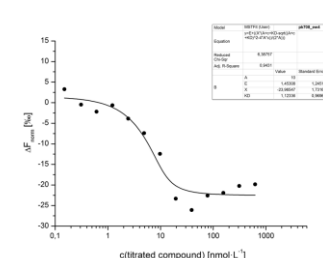
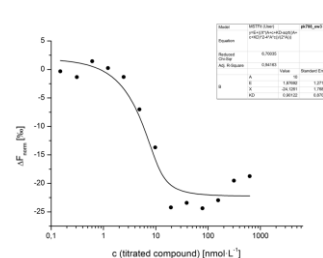
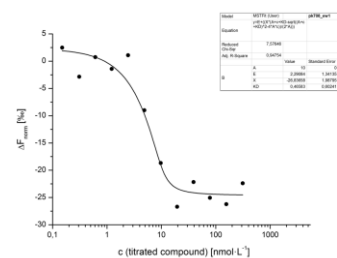
Ligand 12



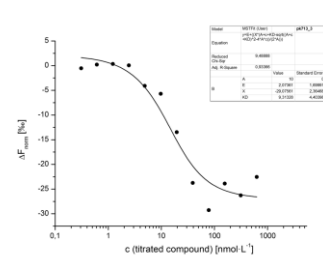
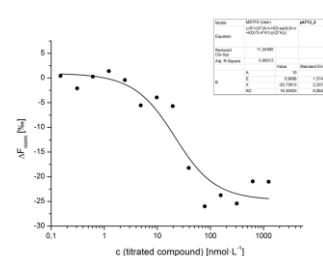
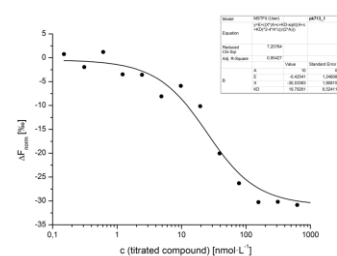
Ligand 13



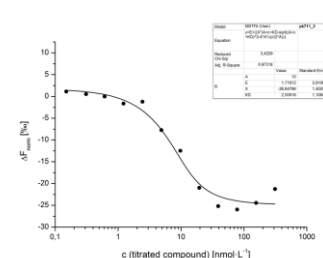
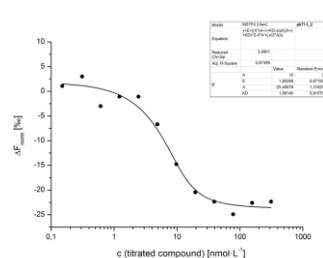
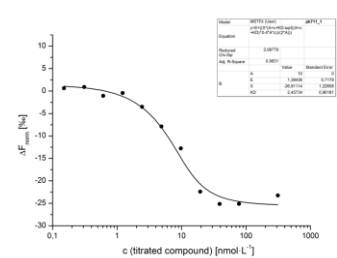
Ligand 27



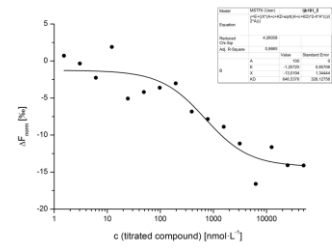
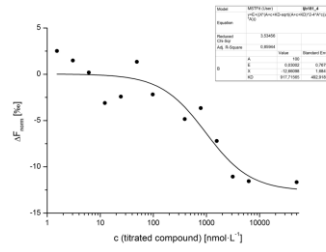
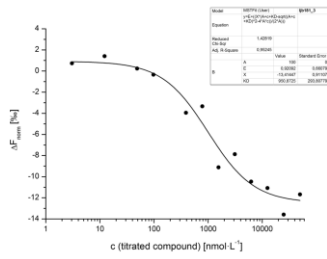
Ligand 28



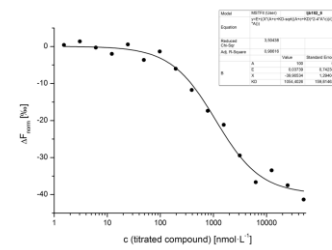
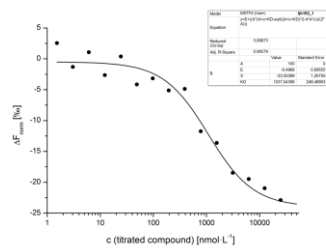
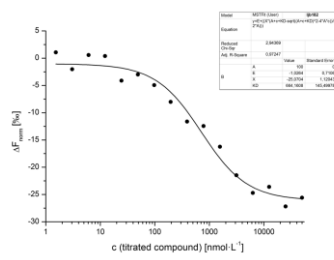
Ligand 29



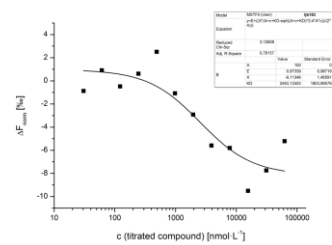
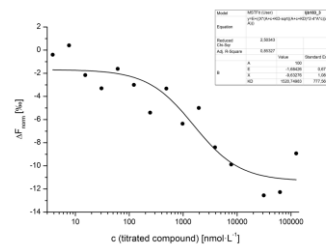
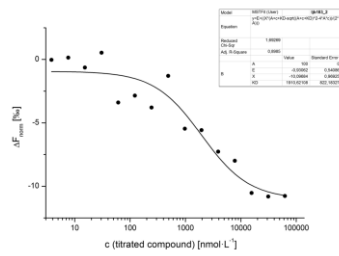
Ligand 30



Ligand 31



Ligand 32



10.3 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken

Crystal data	1	7	7	12
PDB ID	4FPS	4FR6	4FSA	4FR1
A) Data collection and processing				
Beamline	BESSY 14.2	BESSY 14.2	BESSY 14.2	BESSY 14.2
no. crystal used	1	1	1	1
λ [Å]	0.91841	0.91841	0.91841	0.91841
space group	C2	C2	C2	C2
unit cell parameters [Å]				
a [Å]	90.0	84.8	91.1	84.8
b [Å]	64.7	64.8	64.9	64.8
c [Å]	70.7	71.3	70.8	71.4
β [°]	96.0	93.0	96.3	94.0
B) Diffraction data				
resolution range [Å]	30 – 1.45	30 – 1.59	50 – 1.62	30 – 1.74
unique reflections	70951 (3478) ^[a]	51448 (2576) ^[a]	51849 (2587) ^[a]	39417 (1864) ^[a]
R (<i>I</i>)sym [%]	6.4 (46.1) ^[a]	3.5 (9.1) ^[a]	5.0 (34.6) ^[a]	7.9 (27.2) ^[a]
completeness [%]	99.1 (97.6) ^[a]	99.4 (99.3) ^[a]	99.5 (99.6) ^[a]	99.2 (93.0) ^[a]
redundancy	2.8 (2.7) ^[a]	3.3 (3.3) ^[a]	2.9 (2.9) ^[a]	3.0 (2.6) ^[a]
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	16.9 (2.1) ^[a]	26.1 (11.9) ^[a]	19.2 (3.4) ^[a]	13.4 (3.3) ^[a]
C) Refinement				
program used for refinement	SHELXL	SHELXL	SHELXL	SHELXL
resolution range [Å]	30-1.45	30 – 1.59	50 – 1.62	30 – 1.74
reflections used in refinement	67344	48267	47606	36165
final <i>R</i> values				
R_{free} (Fo; Fo > 4 σ Fo) ^[c]	19.7 (18.6)	19.5 (19.2)	20.7 (19.8)	23.3 (21.9)
R_{work} (Fo; Fo > 4 σ Fo) ^[d]	16.7 (15.7)	16.3 (16.1)	17.1 (16.3)	18.4 (17.4)
no. of atoms (non-hydrogen)				
protein atoms	2736	2611	2626	2556
water molecules	259	271	242	216
ligand atoms	31	29	21	27
RMSD, angle [°]	2.3	2.2	2.1	1.9
RMSD, bond [Å]	0.010	0.010	0.008	0.007
Ramachandran plot ^[e]				
Most favoured regions [%]	94.8	94.4	95.9	94.3
additionally allowed regions [%]	4.9	5.3	3.8	5.3
generously allowed regions [%]	0.3	0.3	0.3	0.4
mean B-factors [Å ²]				
protein atoms	15.7	15.9	18.8	18.0
water molecules	27.7	28.4	30.0	27.9
ligand atoms	12.9	15.9	19.4	16.7
Wilson B-factor [Å ²]	14.9	14.5	18.3	16.5
Matthews Coefficient [Å ³ /Da]	2.39	2.29	2.43	2.29

Crystal data	15	15 (D102N)	16	17
PDB ID	3SIG	4GHR	3RR4	3TLL
A) Data collection and processing				
Beamline	BESSY 14.2	in-house	BESSY 14.2	BESSY 14.2
no. crystal used	1	1	1	1
λ [Å]	0.91841	1.5418	0.91841	0.91481
space group	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2
unit cell parameters [Å]				
a [Å]	90.8	90.2	90.7	91.2
b [Å]	64.8	64.5	64.8	64.8
c [Å]	70.6	70.6	70.5	70.3
β [°]	95.9	95.6	96.0	96.0
B) Diffraction data				
resolution range [Å]	30 – 1.82	50-2.0	30 – 1.68	30 – 1.37
unique reflections	35920	26737	45107	81623
	(1807) ^[a]	(1289) ^[a]	(2115) ^[a]	(3991) ^[a]
R (<i>I</i>)sym [%]	5,8 (24,1) ^[a]	7.4 (30.7) ^[a]	5.9 (28.7) ^[a]	3.1 (13.1) ^[a]
completeness [%]	97,9	97.7	96.3	95
	(98,2) ^[a]	(96.0) ^[a]	(90.9) ^[a]	(94.5) ^[a]
redundancy	2.7 (2.2) ^[a]	2.8 (2.6) ^[a]	2.9 (2.3) ^[a]	2.7 (2.7) ^[a]
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	17,9 (3.6) ^[a]	14.0 (3.2) ^[a]	19.5 (2.1) ^[a]	25.2 (8.1) ^[a]
C) Refinement				
program used for refinement	SHELXL	SHELXL	SHELXL	SHELXL
resolution range [Å]	30-1.82	50-2.0	30 – 1.68	30-1.37
reflections used in refinement	34666	25678	42831	76018
final <i>R</i> values				
R _{free} (Fo; Fo > 4 σ Fo) ^[c]	21.4	24.8	20.0	16.8
	(20.0)	(22.2)	(19.0)	(16.3)
R _{work} (Fo; Fo > 4 σ Fo) ^[d]	16.3	17.5	15.9	12.6
	(15.3)	(15.9)	(15.0)	(12.4)
no. of atoms (non-hydrogen)				
protein atoms	2794	2654	2864	2873
water molecules	249	217	290	367
ligand atoms	16	16	18	20
RMSD, angle [°]	1.9	1.8	2.0	2,1
RMSD, bond [Å]	0.007	0.006	0.008	0.013
Ramachandran plot ^[e]				
Most favoured regions [%]	95,0	94.3	94.9	96.2
additionally allowed regions [%]	4,6	5.4	4.8	3.5
generously allowed regions [%]	0,4	0.3	0.3	0.3
mean B-factors [Å ²]				
protein atoms	15.1	18.0	15.8	14.0
water molecules	24.5	27.2	25.7	28.3
ligand atoms	12.7	17.1	14.8	12.4
Wilson B-factor [Å ²]	14.0	18.1	15.8	11.5
Matthews Coefficient [Å ³ /Da]	2.41	2.39	2.40	2.40

Crystal data	21	24	27	28
PDB ID	3V0Y	3SM0	4GKT	4GIY
A) Data collection and processing				
Beamline	BESSY 14.2	BESSY 14.2	BESSY 14.2	BESSY 14.2
no. crystal used	1	1	1	1
λ [Å]	0.91841	0.91841	0.91481	0.91841
space group	C2	C2	C2	C2
unit cell parameters [Å]				
a [Å]	91.0	91.0	90.4	85.0
b [Å]	64.9	64.9	64.9	64.7
c [Å]	70.6	71.2	70.7	71.3
β [°]	95.9	96.4	96.1	94.1
B) Diffraction data				
resolution range [Å]	30 – 1.65	25 – 1.57	50 - 1.53	50-1.75
unique reflections	45274	54458	61168	38282
	(2008) ^[a]	(2425) ^[a]	(3062) ^[a]	(1952) ^[a]
R (<i>I</i>)sym [%]	4.7 (29.9) ^[a]	5.6 (27.0) ^[a]	5.9 (38.6) ^[a]	10.1 (39.1) ^[a]
completeness [%]	95.9	93.8	99.7	98.2
	(81.8) ^[a]	(83.9) ^[a]	(99.9) ^[a]	(99.8) ^[a]
redundancy	2.5 (2.2) ^[a]	2.7 (2.2) ^[a]	3.3 (3.3) ^[a]	2.9 (2.9) ^[a]
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	19.0 (2.6) ^[a]	16.2 (2.7) ^[a]	18.0 (2.7) ^[a]	11.2 (3.3) ^[a]
C) Refinement				
program used for refinement	SHELXL	SHELXL	SHELXL	SHELXL
resolution range [Å]	30 – 1.65	25-1.57	50 - 1.53	50-1.75
reflections used in refinement	43009	51761	58711	36905
final <i>R</i> values				
R_{free} (Fo; Fo > 4 σ Fo) ^[c]	21.8	20.3	20.0	23.2
	(20.5)	(18.8)	(18.8)	(22.0)
R_{work} (Fo; Fo > 4 σ Fo) ^[d]	17.4	16.4	17.2	19.5
	(16.4)	(15.4)	(16.2)	(18.4)
no. of atoms (non-hydrogen)				
protein atoms	2734	2763	2666	2572
water molecules	246	291	255	176
ligand atoms	16	25	33	34
RMSD, angle [°]	2.0	2.2	2.1	1.9
RMSD, bond [Å]	0.008	0.009	0.009	0.007
Ramachandran plot ^[e]				
Most favoured regions [%]	95.7	94.5	95.6	94.5
additionally allowed regions [%]	4.0	4.9	4.0	5.2
generously allowed regions [%]	0.3	0.6	0.4	0.3
mean B-factors [Å ²]				
protein atoms	19.4	17.6	17.0	19.8
water molecules	28.7	28.6	28.3	27.9
ligand atoms	23.8	15.0	25.7	18.8
Wilson B-factor [Å ²]	17.6	16.4	16.0	17.6
Matthews Coefficient [Å ³ /Da]	2.41	2.44	2.40	1.75

Crystal data	29	30	31	32
PDB ID	4G14	4GG9	4GH1	4GH3
A) Data collection and processing				
Beamline	BESSY 14.2	BESSY 14.2	BESSY 14.2	BESSY 14.2
no. crystal used	1	1	1	1
λ [Å]	0.91841	0.91841	0.91841	0.91841
space group	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2
unit cell parameters [Å]				
a [Å]	89.9	91.2	90.9	91.8
b [Å]	64.7	65.0	64.9	65.0
c [Å]	70.7	70.7	71.1	70.9
β [°]	96.1	96.2	96.4	96.6
B) Diffraction data				
resolution range [Å]	50-1.97	30-1.48	30-1.45	30-2.06
unique reflections	28479	67886	72023	25082
	(1386) ^[a]	(3191) ^[a]	(3368) ^[a]	(1226) ^[a]
R (<i>I</i>) _{sym} [%]	10.6 (39.0) ^[a]	4.3 (26.9) ^[a]	3.3 (19.9) ^[a]	5.9 (22.0) ^[a]
completeness [%]	99.9	98.5	99.0	97.1
	(100) ^[a]	(94.7) ^[a]	(92.6) ^[a]	(93.8) ^[a]
redundancy	3.5 (3.4) ^[a]	2.9 (2.6) ^[a]	2.5 (2.7) ^[a]	2.4 (2.0) ^[a]
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	11.8 (2.8) ^[a]	19.5 (3.5) ^[a]	25.3 (3.8) ^[a]	15.9 (4.0) ^[a]
C) Refinement				
program used for refinement	SHELXL	SHELXL	SHELXL	SHELXL
resolution range [Å]	50-1.97	30-1.48	30-1.45	30-2.06
reflections used in refinement	27339	64852	69890	24251
final <i>R</i> values				
R _{free} (Fo; Fo > 4 σ Fo) ^[c]	24.8	18.8	20.6	26.5
	(23.4)	(18.1)	(19.9)	(24.4)
R _{work} (Fo; Fo > 4 σ Fo) ^[d]	18.8	14.0	17.4	18.7
	(17.2)	(13.4)	(16.7)	(17.5)
no. of atoms (non-hydrogen)				
protein atoms	2655	2699	2731	2644
water molecules	165	303	302	188
ligand atoms	27	31	26	20
RMSD, angle [°]	1.8	2.2	2.2	1.8
RMSD, bond [Å]	0.006	0.010	0.011	0.006
Ramachandran plot ^[e]				
Most favoured regions [%]	94.7	96.0	94.4	94.4
additionally allowed regions [%]	4.9	3.7	5.0	5.3
generously allowed regions [%]	0.4	0.3	0.6	0.3
mean B-factors [Å ²]				
protein atoms	16.6	17.6	16.8	19.4
water molecules	25.9	30.2	28.5	26.7
ligand atoms	15.3	24.3	18.0	19.2
Wilson B-factor [Å ²]	16.3	15.7	15.3	19.5
Matthews Coefficient [Å ³ /Da]	2.38	2.42	2.42	2.45

[a] Values in parenthesis are statistics for the highest resolution shell. [b] $R(I)_{\text{sym}} = [\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)] \cdot 100$, where $\langle I(h) \rangle$ is the mean of the $I(h)$ observation of reflection h . [c] $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} |F_o - F_c| / \sum_{hkl} |F_o|$. [d] R_{free} was calculated as shown for R_{work} but on refinement-excluded 5% of data. [e] Calculated with *Procheck*.

11 Literatur

- Allen, F. H. (2002). The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Cryst. B58*, 380-388.
- Atkins, P. W., de Paula, J. (2003), Physical Chemistry, Ninth edition (Oxford University Press).
- Avdeef, A., Bendels, S., Di, L., Faller, B., Kansy, M., Sugano, K., Yamauchi, Y. (2007). PAMPA-critical factors for better predictions of absorption. *J. Pharm. Sci.* *96*, 2893-2909.
- Berg, T. (2003). Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* *42*, 2462-2481.
- Biela, A., Sielaff, F., Terwesten, F., Heine, A., Steinmetzer, T., Klebe, G. (2012). Ligand binding stepwise disrupts water network in thrombin: Enthalpic and entropic changes reveal classical hydrophobic effect. *J Med Chem* *55*(13), 6094-6110.
- Bogan, A. A., Thorn, K. S. (1998). Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol* *280*, 1-9.
- Branden, C., Tooze, J. (1991). Introduction to Protein Structure, Garland Publishing, Inc., New York
- Brenk, R., Stubbs, M.T., Heine, A., Reuter, K., Klebe, G. (2003). Flexible adaptations in the structure of the tRNA-modifying enzyme tRNA-guanine transglycosylase and their implications for substrate selectivity, reaction mechanism and structure-based drug design. *ChemBioChem* *4*, 1066-1077.
- Bretner, M., Schalinski, S., Borowski, P., Kulikowski, T. (2003). 5'-O-fluorosulfonylbenzoyl esters of purine nucleosides as potential inhibitors of NTPase/helicase and polymerase of Flaviviridae viruses. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* *22*, 1531-1533.
- Bruno, I. J., Cole, J. C., Edgington, P. R., Kessler, M., Macrae, C. F., McCabe, P., Pearson, J., Taylor, R. (2002). New software for searching the Cambridge Structural Database and visualizing crystal structures. *Acta Cryst. B58*, 389-397.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nigles, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L.M., Simonson, T., Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D* *54*, 905-921.
- Case, D.A., Darden, T.A., Cheatham, T.E., Simmerling, C.L., Wang, J., Duke, R.E., Luo, R., Walker, R.C., Zhang, W., Merz, K.M., Roberts, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Swails, J., Goetz, A.W., Kolossvai, I., Wong, K.F., Paesani, F., Vanicek, J., Wolf, R.M., Liu, J., Wu, X., Brozell, S.R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Cai, Q., Ye, X., Wang, J., Hsieh, M.-J., Cui, G., Roe, D.R.,

- Mathews, D.H., Seetin, M.G., Salomon-Ferrer, R., Sagui, C., Babin, V., Luchko, T., Gusarov, S., Kovalenko, A., Kollman, P.A. (2012). AMBER 12, University of California, San Francisco
- Chacko, S., Silverton, E., Kam-Morgan, L., Smith-Gill, S., Cohen, G., Davies, D. (1995). Structure of an antibody-lysozyme complex unexpected effect of conservative mutation. J. Mol. Biol 245, 261-274.
- Clackson, T., Wells, J. A. (1995). A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. Science 267, 383-386.
- Curnow, A. W., Garcia, G. A. (1995). tRNA-guanine transglycosylase from Escherichia coli. Minimal tRNA structure and sequence requirements for recognition. J Biol Chem 270, 17264-67.
- Dixon, M. (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J. 55 (1), 170-171.
- Dorman, C. J., Porter, M. E. (1998). The Shigella virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms. Molecular Microbiology 29, 677-684.
- Durand, J. M., Okada, N., Tobe, T., Watarai, M., Fukuda, I., Suzuki, T., Nakata, N., Komatsu, K., Yoshikawa, C., Sasakawa, C. (1994). vacC, a virulence-associated chromosomal locus of Shigella flexneri, is homologous to tgt, a gene encoding tRNA-guanine transglycosylase (Tgt) of Escherichia coli K-12. J Bacteriol 176, 4627-4634.
- Durand, J. M., Bjork, G. R., Kuwae, A., Yoshikawa, M., Sasakawa, C. (1997). The modified nucleoside 2-methylthio-N6-isopentenyladenosine in tRNA of Shigella flexneri is required for expression of virulence genes. J Bacteriol 179, 5777-5782.
- Durand, J. M., Dagberg, B., Uhlin, B. E., Björk, G. R. (2000). Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of Shigella flexneri: the expression of the virF gene. Mol. Microbiol. 35, 924-935.
- Dvořáková, H., Holý, A., Masojídková, M. (1988). Fluorescent analogues of acyclic inhibitors of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. Collect. Czech. Chem. Commun. 53, 1779-1794.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., Wall, R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. J. Mol. Biol 179, 125-142.
- Eldrup, A. B., Allerson, C. R., Bennett, C. F., Bera, S., Bhat, B., Bhat, N., Bosserman, M. R., Brooks, J., Burlein, C., Carroll, S. S., Cook, P. D., Getty, K. L., MacCoss, M., McMasters, D. R., Olsen, D. B., Prakash, T. P., Prhavc, M., Song, Q., Tomassini, J. E., Xia, J. (2004). Structure-activity relationship of purine ribonucleosides for inhibition of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. J. Med. Chem. 47, 2283-2295.

- Ellermann, M., Jakob-Roetne, R., Lerner, C., Borroni, E., Schlatter, D., Roth, D., Ehler, A., Rudolph, M. G., Diederich, F. (2009). Molecular recognition at the active site of catechol-o-methyltransferase: energetically favorable replacement of a water molecule imported by a bisubstrate inhibitor. Angew. Chem. Int. Ed. *48*, 9092-9096.
- Emsley, P., Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallographica Section D *60*, 2126-2132.
- Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Le Bouguéneq, C., Denamur, E. (2004). A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in Escherichia coli. Molecular Biology and Evolution *21*, 1085-1094.
- Fernandez, M. I., Sansonetti, P. J. (2003). Shigella interaction with intestinal epithelial cells determines the innate immune response in shigellosis. Int. J. Med. Microbiol. *293*, 55-67.
- Fiser, A., Do, R.K.G., Sali, A. (2000). Modeling of loops in protein structures. Prot Sci *9*, 1753-1773.
- Fiser, A., Sali, A. (2003). ModLoop: automated modeling of loops in protein structures. Bioinformatics *19*, 2500-01.
- Forsyth, W. R., Antosiewicz, J. M., Robertson, A. D. (2002). Empirical relationships between protein structure and carboxyl pKa values in proteins. Proteins *48*, 388-403.
- Frank, C., Faber, M. S., Askar, M., Bernard, H., Fruth, A., Gilsdorf, A., Höhle, M., Karch, H., Krause, G., Prager, R., Spode, A., Stark, K., Werber, D. (2011). Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011. Euro. Surveill. *16*, 19878.
- Frey, B., McCloskey, J., Kersten, W., Kersten, H. (1988) New function of vitamin B12: cobamide-dependent reduction of epoxyqueuosine to queuosine in tRNAs of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. J Bacteriol *170*, 2078-2082.
- Gong, X., Figus, M., Plewa, J., Levorse, D., Zhou, L., Welch, C. (2008). Evaluation of Multiplexed CE with UV Detection for Rapid pKa Estimation of Active Pharmaceutical Ingredients. Chromatographia *68*, 219-225.
- Grädler, U., Gerber, H.-D., Goodenough-Lashua, D. M., Garcia, G. A., Ficner, R., Reuter, K., Stubbs, M. T., Klebe, G. (2001). A new target for shigellosis: rational design and crystallographic studies of inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase. J. Mol. Biol. *306*, 455-467.
- Hof, H., Dörries, R. (2005). Medizinische Mikrobiologie, 3. Auflage, Thieme Verlag, Weinheim
- Hol, W. G. J. (1985). The role of the alpha-helix dipole in protein function and structure. Prog. Biophys. molec. Biol. *45*, 149-195.

- Hoops, G. C., Townsend, L. B., Garcia, G. A. (1995). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: structure-activity studies investigating the role of the aminomethyl substituent of the heterocyclic substrate PreQ1. Biochemistry *34*, 15381-7.
- Hörtner, S. R., Ritschel, T., Stengl, B., Kramer, C., Schweizer, W. B., Wagner, B., Kansy, M., Klebe, G., and Diederich, F. (2007). Potent Inhibitors of tRNA-Guanine Transglycosylase, an Enzyme Linked to the Pathogenicity of the *Shigella* Bacterium: Charge-Assisted Hydrogen Bonding. Angew. Chem. Int. Ed. *46*, 8266-8269.
- Iwata-Reuyl, D. (2003). Biosynthesis of the 7-deazaguanosine hypermodified nucleosides of transfer RNA. Bioorg Chem *31*, 24-43.
- Jennison, A. V., Verma, N. K. (2004). *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. FEMS Microbiology Reviews *28*, 43-58.
- Klebe, G. (2009). Wirkstoffdesign, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Kohler, P. C., Ritschel, T., Schweizer, W. B., Klebe, G., Diederich, F. (2009). High-affinity inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase replacing the function of a structural water cluster. Chem. Eur. J. *15*, 10809-10817.
- Kotloff, K., Winickoff, J., Ivanoff, B., Clemens, J., Swerdlow, D., Sansonetti, P. (1999). Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull. W.H.O. 651-666.
- Krueger, A. T., Peterson, L. W., Chelliserry, J., Kleinbaum, D. J., Kool, E. T. (2011). Encoding phenotype in bacteria with an alternative genetic set. J. Am. Chem. Soc. *133*, 18447-51.
- Kussie, P. H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A. J., Pavletich, N. P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. Science *274*, 948-953.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F., McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. Science *240(4860)*, 1759-64.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Cryst. *26 (2)*, 283-291.
- Launay, O., Sadorge, C., Jolly, N., Poirier, B., Bechet, S., van der Vliet, D., Seffer, V., Fenner, N., Dowling, K., Giemza, R., Johnson, J., Ndiaye, A., Vray, M., Sansonetti, P., Morand, P., Poyart, C., Lewis, D., Gougeon, M. L. (2009). Safety and immunogenicity of SC599, an oral live attenuated *Shigella dysenteriae* type-1 vaccine in healthy volunteers: Results of a Phase 2, randomized, double-blind placebo-controlled trial. Vaccine *27*, 1184-91.

- Lee, B., Richards, F. M. (1971). The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. J. Mol. Biol 55(3), 379-400.
- Lee, B., Van Lanen, S. G., Iwata-Reuyl, D. (2007). Mechanistic studies of *Bacillus subtilis* QueF, the nitrile oxidoreductase involved in queuosine biosynthesis. Biochemistry 46, 12844-854.
- Leo, A., Hansch, C., Elkins, D. (1971). Partition coefficients and their uses. Chem. Rev. 71, 525-616.
- Leonard, N. J., Kaźmierczak, F., Rykowski, A. (1987). A convenient synthesis of lin-benzopurines through a common intermediate. J. Org. Chem. 52, 2933-2935.
- Macrae, C. F., Bruno, I. J., Chisholm, J. A., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., Rodriguez-Monge, L., Taylor, R., van de Streek, J., Wood, P. A. (2008). Mercury CSD 2.0 - New Features for the Visualization and Investigation of Crystal Structures. J. Appl. Cryst. 41, 466-470.
- McCarthy, R. M., Somogyi, A., Bandarian, V. (2009). *Escherichia coli* QueD is a 6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase. Biochemistry 48, 2301-2303.
- McCarthy, R. M., Somogyi, A., Lin, G., Jacobsen, N. E., Bandarian, V. (2009). The deazapurine biosynthetic pathway revealed: in vitro enzymatic synthesis of preQ0 from guanosine 5'-triphosphate in four steps. Biochemistry 48, 3847-3852.
- McMillan, K., Adler, M., Auld, D., Baldwin, J., Blasko, E., Browne, L., Chelsky, D., Davey, D., Dolle, R., Eagen, K., Erickson, S., Feldmani, R., Glaser, C., Mallari, C., Morrissey, M., Ohlmeyer, M., Pan, G., Parkinson, J., Phillips, G., Polokoff, M., Sigal, N., Vergona, R., Whitlow, M., Young, T., Devlin, J. (2000). Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. PNAS 97, 1506-1511.
- Meyer, E. A., Donati, N., Guillot, M., Schweizer, W. B., Diederich, F., Stengl, B., Brenk, R., Reuter, K., and Klebe, G. (2006). Synthesis, Biological Evaluation, and Crystallographic Studies of Extended Guanine-Based (lin-Benzoguanine) Inhibitors for tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT). Helv. Chim. Acta 89, 573-597.
- Michaelis, L., Menten, M. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z. 49, 333-369.
- Moreira, I. S., Fernandes, P. A., Ramos, M. J. (2007). Hot spots - a review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. Proteins 68, 803-812.
- Nakanishi, S., Ueda, T., Hori, H., Yamazaki, N., Okada, N., Watanabe, K. (1994). A UGU sequence in the anticodon loop is a minimum requirement for recognition by *Escherichia coli* tRNA-guanine transglycosylase. J Biol Chem 269, 32221-25.
- Neudert, G., Klebe, G. (2011). fconv: Format conversion, manipulation and feature computation of molecular data. Bioinformatics 27, 1021-1022.

- Okada, N., Nishimura, S. (1979). Isolation and characterization of a guanine insertion enzyme, a specific tRNA transglycosylase, from *Escherichia coli*. J Biol Chem 254, 3061-3066.
- Petrova, T., Steuber, H., Hazemann, I., Cousido-Siah, A., Mitschler, A., Chung, R., Oka, M., Klebe, G., El-Kabbani, O., Joachimiak, A., Podjarny, A. (2005). Factorizing selectivity determinants of inhibitor binding toward aldose and aldehyde reductases: structural and thermodynamic properties of the aldose reductase mutant Leu300Pro-fidarestat complex. J. Med. Chem. 48, 5659-5665.
- Phillips, G., Yacoubi, B. E., Lyons, B., Alvarez, S., Iwata-Reuyl, D., et al. (2008). Biosynthesis of 7-deazaguanosine-modified tRNA nucleosides: a new role for GTP cyclohydrolase I. J Bacteriol 190, 7876-7884.
- Porter, M. A., Hall, J. R., Locke, J. C., Jensen, J. H., Molina, P. A. (2006). Hydrogen bonding is the prime determinant of carboxyl pKa values at the N-termini of alpha-helices. Proteins 63, 621-635.
- Reuter, K., Ficner, R. (1995). Sequence analysis and overexpression of the *Zymomonas mobilis* tgt gene encoding tRNA-guanine transglycosylase: purification and biochemical characterization of the enzyme. J. Bacteriol. 177, 5284-5288.
- Rewcastle, G. W., Palmer, B. D., Bridges, A. J., Hollis Showalter, H. D., Sun, L., Nelson, J., McMichael, A., Kraker, A. J., Fry, D. W., Denny, W. A. (1996). Tyrosine kinase inhibitors. 9. Synthesis and evaluation of fused tricyclic quinazoline analogues as ATP site inhibitors of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor. J. Med. Chem. 39, 918-928.
- Ritschel, T., Kohler, P. C., Heine, A., Diederich, F., Klebe, G. (2009). How to replace the residual solvation shell of polar active site residues to achieve nanomolar inhibition of tRNA-guanine transglycosylase. ChemMedChem 4, 2012-2023.
- Ritschel, T., Hörtner, S., Heine, A., Diederich, F., Klebe, G. (2009). Crystal structure analysis and in silico pKa calculations suggest strong pKa shifts of ligands as driving force for high-affinity binding to TGT. ChemBioChem 10, 716-727.
- Ritschel, T., Atmanene, C., Reuter, K., Van Dorselaer, A., Sanglier-Cianferani, S., Klebe, G. (2009). An integrative approach combining noncovalent mass spectrometry, enzyme kinetics and X-ray crystallography to decipher Tgt protein-protein and protein-RNA interaction. J. Mol. Biol. 393, 833-847.
- Robert-Koch-Institut (2010). Epidemiologisches Bulletin 38/2010.
- Robert-Koch-Institut (2011). Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch Deutschland 2011.
- Romier, C., Ficner, R., Reuter, K., Suck, D. (1996). Purification, crystallization, and pre-liminary x-ray diffraction studies of tRNA-guanine transglycosylase from *Zymomonas mobilis*. Proteins: Structure, Function, and Genetics 24, 516-519.

- Romier, C., Reuter, K., Suck, D., Ficner, R. (1996). Crystal structure of tRNA-guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange. Embo J 15, 2850-2857.
- Romier, C. (1997). Crystallographic and Mutagenesis Studies of tRNA-Guanine Transglycosylase. Dissertation, Université de la Méditerranée Aix-Marseille II, Marseille (Frankreich)
- Rotella, D. P., Sun, Z., Zhu, Y., Krupinski, J., Pongrac, R., Seliger, L., Normandin, D., Macor, J. E. (2000). Optimization of substituted N-3-benzylimidazoquinazolinone sulfonamides as potent and selective PDE5 inhibitors. J. Med. Chem. 43, 5037-5043.
- Sack, R. B., Rahman, M., Yunus, M., & Khan, E. H. (1997). Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease. Clin Infect Dis 24 *Suppl 1*, pp 102-105.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sansonetti, P. J. (2001). III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280:G318-323.
- Sheldrick, G. M., Schneider, T. R. (1997). SHELXL: high-resolution refinement. Methods Enzymol. 277, 319-343.
- Stengl, B., Reuter, K., Klebe, G. (2005). Mechanism and substrate specificity of tRNA-guanine transglycosylases (TGTs): tRNA-modifying enzymes from the three different kingdoms of life share a common catalytic mechanism. Chembiochem 6, 1926-1939.
- Stengl, B., Meyer, E. A., Heine, A., Brenk, R., Diederich, F., Klebe, G. (2007). Crystal structures of tRNA-guanine transglycosylase (TGT) in complex with novel and potent inhibitors unravel pronounced induced-fit adaptations and suggest dimer formation upon substrate binding. J. Mol. Biol. 370, 492-511.
- Steuber, H., Heine, A., Klebe, G. (2007). Structural and thermodynamic study on aldose reductase: nitro-substituted inhibitors with strong enthalpic binding contribution. J. Mol. Biol. 368, 618-638.
- Swiss Institute of Bioinformatics (2012). ProtParam tool. <http://web.expasy.org/protparam/>
- Taylor, E. A., Clinch, K., Kelly, P. M., Li, L., Evans, G. B., Tyler, P. C., Schramm, V. (2007). Acyclic ribooxacarbenium ion mimics as transition state analogues of human and malarial purine nucleoside phosphorylases. J. Am. Chem. Soc. 129, 6984-6985.
- Van Lanen, S. G., Kinzie, G. S., Matthieu, S., Link, T., Culp, J., et al. (2003). tRNA modification by S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase. Assay development and characterisation of the recombinant enzyme. J Biol Chem 278, 10491-499.

- Van Nhieu, G. T., Bourdet-Sicard, R., Duménil, G., Blocker, A., Sansonetti, P. J. (2000). Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. Cellular Microbiology 2, 187-193.
- Verband forschender Arzneimittelhersteller e.V. (2012). Zugelassene gentechnische Arzneimittel in Deutschland. <http://www.vfa.de/de/anzneimittelforschung/datenbanken-zu-anzneimitteln/amzulassungen-gentec.html>
- Wada, A. (1976). The alpha-helix as an electric macro-dipole. Adv Biophys 9, 1-63.
- WHO (2000). The Big Guns of Resistance. In *Overcoming Antimicrobial Resistance*, World Health Report on Infectious Diseases. <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/index.html>.
- Wienken, C. J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D., Duhr, S. (2010). Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. Nat Commun DOI: 10.1038/ncomms1093
- Xie, W., Liu, X., Huang, R. H. (2003). Chemical trapping and crystal structure of a catalytic tRNA guanine transglycosylase covalent intermediate. Nat. Struct. Biol. 10, 781-788.

Danksagung

Ich danke Herrn *Prof. Dr. Gerhard Klebe* herzlich für die interessante Themenstellung dieser Arbeit, die sehr gute und persönliche Betreuung sowie eine sehr lehrreiche Zeit in seiner Arbeitsgruppe. Die zahlreichen Gespräche und Diskussionen, für die er stets Zeit fand, brachten wesentliche Konzepte und Aussagen dieser Arbeit hervor. Ich danke ihm weiterhin für die Korrektur von Manuskripten und Kapiteln dieser Arbeit sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen, das eine freie Bearbeitung der gegebenen Fragestellungen ermöglichte.

Ich danke Herrn *Prof. Dr. Klaus Reuter* herzlich für die zahlreichen, sehr hilfreichen Diskussionen, speziell von experimentellen Aspekten dieser Arbeit. Außerdem danke ich ihm für die Korrektur von Teilen dieser Arbeit und die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ein herzlicher Dank an *Luzi Jakob Barandun, Dr. Philipp Kohler, Sandro Tonazzi* und *Prof. Dr. François Diederich* (ETH Zürich) für die Synthese aller in dieser Arbeit untersuchten TGT-Liganden, die ausgesprochen gute und kollegiale Zusammenarbeit sowie die sehr konstruktiven Videokonferenzen. Herrn *Luzi Jakob Barandun* danke ich außerdem für die zahlreichen guten Diskussionen und die große Verlässlichkeit in den vergangenen Jahren.

Ich danke Herrn *Dr. Andreas Heine* herzlich für die detaillierte Einführung in die Proteinkristallographie, die Hilfestellungen bei der Verfeinerung und Interpretation zahlreicher Kristallstrukturen sowie für die Korrektur von Teilen dieser Arbeit. Außerdem danke ich Herrn *Dr. Holger Steuber* für die Hilfe bei der Verfeinerung zweier Kristallstrukturen dieser Arbeit.

Ich danke *François Debaene, Stéphanie Petiot* und *Dr. Sarah Cianferani-Sanglier* (Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de Strasbourg) für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen der TGT und die gute Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn *Michael Betz* herzlich für die Durchführung der computerbasierten Analysen des TGT Dimer *interface* und die intensiven, sehr konstruktiven Diskussionen der Arbeitsergebnisse.

Ich danke dem *beamline support* des BESSY II in Berlin für die Unterstützung der dort durchgeführten Messungen.

Ein Dankeschön an Herrn *Dr. Stefan Duhr* (nanotemper technologies) für die Beratung rund um die Durchführung von Thermophoresemessungen am TGT-System.

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Christian Sohn* für die Betreuung und Wartung der *in-house* Röntengeräte, seine große Hilfsbereitschaft im und außerhalb des Labors sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bedanken möchte ich mich bei Frau *Lydia Hartleben* für die vielfältige Unterstützung und Hilfsbereitschaft, gerade im Zusammenhang mit zahlreichen Dienstreisen.

Ein großes Dankeschön an die *Administratoren* der Arbeitsgruppe für die Wartung von Netzwerk und Rechnern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein herzliches Dankeschön an *Dres. Jürgen Behnen, Johannes Schulze Wischeler, Tobias Craan* und *Tina Ritschel* für die sehr gute und geduldige Einarbeitung gerade zu Beginn dieser Arbeit.

Ich danke Herrn *Christian Hasewinkel* für die sehr gute Einarbeitung im S1-Labor, die gemeinsame Arbeit im Bereich der Thermophorese, seine große Hilfsbereitschaft und das Teilen seiner fundierten Erfahrungen in molekularbiologischen Arbeitsweisen. Weiterhin danke ich ihm und Frau *Daniela Meyer* für die angenehme Arbeitsatmosphäre im S1-Labor.

Ich danke den Mitgliedern der AG Klebe für die gute Zusammenarbeit. Im Speziellen danke ich *Michael, Jürgen, Johannes, Tobi, Kan, Wei, Christian, Christian* und *Chris* für die schöne Zeit am Institut. *Tobi, Chris, Wei* und *Pilar* danke ich darüber hinaus für die angenehme Büroatmosphäre.

Meiner Familie und *meinen Freunden* danke ich herzlich für ihre vielfältige und unermüdliche Unterstützung und Motivation, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ganz besonders möchte ich *Kathrin* und *meinen Eltern* für ihren immer festen Rückhalt, ihr großes Verständnis und ihr Vertrauen danken.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

***lin*-Benzopurines as Inhibitors of tRNA-Guanine Transglycosylase: Perturbance of Homodimer Formation, Import of Water Clusters and Determinants of Crystallographical Disorder**

selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 01.11.2012

.....

(Florian Peter Philip Immekus)

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum/ -ort: 06. Juni 1983 in Lüdenscheid
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHUL- UND HOCHSCHULBILDUNG

Seit 07/2009 Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg, Arbeitskreis Prof. Dr. Klebe

09/2010 - 01/2012 Aufbaustudium "Intensivkurs Betriebswirtschaftslehre und betriebliches Management" am Institut für Wirtschaftswissenschaftliche Forschung und Weiterbildung der Fernuniversität Hagen

04/2010 - 10/2011 "Zusatzqualifikation im Pharmarecht" an der Forschungsstelle für Pharmarecht der Philipps-Universität Marburg

06/2010 Verleihung des Grades "Diplom-Pharmazeut" an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Thema der Arbeit: "Klonierung, Expression und positionsgerichtete Mutation von humanem Thrombin"

06/2009 Erteilung der Approbation als Apotheker

10/2003 - 04/2008 Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg

08/1993 - 06/2002 Städtisches Albert-Schweitzer-Gymnasium Plettenberg

08/1989 - 06/1993 Grundschule Plettenberg / Ohle

PRAKTIKA

11/2008 - 04/2009 Praktikum in der Regenbogen Apotheke, Münster als Pharmaziepraktikant

05/2008 - 10/2008 Praktikum am Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg, Arbeitskreis Prof. Dr. Klebe als Pharmaziepraktikant

08/2006 - 11/2006 Praktikum im Bereich Pharma Analytics, Merck-Serono

