

**Neue Assays zur Charakterisierung der
Transamidaseaktivität und der GTP-Bindungsfunktion
von Transglutaminase 2**

INAUGURAL DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. nat. med.

der Medizinischen Fakultät

und

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Christoph Hauser

aus Cagliari, Italien

Print Express 24, Köln

2021

Betreuer:

Prof. Dr. Stefan Herzig

Referenten:

Prof. Dr. Raimund Wagener

Prof. Dr. Bernd Neumaier

Datum der mündlichen Prüfung:

16.12.2020

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jeden Danken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefan Herzig für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Zentrum für Pharmakologie der Uniklinik Köln anzufertigen. Durch seine Beiträge und Kommentare bei den unterschiedlichsten wissenschaftlichen Veranstaltungen durfte ich vieles lernen.

Für die Übernahme der Mentorenschaft im Rahmen des Interdisziplinären Promotionsstudiengangs Molekulare Medizin möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Alexander Drzezga sowie bei Prof. Dr. Bernd Neumaier bedanken. Durch die Diskussionen mit Ihnen konnte ich meine wissenschaftliche Sichtweise bedeutend erweitern.

Ausdrücklich möchte ich Dr. Markus Pietsch für seine kontinuierliche und wertvolle Unterstützung, Orientierung und direkte fachliche Betreuung dieser Arbeit danken, ohne die diese Arbeit so nicht entstanden wäre.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Reik Löser bedanken, der mich zu einem wissenschaftlichen Austausch in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und meine Arbeiten dort konstruktiv begleitet hat. Darüber hinaus möchte ich mich für die Bereitstellung der Cadaverinderivate sowie der N^{ϵ} -Acryloyl-lysinpiperazide bedanken.

Bei Prof. Dr. Jacek Jemielity möchte ich für die Bereitstellung der GDP/GTP-analogen Sonden sowie der GDP/GTP-analogen Substanzbibliothek bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Robert Wodtke, Dr. Sandra Hauser für Austausch und Diskussion während meines Aufenthaltes in Dresden und weit darüber hinaus.

Ausdrücklich möchte ich der Friedrich-Naumann-Stiftung für die Freiheit herzlich für das gewährte Stipendium, finanzielle Unterstützung für Konferenzen im Ausland sowie der Möglichkeit zu verschiedensten Workshops und Weiterbildungen danken.

Ebenso bin ich dem Graduiertenprogramm Pharmakologie und experimentelle Therapieforschung der Uniklinik Köln und der Bayer AG für finanzielle Unterstützung für Workshops und Konferenzen zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt ebenso Renata Kasprzyk und Anna Wojtczak für ihre Arbeiten während ihrer Forschungsaufenthalte in Köln, Hendrik Pütz für die Unterstützung bei der prokaryotischen Expression sowie Steffen Honrath, Elena Abraham und Serife Tümer.

Allen weiteren Mitarbeitern aller Arbeitsgruppen, die mich während meiner Arbeit fortlaufend unterstützt und mir zur Seite gestanden haben, möchte ich ebenfalls danken. Besonders hervorheben möchte ich dabei Dr. Ehab El-Awaad, Dr. Michaela Steinkrüger und Dr. Miriam Sheikh für stets offene Ohren, konstruktive Gespräche und sehr viel praktische Anleitung.

PD Dr. Jan Matthes, Doris Theisen, Vera Wiesmüller und Cora Fried haben darüber maßgeblich zu einer herzlichen und konstruktiven Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Zuletzt danke ich im besonderen Maße meinen Freunden, meiner Familie und G. M. Landucci, die mir jederzeit bedingungslos den Rücken stärkten und mich bis zur Ziellinie begleiteten.

Abstract

Transglutaminase 2 (TGase 2) or tissue transglutaminase is a member of the transglutaminase enzyme family and catalyzes transamidation reactions between protein-bound glutaminyl residues and multiple primary amines in a calcium-dependent manner. These primary amines consist of protein-bound lysine residues as well as low-molecular-weight polyamines such as cadaverine. Besides this eponymous function, TGase 2 also catalyzes the deamidation of protein-bound glutaminyl residues. However, TGase 2 not only possesses catalytic activities and is also involved in adhesion-promoting protein-protein-interactions as well as in signal transduction, particularly in its function as G-protein. TGase 2 is constitutively expressed in the whole human body and regulates – besides others – apoptosis and wound healing.

TGase 2 is associated with several diseases, i.e. coeliac disease, fibrosis, diverse neurodegenerative diseases and cancer with only the latter originating in the signal transduction function of TGase 2 whereas its transamidase activity being correlated the pathophysiology of the other disorders.

The presented thesis provides the establishment of a procaryotic expression system of recombinant human TGase 2 and the development of two fluorescence anisotropy-based, high-throughput assays to quantify the transamidase activity as well as the GTP-binding function of TGase 2.

Initially, the transamidase assay was established using guinea pig liver-derived TGase 2 as the common model enzyme for human TGase 2 and was later applied to human TGase 2. The development of this assay consisted of the synthesis of three, in part novel, fluorescence-labeled cadaverins the characterization of the substrate-enzyme interactions, the assay validation using literature-known compounds, the quantification of the transamidase activity's calcium-dependency as well as the investigation of a compound library of *N*^ε-acryloyl-lysine piperazides regarding their potential to inhibit the transamidase activity of TGase 2. Furthermore, the newly developed assay was applied to four other members of the transglutaminase family and selected inhibitors were characterized regarding their selectivity for TGase 2 over the other transglutaminases. Finally, the assay's suitability for a high-throughput screening was demonstrated and a method to determine the active enzyme concentration was described. All syntheses regarding the transamidase assay were conducted

by members of the working group of by the group of Dr. Reik Löser, Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institute of Radiopharmaceutical Cancer Research.

The GTP-binding assay was directly established with recombinant human TGase 2. The development consisted of the synthesis of novel fluorescence-labeled ligands for interaction with the enzyme's GTP-binding site, the characterization of their respective binding affinity to human TGase 2, the validation using literature-known inhibitors, the quantification of the calcium-dependency of the GTP-binding event of human TGase 2 as well as the synthesis and analysis of a substance library of guanosindi- and triphosphate analogs. The studies concludes with an investigation of the suitability for a high-throughput screening. All sysntheses regarding the GTP-binding assay were conducted by members of the working group of Prof. Dr. Jacek Jemielity, Centre of New Technologies and the Division of Biophysics, Faculty of Physics, University of Warsaw.

Zusammenfassung

Transglutaminase 2 (TGase 2), auch Gewebstransglutaminase genannt, gehört zur Familie der Transglutaminasen und bewirkt eine calciumabhängige Transamidierung zwischen proteingebundenen Glutaminylresten und vielfältigen primären Aminen. Zu diesen zählen proteingebundene Lysinreste sowie niedermolekulare Polyamine wie Cadaverin. Über diese namensgebenden Funktion hinaus, führt TGase 2 Deamidierungen proteingebundener Glutaminylreste aus. Neben diesen katalytischen Funktionen ist TGase 2 an Adhäsionsvermittelnden Protein-Protein-Interaktionen sowie an Signalweiterleitungsaktivitäten, unter anderem im Rahmen G-Protein-Funktion beteiligt. TGase 2 wird konstitutiv im ganzen Körper exprimiert und reguliert physiologischerweise unter anderem Apoptose und Wundheilung.

TGase 2 wird darüber hinaus mit vielfältigen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, darunter Zöliakie, Fibrosen, diverse neurodegenerative Erkrankungen sowie Krebs. Dabei steht lediglich bei letzterem die Signalweiterleitungsfunktion im Vordergrund, während bei den anderen Krankheiten die Transamidasefunktion der TGase 2 im Fokus steht.

Die vorliegende Arbeit umfasst den Aufbau eines prokaryotischen Expressionssystems humaner TGase 2 und die Entwicklung zweier Fluoreszenzanisotropie-basierten, hochdurchsatzfähigen Assayverfahren zur Quantifizierung der Transamidaseaktivität sowie der GTP-Bindungsfunktion.

Der Transamidaseassay wurde dabei initial mit TGase 2 aus Meerschweinchenleber, dem gängigsten Modellenzym humaner TGase 2, etabliert und später auf rekombinante humane TGase 2 angewendet. Die Entwicklung umfasste dabei die Synthese dreier teils neuartiger fluoreszenzmarkierter Cadaverine durch die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Reik Löser vom Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, die Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Substraten und Enzym, die Validierung mittels literaturbekannter Hemmstoffe, die Quantifizierung der Calciumabhängigkeit der Enzymaktivität sowie die Untersuchung einer Substanzbibliothek aus N^ε-Acryloyl-lysinpiperaziden hinsichtlich ihrer Hemmung der Transamidaseaktivität von TGase 2. Der entwickelte Assay wurde darüber hinaus auf vier weitere Transglutaminasen übertragen und ausgewählte Hemmstoffe hinsichtlich ihrer Selektivität für TGase 2 hin untersucht. Schließlich erfolgten Demonstrationen der

Tauglichkeit des Assays für Hochdurchsatzverfahren sowie zur Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration.

Der GTP-Bindungsassay wurde in Ermangelung eines literaturbekannten Modells direkt mit rekombinanter humaner TGase 2 etabliert. Die Entwicklung dieses Assays umfasste dabei die Synthese neuartiger fluoreszenzmarkierter Liganden zur Bindung an die GTP-Bindungsstelle von humaner TGase 2, die Charakterisierung der Bindungsstärke dieser Sonden, die Validierung durch literaturbekannter Hemmstoffe, eine Quantifizierung der Calciumabhängigkeit der GTP-Bindung humaner TGase 2 sowie die Synthese und Untersuchung einer Substanzbibliothek aus Analoga von Guanosindi- und triphosphat hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität zu humaner TGase 2. Schließlich erfolgten Untersuchung zur Tauglichkeit für Hochdurchsatzverfahren.

Sämtliche Synthesen bezüglich des GTP-Bindungsassays wurden dabei dankenswerterweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jacek Jemielity von der Universität Warschau durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	10
1. STRUKTUR UND AKTIVITÄTEN DER HUMANEN TRANSGLUTAMINASE 2	10
2. PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DER HUMANEN TRANSGLUTAMINASE 2	16
2.1. TGASE 2 UND ZÖLIAKIE	16
2.2. TGASE 2 UND KATARAKT	17
2.3. TGASE 2 UND FIBROSEN	18
2.4. TGASE 2 UND NEURODEGENERATIVE ERKRANKUNGEN	19
2.5. TGASE 2 UND KREBS	20
3. HEMMSTOFFE DER TRANSGLUTAMINASE 2	23
4. GRUNDLAGEN DER FLUORESZENZPOLARISATION UND -ANISOTROPIE	29
5. ZIELSETZUNG	31
ERGEBNISSE & DISKUSSION	32
1. REKOMBINANTE EXPRESSION HUMANER TRANSGLUTAMINASE 2	32
2. ASSAYS ZUR QUANTIFIZIERUNG DER TRANSAMIDASEAKTIVITÄT VON TGASE 2	38
2.1. ETABLIERUNG EINES NEUEN FLUORESZENZANISOTROPIE-BASIERTEN TRANSAMIDASEASSAYS	45
2.2. CHARAKTERISIERUNG DER SUBSTRAT-ENZYM-INTERAKTION AN gpTGASE 2	48
2.3. CHARAKTERISIERUNG DER SUBSTRAT-ENZYM-INTERAKTION FÜR HUMANE TGASE 2	52
2.4. VALIDIERUNG DES NEUEN ASSAYS MITTELS LITERATURBEKANNTER HEMMSTOFFE	54
2.5. CHARAKTERISIERUNG DER CALCIUMABHÄNGIGKEIT DER TRANSAMIDASEAKTIVITÄT VON TGASE 2	57
2.6. ANWENDUNG DES ASSAYS AUF WEITERE TGASEN	59
2.7. IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG NEUER HEMMSTOFFE AM AKTIVEN ZENTRUM DER TGASE 2	62
2.8. BESTIMMUNG DER REVERSIBILITÄT VON INHIBITOREN MIT N ^F -ACRYLOYLLYSINPIPERAZIDMOTIV	62
2.9. CHARAKTERISIERUNG DER N ^F -ACRYLOYL-LYSINPIPERAZIDE AN gpTGASE 2	64
2.10. CHARAKTERISIERUNG AUSGEWÄHLTER HEMMSTOFFE AN hTGASE 2	70
2.11. BESTIMMUNG DER SELEKTIVITÄT AUSGEWÄHLTER HEMMSTOFFE GEGENÜBER WEITEREN TGASE-ISOFORMEN	72
2.12. WEITERE ANWENDUNGEN DES NEUEN ASSAYS	74
3. ASSAYS ZUR QUANTIFIZIERUNG DER GTP-BINDUNGSAKTIVITÄT VON TGASE 2	78
3.1. ETABLIERUNG EINES NEUEN FLUORESZENZANISOTROPIE-BASIERTEN GTP-BINDUNGSASSAYS	80
3.2. CHARAKTERISIERUNG DER FLUORESZIERENDEN GDP- UND GTP-ANALOGA	81
3.3. EINFLUSS VON MgCl ₂ AUF DAS BINDUNGSVERHALTEN AUSGEWÄHLTER SONDEN AN hTGASE 2	86
3.4. EINFLUSS VON CaCl ₂ AUF DIE GTP-BINDUNGSAKTIVITÄT VON hTGASE 2	87
3.5. VALIDIERUNG DES NEUEN FA-BINDUNGSASSAYS MITTELS LITERATURBEKANNTER LIGANDEN	88

3.6.	CHARAKTERISIERUNG NEUER HEMMSTOFFE MIT GUANIN-NUKLEOTIDSTRUKTUR AN DER GTP-BINDUNGSSTELLE VON HTGASE 2	90
3.7.	CHARAKTERISIERUNG AUSGEWÄHLTER HEMMSTOFFE AN HTGASE 2 IN ANWESENHEIT VON 0.5 MM CaCl ₂	94
3.8.	EIGNUNG DES ASSAYS ZUR VERWENDUNG IN EINEM HOCHDURCHSATZVERFAHREN.....	96
ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK		98
1.	ZUSAMMENFASSUNG	98
2.	AUSBLICK.....	100
MATERIAL & METHODEN.....		103
1.	BAKTERIENSTÄMME	103
2.	EXPRESSIONSVEKTOREN	103
3.	PRIMER	104
4.	ENZYME.....	104
5.	KITS UND REAGENZIEN.....	105
6.	PRIMÄRANTIKÖRPER	106
7.	SEKUNDÄRANTIKÖRPER.....	106
8.	CHEMIKALIEN.....	106
9.	PUFFER.....	107
10.	ZUBEHÖR.....	108
11.	GERÄTE	109
12.	ONLINE-ANWENDUNGEN UND SOFTWARE.....	110
13.	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	110
13.1.	POLYMERASE-KETTENREAKTION	111
13.2.	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	114
13.3.	RESTRIKTIONSVERDAU VON DNS	115
13.4.	LIGATION	116
13.5.	GENERIERUNG VON CHEMISCH KOMPETENTEN <i>E. COLI</i>	116
13.6.	TRANSFORMATION IN <i>E. COLI</i>	117
13.7.	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNS AUS BAKTERIEN.....	117
13.8.	EXPRESSION VON HTGASE 2 IN <i>E. COLI</i>	118
14.	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	118
14.1.	ZELLAUFSCHLUSS VON BAKTERIEN	119
14.2.	AUFREINIGUNG DER REKOMBINANTEN HTGASE 2	119
14.3.	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	120
14.4.	BESTIMMUNG DER PROTEINREINHEIT	120
14.5.	BESTIMMUNG DER PROTEINIDENTITÄT	121

15.	TRANSAMIDASEASSAY.....	122
15.1.	BESTIMMUNG DER FLUORESCENZINTENSITÄT DER CADAVERIN-DERIVATE.....	123
15.2.	ABHÄNGIGKEIT DER ENZYMAKTIVITÄT VON DER ENZYMKONZENTRATION	123
15.3.	CHARAKTERISIERUNG DER ENZYM-SUBSTRAT-INTERAKTION	124
15.4.	HEMMUNG VON TGASE 2 – VALIDIERUNG DES TRANSAMIDASEASSAYS.....	125
15.5.	EIGNUNG DES TRANSAMIDASEASSAYS FÜR DAS HOCHDURCHSATZ-SCREENING.....	125
15.6.	HEMMUNG VON TGASE 2 – N ^E -ACRYLOYL-LYSINPIPERAZIDE.....	125
15.7.	BESTIMMUNG DER AKTIVEN ENZYMKONZENTRATION	126
15.8.	UNTERSUCHUNG DES WIRKMECHANISMUS DER N ^E -ACRYLOYL-LYSINPIPERAZIDE	126
15.9.	BESTIMMUNG DER SELEKTIVITÄT GEGENÜBER ANDEREN TGASEN	127
15.10.	EINFLUSS DER CALCIUMIONENKONZENTRATION AUF DIE TRANSAMIDASEAKTIVITÄT VON HTGASE 2	127
16.	GTP-BINDUNGSASSAY.....	128
16.1.	CHARAKTERISIERUNG DER FLUORESZIERENDEN SONDEN.	129
16.2.	VERDRÄNGUNGSEXPERIMENTE – VALIDIERUNG DES GTP-BINDUNGSASSAYS.....	129
16.3.	VERDRÄNGUNG DURCH GDP-/GTP-ANALOGA	130
16.4.	EINFLUSS DER CALCIUMKONZENTRATION AUF DIE GTP-BINDUNGSFUNKTION VON HTGASE 2	130
16.5.	HEMMUNG DER GTP-BINDUNGSFUNKTION DURCH N ^E -ACRYLOYL-LYSINPIPERAZIDE	130
16.6.	EIGNUNG ZUM HOCHDURCHSATZ-SCREENING.....	131
LITERATURVERZEICHNIS		132
ANHANG		159
1.	EXPRESSIONSVEKTOREN	159
2.	BASESEQUENZEN DER VERWENDETEN KONSTRUKTE.....	161
LEBENS LAUF		FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

Abkürzungsverzeichnis

A	willkürliche Einheit der Fluoreszenzanisotropie
ATP	Adenosintriphosphat
BODIPY	4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen
BSA	Rinderserumalbumin
cDNS	komplementäre DNS
CF	Carboxyfluorescein
DMC	<i>N,N</i> -Dimethylcasein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Konzentration, bei der eine halbmaximale Aktivierung eintritt
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>engl.</i> extracellular matrix)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. -acetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure bzw. -acetat
F-Cad	Fluorescein-5-isothiocyanatcadaverin
FA	Fluoreszenzanisotropie
FXIIIa	aktivierter Fibrin-Stabilisierender Faktor (Faktor XIII)
GDH	Glutamatdehydrogenase
GDP/ GTP	Guanosindiphosphat/ Guanosintriphosphat
gpTGase	Transglutaminase aus dem Meerschweinchen (<i>engl.</i> guinea pig)
GTP γ S	Guanosin-5'-O-[γ -thio]triphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
hFXIIIa	humaner aktivierter Fibrin-Stabilisierender Faktor (Faktor XIII)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>engl.</i> horse raddish peroxidase)
hTGase	humane Transglutaminase
HTS	Hochdurchsatzverfahren (<i>engl.</i> high-throughput screening)
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, bei der eine halbmaximale Hemmung auftritt
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid

LB	Nährmedium zur Bakterienkultur (<i>engl.</i> lysogeny broth)
λ_{ex}	Anregungswellenlänge (<i>engl.</i> excitation)
λ_{em}	Emissionswellenlänge (<i>engl.</i> emission)
λ_{max}	Wellenlänge der maximalen Absorption
k_{cat}	Wechselzahl
K_{D}	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton (= 1000 g/mol)
K_{i}	Dissoziationskonstante eines Inhibitors
K_{m}	Michaeliskonstante
mA	vgl. A \rightarrow m als Dezimalpräfix
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
M_{r}	relative molare Masse
n_{H}	Hill-Koeffizient
NTST	<i>N</i> -terminaler Twin-Strep-tag
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PCS	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> polymerase chain reaction)
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung (<i>engl.</i> relative centrifugal force)
RFU	relative Fluoreszenzeinheit (<i>engl.</i> relative fluorescence unit)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.</i> revolutions per minute)
R-I-Cad	Rhodamin B-isonipecotylcadaverin
R-S-Cad	Rhodamin B-sarcosylcadaverin
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (<i>engl.</i> standard deviation)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels (<i>engl.</i> standard error of the means)
TFA	Trifluoressigsäure
TGase	Transglutaminase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettstrahlung (Wellenlänge \leq 380 nm)
v	Produktbildungsgeschwindigkeit
v_0	Produktbildungsgeschwindigkeit des ungehemmten Enzyms
v_{max}	maximale Produktbildungsgeschwindigkeit

Einleitung

1. Struktur und Aktivitäten der humanen Transglutaminase 2

Die Familie der Transglutaminasen (EC 2.3.2.13) umfasst die Transglutaminasen 1-7, den Faktor XIIIa der Blutgerinnungskaskade und das katalytisch inaktive Membranprotein Bande 4.2 in Erythrozyten. Die Mitglieder dieser Enzymfamilie – bis auf das letztgenannte – vereint die Fähigkeit zur katalytischen post-translationalen Modifikation von Glutaminseitenketten in Peptiden und Proteinen durch Acyltransfer (1). Die Bande 4.2 wird aufgrund genetischer Ähnlichkeit zur gleichen Familie gezählt (2). Alle TGasen werden durch Ca^{2+} aktiviert, einige bedürfen proteolytischer Spaltung (3) und drei Vertreter der Familie (TGase 2, 3 und 5) werden durch GTP gehemmt (4–6). Zunächst nur in Säugetieren identifiziert, konnten Transglutaminasen später in allen Reichen des eukaryotischen Lebens sowie in Bakterien nachgewiesen werden. (7–9). Diese Dominanz deutet auf eine fundamentale Bedeutung der Transglutaminasen hin.

Der erste identifizierte Vertreter der Enzymfamilie wird heute Transglutaminase 2 (TGase 2) oder auch Gewebstransglutaminase (*engl.* tissue transglutaminase) genannt und ist die bestuntersuchte der Transglutaminasen. Sie besteht aus 687 Aminosäuren und ist aus einer N-terminalen β -Sandwich-Domäne, einer katalytischen Domäne und zwei C-terminalen β -Fass-Domänen zusammengesetzt (Abb. 1).



Abb. 1 Schematische Darstellung der humanen TGase 2 (modifiziert nach (10))

Einzigartig unter den Transglutaminasen ist die Multifunktionalität der TGase 2, welche sich aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Funktionalitäten zusammensetzt. Diese verschiedenen Funktionen sind mit den vier Domänen assoziiert. Die N-terminale β -Sandwich-Domäne wird mit Zelladhäsion und Migration in Verbindung gebracht; die katalytische Domäne beherbergt die für die Transamidasefunktion wichtigen Aminosäuren

sowie die regulatorischen Calciumionenbindungsstellen. Die beiden C-terminalen β -Fass-Domänen enthalten hingegen die für die Bindung und Hydrolyse von ATP und GTP wichtigen Aminosäuren und sind somit für die Signalweiterleitungsfunktion der TGase 2 essenziell.

Die Zelladhäsion-vermittelnde Funktion von TGase 2 wird durch die Interaktion mit Oberflächenproteinen auf der Zellmembran ausgeübt. So interagiert TGase 2 mit Fibronectin (11) und Integrinen (12) in Form einer Protein-Protein-Wechselwirkung und fördert auf diese Weise deren Bindung zueinander, die ohne Beteiligung der TGase 2 nur eine relativ geringe Bindungsaffinität aufwies (13, 14). Über dieses Zusammenspiel übt TGase 2 einen Einfluss auf Zelladhäsion und -migration aus. Dieses wird zudem durch eine Interaktion von TGase 2 mit dem Heparansulfat-Proteoglykan Syndekan-4 unterstützt, das ebenfalls Adhäsion-vermittelnd wirkt (15).

Die ausgiebig studierten Acyltransferasereaktion sowie die Proteinquervernetzung (*engl.* protein cross-linking) (6, 16, 17) werden von der in der katalytischen Domäne lokalisierten katalytischen Triade aus Cys277, His335 und Asp358 ausgeführt. Dabei greift das Cystein zunächst die γ -Glutamylgruppe des Substrates nucleophil an und bildet unter Abspaltung von Ammoniak einen Thioester aus. In einem zweiten Reaktionsschritt wird dieses Intermediat von einem weiteren Nucleophil angegriffen, wodurch das Enzym wieder freigesetzt wird (Abb. 2). Dieser zweite Reaktionsschritt führt in Abhängigkeit des zweiten Nucleophils (Wasser, Alkohol, Biogenes Amin, Lysinrest eines Peptids) zur Hydrolyse, zur Veresterung oder zur Transamidierung durch Ausbildung einer Isopeptidbindung (17–19). Diese Isopeptidbindungen sind biologisch besonders stabil, da sie nicht durch Proteasen gespalten werden (1, 20). Durch Proteinquervernetzung interagiert TGase 2 mit dem Transkriptionsfaktor NF κ B (nukleärer Faktor aktivierter B-Zellen) und dem Wachstumsfaktor TGF- β 1 (Transformierender Wachstumsfaktor β 1, *engl.* transforming growth factor β 1) und führt zu deren Aktivierung, welche wiederum proliferationsfördernd wirken (21, 22). Dabei erfolgt eine indirekte Aktivierung durch die Quervernetzung und einer damit einhergehenden Inaktivierung des auf NF κ B hemmend wirkenden I κ B (Inhibitor des nukleären Faktors aktivierter B-Zellen) und das latente TGF- β -bindende Protein-1 (LTBP-1, *engl.* latent TGF- β binding protein-1).

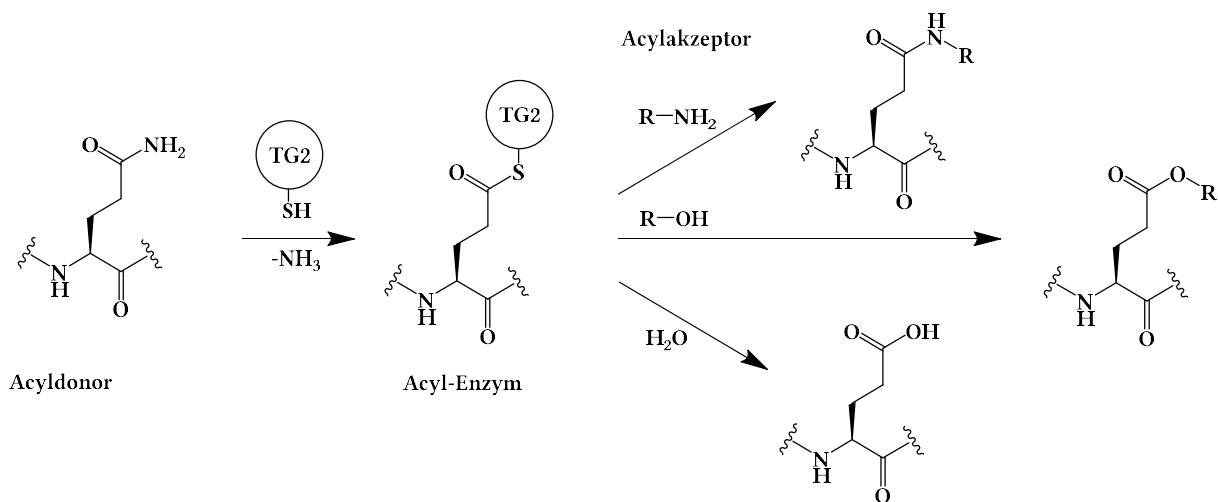


Abb. 2 Reaktionsmechanismus der Acyltransferasereaktion der TGase 2 (modifiziert nach (23))

Die Bindung und Hydrolyse von ATP und insbesondere von GTP (24–26) ermöglichen der TGase 2 die Funktion eines G-Proteins einzunehmen und mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) zu interagieren. Zu diesen GPCR, mit denen TGase 2 wechselwirkt gehören α_1 -Adrenorezeptoren (27, 28), Thromboxan-A₂-Rezeptoren (29) und Oxytocinrezeptoren (30). Alle drei beschriebenen Wege führen zu einer Aktivierung der Phospholipase C und einer daraus resultierenden Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositoltrisphosphat und Diacylglycerol, die beide als sekundäre Botenstoffe (*engl.* second messenger) fungieren.

Darüber hinaus wurden eine Disulfidisomerase- (31) sowie eine Kinasefunktion (32, 33) der TGase 2 beschrieben. Beide Aktivitäten sind bisher wenig erforscht und konnten bisher auch keiner Enzymdomäne zugeordnet werden (10, 34).

Während das Vorkommen anderer Transglutaminasen auf einzelne Organe oder Gewebe beschränkt ist, i.e. die TGasen 1 und 3 in der Haut (35, 36) und TGase 6 in Neuronen (37), wird die TGase 2 in jeder menschlichen Körperzelle exprimiert (1, 38). TGase 2 ist darüber hinaus mit Ausnahme des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates in jedem Kompartiment der Zelle sowie auf der Zelloberfläche und in der extrazellulären Matrix (*engl.* extracellular matrix, ECM) lokalisiert (1, 38). Die überwiegend ausgeübte Funktion der TGase 2 hängt dabei stark von der jeweiligen Lokalisation ab (39).

Je nach Zelltyp beträgt der Anteil der TGase 2 in der ECM ca. 1-20% der zellulären TGase 2 (40). Extrazelluläre TGase 2 ist durch die Ausbildung von Cystinbrücken im oxidativen extrazellulären Milieu trotz einer höheren Calciumionenkonzentration in der Interstitialflüssigkeit katalytisch normalerweise inaktiv und wirkt Adhäsion-vermittelnd. Erst im Zuge von Gewebsverletzung und Wundheilung wird sie durch die Reduktion der oberflächlichen Cysteine Cys230, Cys370 und Cys371 durch Thioredoxin aktiviert (41–43). Bei der cytosolischen TGase 2, die etwa 80 % der zellulären TGase 2 ausmacht, steht die enzymatische Funktion der Transamidierung im Vordergrund. (17). Sie liegt dabei jedoch insbesondere aufgrund niedriger Calciumkonzentrationen von 100-200 nM (20) in geschlossener Konformation vor (44) und wird erst durch Calciumioneneinstrom im Zuge von Gewebsschäden (41) oder Apoptose aktiviert (45). Eine physiologische Rolle spielen cytosolische Transamidierung und Proteinquervernetzung im Verlauf und Regulation der Apoptose (siehe Kapitel I.2) (46, 47)

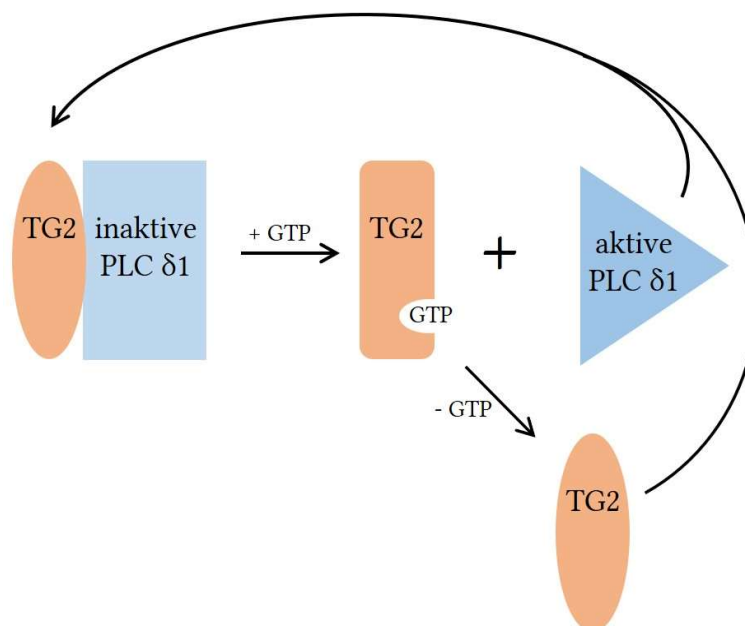


Abb. 3 Schematische Darstellung der Aktivierung von Phospholipase C δ1 nach Bindung von GTP an TGase 2 (modifiziert nach (48))

Darüber hinaus wurde postuliert, dass TGase 2 inhibitorisch an die Phospholipase C δ1 gebunden ist, sich durch Bindung von GTP jedoch von dieser Interaktion löst (48). Die so aktivierte Phospholipase C δ1 führt sodann zu einem Calciumioneneinstrom in das Cytosol (44) (Abb. 3). Die Transamidase- und die GTP-Bindungsfunktion schließen sich dabei strukturell gegenseitig aus, wie Untersuchungen mit irreversiblen Hemmstoffen zeigen konnten (49, 50).

Im Nucleus vorkommende TGase 2 repräsentiert etwa 5-7% der zellulären TGase 2 und interagiert mit den Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren NF κ B und TGF- β 1 und ist damit an der Kontrolle von Zellwachstum, -überleben und -differenzierung beteiligt (43, 51). Darüber hinaus konnten auch enzymatische Aktivitäten der TGase 2 im Nucleus nachgewiesen werden. So wurden eine Proteinquervernetzung mit der Einleitung der Apoptose und eine Kinaseaktivität mit Transkriptionsregulation in Verbindung gebracht (33, 52). Der Einfluss auf Zelladhäsion, -migration und -proliferation, der von TGase 2 in ECM und Nucleus ausgeübt wird, lässt sie zu einem der wichtigsten Faktoren bei der epithelialen Wundheilung werden (53).

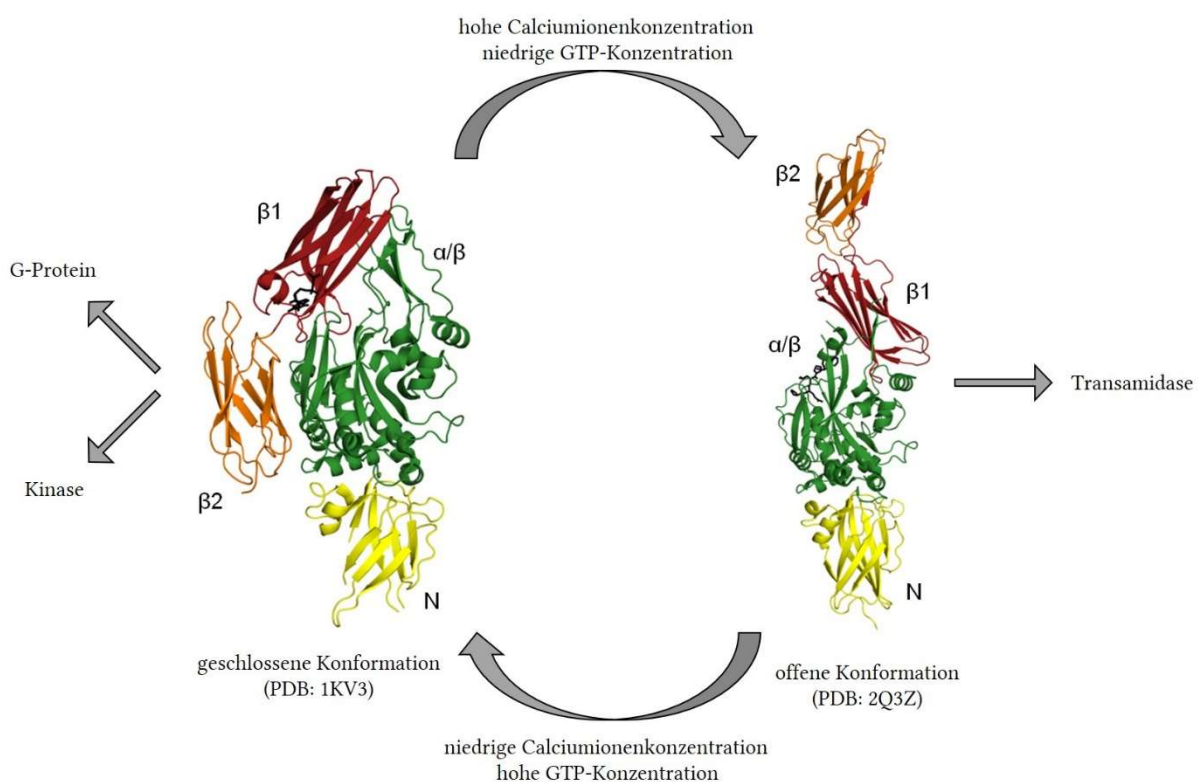


Abb. 4 Schematische Darstellung der geschlossenen (links) und offenen (rechts) Konformationen der TGase 2 und ihrer Regulation durch Calciumionen und GTP (modifiziert nach (18) und (54))

Die verschiedenen Aktivitäten der TGase 2 sind jeweils mit verschiedenen Konformationen des Enzyms assoziiert, die ihrerseits entsprechend durch unterschiedliche Faktoren reguliert werden (44, 54–56) (Abb.4). Die Bindung von GTP, die GTPase-Aktivität sowie die damit verbundene Signaltransduktion werden in einer sphärischen, oder geschlossenen, Konformation ausgeübt (23, 44). Diese wird durch GTP-Bindung stabilisiert und durch niedrige Calciumkonzentrationen ermöglicht. Dabei dienen Magnesiumionen als Cofaktor für die GTP-Hydrolyse (27). Daher konnte eine GTP-Bindung auch für Transamidase-

defiziente TGase 2 beschrieben werden (28). Die Funktion einer Proteinkinase wird ebenfalls in der geschlossenen Konformation entfaltet, was durch eine Abnahme der Kinaseaktivität bei steigender Calciumkonzentration belegt werden konnte (32). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von Magnesium-ATP die Kinaseaktivität begünstigt (44). Die Funktion als Proteindisulfidisomerase (PDI) wird weder durch die Calciumionenkonzentration noch durch GTP-Bindung beeinflusst. Mit welcher Konformation diese Aktivität assoziiert ist, ist bislang unbekannt. Der Mechanismus der PDI-Aktivität ist ebenfalls bisher nicht bekannt, jedoch bleibt sie auch bei Alkylierung der Cysteine der TGase 2 erhalten (57). Die zweifelsfreie Zuordnung der Kinase- und der PDI-Funktion zu TGase 2 ist in der Fachwelt weiterhin umstritten (54).

Die gut untersuchte Transamidasefunktion der TGase 2 wird dagegen durch eine langgestreckte, oder offene, Konformation ausgeübt (23). Diese offene Konformation wird durch eine hohe Calciumionenkonzentration erreicht und durch eine geringe GTP-Konzentration begünstigt. Für TGase 2 sind sechs Bindungsstellen für Ca^{2+} beschrieben worden, die innerhalb der katalytischen Domäne lokalisiert sind (56, 58).

2. Physiologie und Pathophysiologie der humanen Transglutaminase 2

Welche Rolle TGase 2 in der Physiologie des Menschen einnimmt, ist aufgrund ihrer Multifunktionalität schwer zu bestimmen (59). Zu den gesicherten Bereichen, in denen TGase 2 einen Beitrag liefert, zählt die Wundheilung, in der TGase 2 an den drei Stadien der Inflammation, Bildung und Stabilisierung von Gewebe, und Geweberemodellierung beteiligt ist (53). Zur Inflammation trägt die Aktivierung von TGF- β (siehe Kapitel I.1) bei, während die anderen Stadien durch Zelladhäsion, -migration und -stabilisation positiv beeinflusst werden (vermittelt durch Wechselwirkung von TGase 2 mit Fibronectin, Integrinen und Syndecan-4, siehe Kapitel I.1) (10). Schließlich trägt TGase 2 durch ihre Transamidaseaktivität zur Reorganisation der ECM bei (60). TGase 2 ist ebenso an der Einleitung und Regulation der Apoptose beteiligt. So induziert TGase 2 den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF), der durch die Kondensation von Chromatin die Apoptose einleitet (61). TGase 2 stabilisiert im weiteren Verlauf darüber hinaus die Zelle durch Proteinquervernetzung und verhindert durch Stabilisierung der umgebenden ECM eine Entzündungsreaktion (62).

Eine unregulierte Aktivität der TGase 2 wird mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dabei stehen die beiden wesentlichen Funktionen der TGase, die Transamidase- und die GTP-Bindungsfunktion, im Fokus.

2.1. TGase 2 und Zöliakie

Am besten bekannt ist der Einfluss der TGase 2 auf die Ausbildung der Glutenunverträglichkeit, auch Zöliakie genannt. Sie präsentiert sich als Erkrankung, die Merkmale einer Allergie und einer Autoimmunerkrankung aufweist. Das mit der Nahrung aufgenommene Gliadin, ein Bestandteil des Glutens, wird dabei durch die TGase 2 deamidiert, woraufhin dieses als Antigen erkannt und eine Immunantwort in Form einer Rekrutierung von T-Lymphozyten ausgelöst wird (63–65). Darüber hinaus bilden sich IgA- und IgG-Autoantikörper, die gegen Cross-links aus TGase 2 und Gliadin gerichtet sind (66, 67). Die resultierende Inflammation begünstigt eine weitere Sekretion von TGase 2 und führt so zur Manifestation der Zöliakie (68). So bildet sich eine chronische Entzündung aus, die zu einer Malabsorption von Nährstoffen und oral verabreichten Medikamenten führt. Die Prävalenz der Zöliakie liegt bei etwa 1:300, wobei nur etwa 10% der Erkrankten eine

umfängliche Manifestation zeigen während 80-90% der Erkrankten keine oder nur untypische Symptome aufweisen (69). Die Diagnose der Zöliakie erfolgt weitestgehend durch einen serologischen Antikörpernachweis. Dabei können Antikörper gegen deamidiertes Gliadin und gegen im Endomysium lokalisierte interstitielle TGase 2 nachgewiesen werden. Mit einer Sensitivität und einer Spezifität von jeweils mehr als 90% eignen sich immunologische TGase 2-Bestimmungen am besten zur nichtinvasiven Diagnostik (70). Therapiert wird die Zöliakie bisher durch eine strikt glutenfreie Ernährung (71). In einem zielgerichteteren Ansatz wird die Wirkung von TGase 2-Hemmstoffen als adjuvante Therapieoption untersucht (72). Derzeit befindet sich mit ZED1227 (**1**) (Abb. 5) ein irreversibler Hemmstoff der TGase 2 in einer klinischen Phase-2-Studie (73).

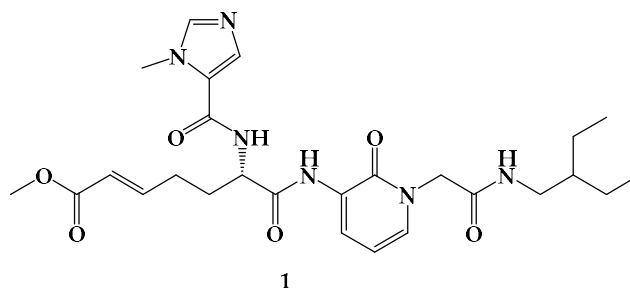


Abb. 5 Struktur des reversiblen TGase 2-Hemmstoffs ZED1227, derzeit befindlich in einer klinischen Phase-2-Studie zur Zöliakie

2.2. TGase 2 und Katarakt

Die Bedeutung der TGase 2 für die Ausbildung eines Katarakts ist bereits seit 1981 bekannt. Laszlo Lorand und Kollegen beschrieben die Polymerisierung von β -Kristallin als Ursache einer Linsentrübung (74). Dieser Befund wurde dadurch erweitert, dass auch ein Cross-linking von α -Kristallin demonstriert werden konnte (75). Eine TGase 2-Hemmung durch Spermidin reduzierte dabei die Linsentrübung in einem *in vitro*-Modell, was mit einer Sättigung der TGase 2 durch dieses bevorzugte Substrat erklärt wurde (62). Darüber hinaus konnte eine Abschwächung der Linsentrübung durch Cystamin erreicht werden, was TGase 2 auch im Bereich des Katarakts zu einem therapeutischen Target macht (76).

2.3. TGase 2 und Fibrosen

Einen ursächlichen Einfluss zeigt TGase 2 auch im Bereich der Fibrosen. Dabei steht die idiopathische Lungenfibrose (IPF) im Fokus, die eine jährliche Inzidenz von 5-7:100000 aufweist und mit einer mittleren 5-Jahres-Überlebensrate von 20-40% eine mitunter schlechtere Prognose als einige maligne Tumorerkrankungen aufweist (77). Die IPF ist durch eine Entzündung der Alveolen gekennzeichnet, die zu einer Vermehrung des dazwischenliegenden Bindegewebes führt. Dadurch versteift sich die Lunge, es wird mehr Kraft zur Dehnung der Lungen und für das Atmen benötigt, und der Gasaustausch ist aufgrund der verringerten Diffusionsfläche reduziert (77). Die Rolle der TGase 2 bei der Entstehung der IPF beruht auf mehreren Faktoren. So ist TGase 2 in Lungen von IPF-Patienten überexprimiert und führt dort zu einem intensiveren Cross-linking von ECM-Proteinen. Darüber hinaus führt die Anwesenheit von TGF- β im Zuge der Inflammation zu einer weiteren Steigerung und erhöhten Aktivität der TGase 2, d.h. es liegt ein sich selbst verstärkender Mechanismus vor (78). Therapiert wird die IPF standardmäßig mit Immunsuppressiva, wie inhalativen Glucocorticoiden, oralem Azathioprin und Pirfenidon. Eine Verlangsamung der Progression durch Gabe von TGase 2-Inhibitoren wird untersucht; es befindet sich jedoch noch kein Vertreter in einer klinischen Studie (79).

Neben der IPF hat TGase 2 auch einen Einfluss auf fibrotische Veränderungen im Zuge einer diabetischen Nephropathie. Dabei steht die diabetische Mikroangiopathie als Auslöser für Entzündungen der Glomeruli im Zentrum. In Folge dieser Entzündungen wird verstärkt TGF- β sezerniert, das wiederum eine erhöhte Expression von TGase 2 bedingt und mit fibrotischen Veränderungen der Glomeruli einhergeht (80, 81). Durch den experimentellen Wirkstoff NTU281 (2, Abb. 6), einem irreversiblen Hemmstoff der TGase 2, konnte die Entstehung von Fibrosen vermindert und eine Funktionserhaltung der Glomeruli ermöglicht werden (82). Auch die Symptome einer schon ausgebildeten diabetischen Nephropathie wurden durch NTU281 verbessert (83).

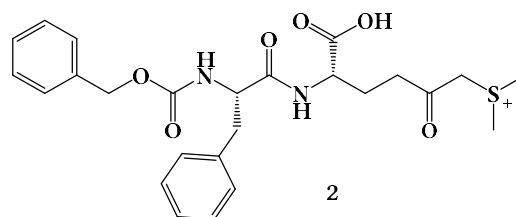


Abb. 6 Der irreversible TGase 2-Hemmstoff NTU281, experimenteller antifibrotischer Wirkstoff

2.4. TGase 2 und neurodegenerative Erkrankungen

Wie auch in anderen Bereichen des menschlichen Körpers findet sich TGase 2 fast ubiquitär im Gehirn wieder. Dabei wird sie in Neuronen, Astrocyten sowie in Mikrogliazellen exprimiert und lässt sich cytosolisch, membrangebunden, extrazellulär sezerniert und im Nucleus nachweisen (84, 85). Es gibt vermehrt Hinweise auf eine Beteiligung der TGase 2 an der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung. So wurden in Gehirnen von Alzheimer-Patienten *post mortem* sowohl eine erhöhte Expression als auch eine erhöhte Aktivität der TGase 2 beobachtet (86). Direkte Nachweise gibt es auch für durch TGase 2 gebildete Isopeptide in der Cerebrospinalflüssigkeit (87) sowie für die Korrelation dieser Isopeptide mit kognitiven Einschränkungen (88). Im Vordergrund steht hier die Beteiligung von TGase 2 an der Bildung von löslichen Amyloid- β -Oligomeren, die als neurotoxischste Spezies angesehen werden, sowie von helikalen Tau-Filamenten (89, 90). Ein weiterer Einfluss von TGase 2 auf die Alzheimer-Krankheit ist die Aktivierung von NF κ B und eine daraus resultierende Neuroinflammation. Diese führt, wie auch bei fibrotischen Veränderungen, zu einem selbstverstärkenden Mechanismus (85). Studien, die die Hemmung von TGase 2 im Tiermodell des Morbus Alzheimer untersuchen sind derzeit noch nicht verfügbar; Wilhelmus *et al.* halten sie aber aufgrund von Studien in Krankheitsmodellen der Chorea Huntington und des Morbus Parkinson für machbar (84).

Chorea Huntington, auch die Huntington-Krankheit genannt, ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die zu einer fortschreitenden Neurodegeneration in Neostriatum und Neocortex führt (91). Als Trinucleotid-Repeat-Erkrankung ist sie durch eine Veränderung im krankheitsauslösenden Protein Huntingtin gekennzeichnet, in dem sich die für Glutamin codierende Nukleotidsequenz CAG übermäßig oft wiederholt. So wiederholt sich das genannte Basentriplett im Normalfall bis zu 20-mal, tritt im Krankheitsfall aber mindestens 35-mal auf. Ab einer Zahl von 39-41 Wiederholungen ist eine vollständige Penetranz gegeben (91, 92). Die Erkrankung ist durch Ablagerungen aus Aggregaten des mutierten Huntingtins gekennzeichnet, die zu mitochondrial-oxidativem Stress und somit zum Zelluntergang führen (93). Es konnte gezeigt werden, dass die Transamidaseaktivität der TGase 2 in Gehirnen von Huntington-Patienten signifikant gegenüber der von Kontrollpatienten erhöht ist (94) und dass Huntingtin ein Substrat der TGase 2 ist (90). Während *in vitro*-Experimente zeigen, dass die Transglutaminaseaktivität das Erscheinungsbild der Huntington-Krankheit imitiert (95), führt die Hemmung von TGase 2 im Tiermodell zu einer verminderten

Proteinaggregation (96), zu einer gesteigerten Bewegungsfunktion sowie einer reduzierten Mortalität (94, 97).

Der Morbus Parkinson, auch die Parkinson-Krankheit genannt, ist eine neurodegenerative Erkrankung des extrapyramidal-motorischen Systems, die durch den Untergang dopaminergischer Neuronen gekennzeichnet ist (98). Auf molekularer Ebene wird die Erkrankung mit Aggregaten von α -Synuclein in Verbindung gebracht, welches als Substrat der TGase 2 identifiziert wurde (90, 99). Ebenso wurde eine Überexpression von TGase 2 in Gehirnen von Parkinson-Patienten gefunden (100). Die Hemmung der TGase 2 in biochemischen Assays, in Zellkultur und im Tiermodell führte dabei zu einer Reduktion der α -Synuclein-Aggregation (101–103).

Somit ist die Hemmung der TGase 2 auch in Bezug auf die Huntington- und die Parkinson-Krankheit ein vielversprechender therapeutischer Ansatz (91, 104).

2.5. TGase 2 und Krebs

Einen signifikanten Einfluss zeigt TGase 2 auch in der Tumorbilogie (105). Dabei wird die Rolle des Enzyms jedoch kontrovers diskutiert, das sowohl als Tumorsuppressor (106) als auch als Tumorpromotor fungiert (107, 108). Im Zentrum dieser Diskussion steht der Dichroismus aus elongierter, Transamidase-aktiver und sphärischer, Transamidase-inaktiver Konformation, der einer Generalisierung der Wirkweise von TGase 2 im Krebsgeschehen entgegenspricht (54, 109). Während eine erhöhte Transamidaseaktivität im peritumoralen Gewebe auftritt, die als „protektive Antwort“ gegen das Tumorstadium gedeutet wird (110), ist der Einfluss der TGase 2 als tumorbegünstigender Faktor Mittelpunkt der meisten Untersuchungen. Ein grundlegender Zusammenhang wird dabei zwischen oxidativem Stress, Inflammation und der Tumorgenese gesehen (111, 112). Ein solcher selbstverstärkender Mechanismus wurde bereits für die fibrotischen Veränderungen beschrieben und gründet sich auf einer verstärkten Expression und Signalling-Wirkung der geschlossenen Konformation (109). Eine erhöhte TGase 2-Aktivität und -Expression wird dabei mehrheitlich mit einem verbesserten Tumorüberleben, einer gesteigerten Malignizität, einer erhöhten Metastasierungsneigung sowie einer verstärkten Resistenz gegen klassische Chemotherapeutika in Verbindung gebracht (113–115). So beschreiben Kang *et al.* beispielsweise eine Depletion des wohl bekanntesten Tumorsuppressors p53 infolge eines

TGase 2-katalysierten Cross-linkings in Nierenzellkarzinomen (116). Antonyak *et al.* konstatieren dagegen, dass explizit die GTP-Bindungsfunktion von TGase 2 Apoptose-unterdrückend wirkt und nicht die Transamidaseaktivität (117) während Budillon *et al.* beiden Funktionen Anteil dabei einräumen (114). Auch die Ausbildung des Warburg-Effekts scheint durch TGase 2-Überexpression begünstigt zu sein (118, 119). Ein besonderes Interesse erfahren in diesem Zusammenhang die Krebsstammzellen (*engl.* cancer stem cells, CSC), die eine kleine Zellsubpopulation im Tumorgewebe darstellen und sich durch langfristige Teilbarkeit, Selbsterneuerung und Chemoresistenz auszeichnen (120, 121). Dadurch werden sie für Metastasierungen und Tumorrezidive verantwortlich gemacht. Eine verbesserte Adhäsion wird auf eine nichtenzymatische Interaktion von TGase 2 mit Fibronectin zurückgeführt, die ebenfalls die Bildung von Metastasen begünstigt. (12) Die CSC erreichen diese Fähigkeiten durch den Verlust von Zell-Zellkontakten (tight junctions etc.), durch eine Reorganisation des Cytoskeletts infolge gesteigerter katalytischer TGase 2-Aktivität sowie durch eine erhöhte Neigung zu epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) (122–125).

Ein besonderer Einfluss wird der TGase 2 bei der Ausbildung einer Resistenz von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika zugeschrieben. Diese Resistenz basiert im Wesentlichen auf fünf Ansätzen (114). Der am besten erforschte Ansatz ist hierbei die Aktivierung von Signalwegen (*engl.* survival pathways), insbesondere des NFκB-Signalweges, die das Überleben der Tumorzellen sichern. So konnte nachgewiesen werden, dass der Inhibitor des Transkriptionsfaktors NFκB, IκB, durch TGase 2-katalysiertes Cross-linking inaktiviert wird und dadurch eine konstitutive Aktivierung von NFκB herbeiführt wird (58, 126, 127). Weiterhing kann TGase 2 NFκB-Dimere direkt binden und somit ihre Affinität gegenüber IκB reduzieren sowie die NFκB-Signalweiterleitung induzieren (128). Darüber hinaus steht die Hemmung von physiologisch und pharmakologisch induzierter Apoptose im Fokus der Forschung (114, 129). Die bereits beschriebene Neigung von Tumorzellen eine EMT zu unterlaufen ist ein weiterer resistenzbegünstigender Faktor. Tumorzellen nach EMT sind den CSC ähnlicher und somit unempfindlicher für Apoptoseauslöser (122, 123). Survival pathways werden ebenso durch Integrin-vermittelte Interaktionen aktiviert. Diese werden durch TGase 2-bedingte Veränderungen der ECM begünstigt und wirken somit resistenzbegünstigend (130, 131). Daneben konnte gezeigt werden, dass TGase 2 bei der Regulierung der Autophagie von Tumorzellen beteiligt ist. Diese bezeichnet einen Prozess, der es Zellen erlaubt als Mechanismus der Stresstoleranz eigene Bestandteile zu konsumieren. Dadurch begeben sich diese Zellen in einen Zustand der Tumorruhe (*engl.* tumor dormancy),

wodurch sie unangreifbar gegenüber klassischen Chemotherapeutika werden, die die hohe Teilungsrates von entarteten Zellen beeinflussen (132). Diese tumor dormancy kann sowohl zu einem langsamen Untergang der Zellen als auch zu einer späteren Reaktivierung und somit zu einem Tumorrezidiv führen. Des Weiteren konnte in einer Studie gezeigt werden, dass durch die Gabe des Zytostatikums Doxorubicin Wasserstoffperoxid in den betreffenden Zellen produziert wird, welches seinerseits die (Über-)Expression von TGase 2 und die daraus resultierenden Resistenzmechanismen begünstigt (133). Dieser Fund lässt sich mit der Hypothese in Einklang bringen, dass oxidativer Stress TGase 2-induzierend wirkt (111). Die therapeutische Signifikanz erhöhter TGase 2-Expression stellte die Arbeitsgruppe von Kapil Mehta in zwei Studien zu unterschiedlichen Tumorarten heraus. So konnte anhand von Proben aus 30 Melanompatienten gezeigt werden, dass sich die Höhe der TGase 2-Expression mit einem invasiven und metastasierenden Phänotyp in Korrelation bringen lässt. Dabei war die TGase 2-Expression in den Metastasen gegenüber den Primärtumoren deutlich erhöht (134). Zusätzlich lieferte die Arbeitsgruppe einen therapeutischen Ansatz, indem sie in einem orthotopischen Mausmodell für Pankreaskarzinome zeigte, dass die Herunterregulierung der TGase 2-Expression durch siRNA sowohl das Tumorwachstum verlangsamt als auch das therapeutische Ansprechen auf das Zytostatikum Gemcitabin verbessert (135).

3. Hemmstoffe der Transglutaminase 2

Die bedeutende Rolle, die TGase 2 in den unterschiedlichsten Krankheitsgeschehen spielt, verdeutlicht die Notwendigkeit von potenten und selektiven Hemmstoffen. Die bisher entwickelten Hemmstoffe lassen sich vereinfacht in folgende drei Gruppen einteilen: irreversible Hemmstoffe, Inhibitoren, die kompetitiv zum Acyldonorsubstrat wirken und allosterische Inhibitoren (136).

Die bekannteste allosterische Hemmung der TGase 2 ist die physiologische Hemmung durch GDP/GTP. Auf dieser Basis wurden nichthydrolysierbare Analoga wie GTP γ S und GMP-PCP (entspricht der später getesteten Verbindung **91**) als Hemmstoffe der TGase 2 beschrieben (137). In einer späteren Arbeit konstatierten Schaertl und Mitarbeiter, dass im Rahmen ihrer Übersichtsstudie zu bekannten TGase 2-Inhibitoren lediglich die nativen Nukleotide an der GTP-Bindungsstelle aktiv waren (138). Im Jahr 2005 wurde erstmals ein nicht-nukleotidischer, allosterischer Inhibitor von Duval *et al.* beschrieben (139), der später als sogenannter *slow binder* (*engl.* für langsamer Binder) charakterisiert wurde, der nichtkompetitiv zu Acyldonorsubstraten und Acylakzeptorsubstraten wirkt, und dessen Bindung die gleichzeitige Bindung von GTP ausschließt. Dabei wurde jedoch keine direkte Bindung an die GTP-Bindungsstelle beschrieben (140).

Reversible Inhibitoren, die kompetitiv zu Acyldonorsubstraten wirken, wurden verstärkt ab 2008 entwickelt. Als bedeutendste Klasse gilt hierbei jene der *trans*-Cinnamoyl-Derivate (Abb. 7), die aus der Arbeitsgruppe von Jeffrey Keillor stammen (141). Diese Substanzklasse zeichnet sich durch eine relativ gute Wasserlöslichkeit und IC₅₀-Werte im einstelligen bis niedrigen zweistelligen mikromolaren Bereich aus (141, 142).

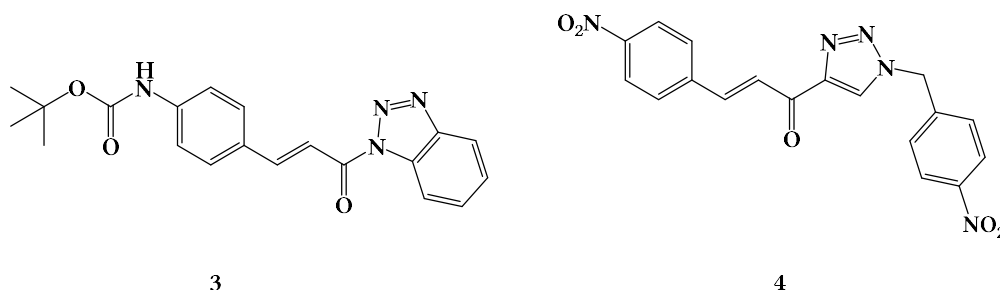


Abb. 7 Die *trans*-Cinnamoyl-Derivate **3** und **4** sind reversible Hemmstoffe der gpTGase 2, IC₅₀ = 18 μ M bzw. 2 μ M

Weiterhin wurde in einer Studie, die bereits zugelassene Wirkstoffe untersuchte, der Inhibitor der Januskinase 3; ZM39923 (5); als TGase 2-Hemmstoff identifiziert (143). Einer ausgeprägten inhibitorischen Potenz steht bei diesem Inhibitor jedoch die fehlende Selektivität entgegen.

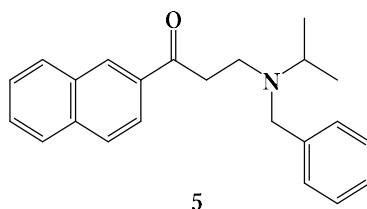


Abb. 8 Der TGase 2-Hemmstoff ZM39923 hemmt reversibel hTGase 2, $IC_{50} = 10 \text{ nM}$

Ausgehend von dem Naturstoff Isatin wurde eine Reihe von reversiblen TGase 2-Hemmstoffen, die sogenannten Acyldenoxindole, synthetisiert, die sich durch IC_{50} -Werte im hohen nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Bereich auszeichnen (144). Jedoch ist auch hier bekannt, dass Isatin-Derivate oft unspezifisch Cysteinproteasen inhibieren (145).

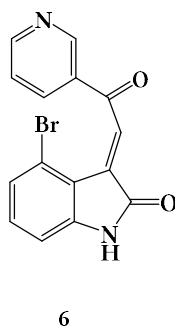


Abb. 9 Acyldenoxindol 6, ein reversibler Hemmstoff der gpTGase 2, $K_i = 0,4 \mu\text{M}$

Die größte Gruppe der TGase 2-Hemmstoffe ist die der irreversiblen Inhibitoren (136, 146). Diese lässt sich wiederum in drei Untergruppen einteilen.

Die älteste dieser Untergruppen bilden die Halomethylcarbonyl-Verbindungen, deren einfachster Vertreter das Iodacetamid (später Verbindung **33**) ist, welches eine Alkylierung des katalytisch aktiven Cys277 bewirkt (147, 148) jedoch unspezifisch verschiedene Cysteinproteasen inhibiert. Für TGase 2 spezifischere Vertreter dieser Klasse wurden in der Arbeitsgruppe von Jeffrey Keillor entwickelt. Diese Vertreter zeichnen sich neben guten Hemmeigenschaften auch durch eine relative Inertheit gegenüber Glutathion als Maß für unspezifische Reaktionen aus (149).

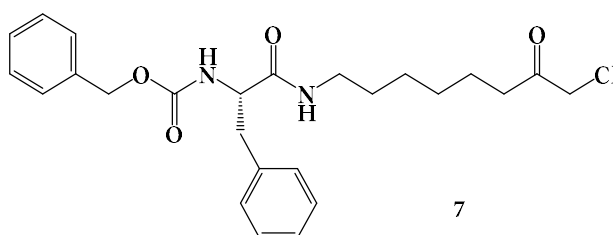


Abb. 10 Chlormethylketon-basierter Inhibitor **7** von Pardin *et al.* $K_i = 6 \mu\text{M}$ an gpTGase 2

Die zweite Untergruppe sind die 3-Halo-4,5-dihydroisoxazol-Verbindungen, die sich strukturell von dem Naturstoff Acivicin ableiten, der Cystein-abhängige Enzyme zu hemmen vermag (150). Die Arbeitsgruppe von Chaitan Khosla synthetisierte verschiedene Derivate des Acivicin und beschrieb einige von ihnen als potente TGase 2-Inhibitoren (151, 152).

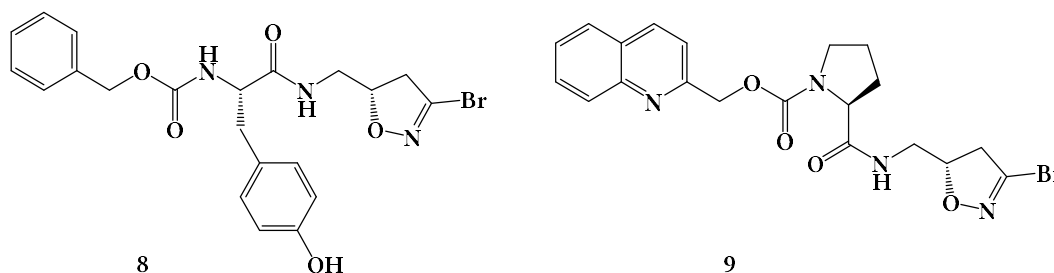


Abb. 11 Struktur der 3-Brom-4,5-dihydroisoxazol-Inhibitoren **8** und **9** von Choi *et al.* und Watts *et al.* $K_i = 420 \mu\text{M}$ bzw. $11 \mu\text{M}$ an hTGase 2

Aufgrund einer relativen Inertheit gegenüber Glutathion und einer guten oralen Bioverfügbarkeit konnte darüber hinaus eine TGase 2-Hemmung *in vivo* beschrieben werden (153).

Die dritte Untergruppe bilden die Michaelakzeptoren, die weithin als Hemmstoffe von Cyseinproteasen verwendet werden (154). Die Vertreter dieser Gruppe zeichnen sich durch eine Affinität zu Nukleophilen aus, welche durch eine Reihe verschiedener elektrophiler Gruppen (*engl.* warheads) vermittelt wird. Der Wirkmechanismus dieser Hemmstoffe basiert stets auf einer Michael-Addition am katalytisch aktiven Cys277.

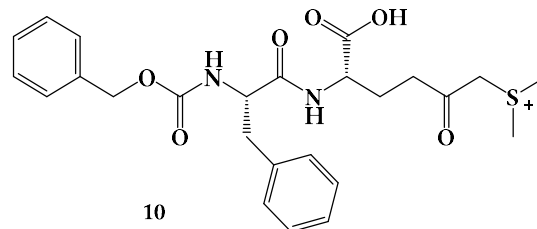


Abb. 12 Struktur des Sulfoniuminhibitors **10** von Griffin *et al.* $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ an hTGase 2

Als erste Vertreter dieser Gruppe wurden Sulfonium-Verbindungen als Hemmstoffe der Cysteinproteasen Calpain und Cathepsin B entwickelt (155), die später von der Arbeitsgruppe Martin Griffins im Hinblick an TGase 2 untersucht und hinsichtlich Wasserlöslichkeit optimiert wurden (156). Diese verbesserte Wasserlöslichkeit ging mit einer geringeren Zellgängigkeit einher und machte diese Verbindungen insbesondere für extrazelluläre Anwendungen interessant.

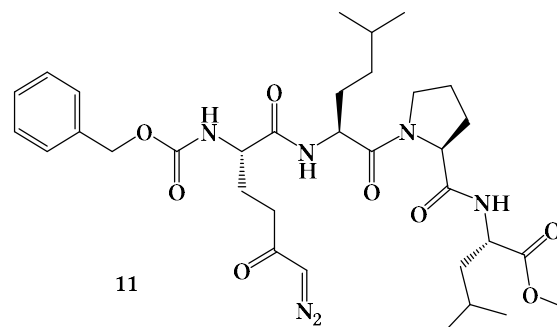


Abb. 13 Struktur des peptidomimetischen TGase-Inhibitors **11** von Oertel *et al.* $IC_{50} = 20 \text{ nM}$ an hTGase 2

Als wichtige Vertreter gelten die peptidomimetischen Verbindungen, die von dem Biotechnologie-Unternehmen Zedira (Darmstadt, Deutschland) entwickelt und als Hemmstoffe der TGase 2 patentiert wurden (157). Die peptidomimetische Struktur des Grundgerüsts sorgt für eine relative Selektivität an TGase 2 gegenüber anderen TGasen mit Selektivitätsfaktoren zwischen acht und 3300. Diese Verbindungen enthalten dabei entweder eine Diazomethylketon-Gruppe oder einen α,β -ungesättigten Ethylester als warhead. Die

Verbindung ZED1277 (Abb. 5) befindet sich derzeit in einer Phase-IIa-Studie zur Behandlung der Zöliakie (73). Zudem gibt es noch Inhibitoren, die eine Acrylamid-Gruppe als Michaelakzeptor enthalten. Vertreter dieser Substanzen wurden u.a. in der Arbeitsgruppe von Jeffrey Keillor (158) sowie bei der CHDI Foundation entwickelt (159–161).

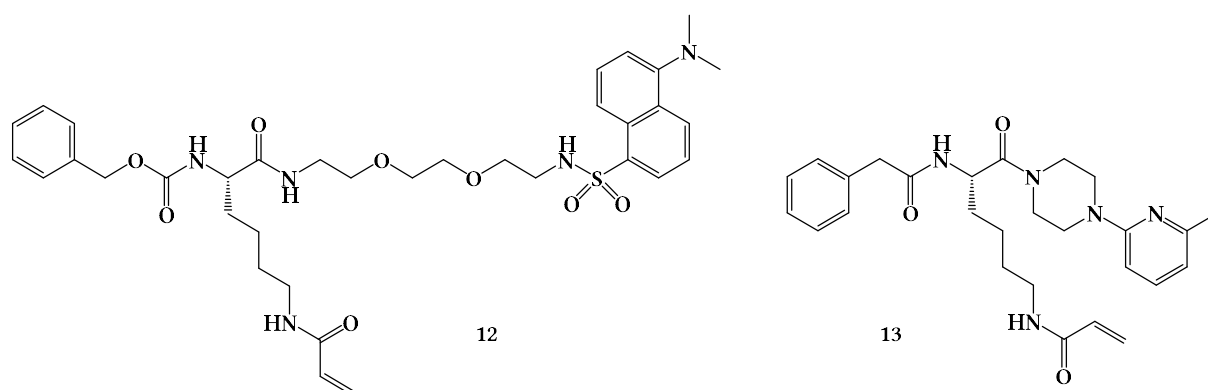


Abb. 14 Struktur der Michaelakzeptoren **12** und **13** von Keillor *et al* und Wityak *et al*.
 $IC_{50} = 29 \mu\text{M}$ bzw. 14 nM an hTGase 2

Gegenüber der Gruppe der 3-Halo-4,5-dihydroisoxazole zeichnen sich die Acrylamide in erster Linie durch eine höhere Potenz aus. Darüber hinaus konnte mit der Verbindung NC9 durch das Hinzufügen einer fluoreszierenden Dansyl-Gruppe ein Hemmstoff entwickelt werden, der auch als Sonde verwendet werden kann. Dagegen fokussierte die Arbeitsgruppe von Michael E. Prime auf Derivatisierungen, die höhere Selektivität an TGase 2 gegenüber anderen TGasen erreichen (Tabelle 1). Eine dieser Verbindungen (**34**) diente als Leitstruktur für die in der dieser Dissertation beschriebenen Studien.

Tabelle 1 Hemmstärke von Verbindung **34** an verschiedenen humanen TGase-Isoformen aus Wityak *et al*. (161)

Enzym	IC_{50} (nM)
TGase 1	15000
TGase 2	14
TGase 3	> 80000
TGase 6	> 80000
FXIIIa	35000

Eine besondere Erwähnung verdient darüber hinaus das organische Disulfid Cystamin. Es reagiert mit den vicinalen Cysteinresten Cys270 und Cys271 unter Ausbildung je einer Disulfidbindung, sowie – in Form seines reduzierten Monomers Cysteamin – mit dem katalytisch aktiven Cys277. Diese Bindungen sind prinzipiell reversibel, führen *in vivo* jedoch zu einer starken Hemmung der TGase 2-Funktion (162). Cystamin wurde vor allem in *in vivo* Modellen der neurodegenerativen Erkrankungen als Proof of Concept zur TGase 2-Hemmung eingesetzt (163). Trotz fehlender Selektivität für TGase 2, gilt Cystamin als relativ ungiftig (164). Darüber hinaus kann eine Cystaminierung von Proteinen zu einer Immunreaktion führen (165). Die Verwendung von Cystamin in Tiermodellen erscheint vor diesem Hintergrund daher fraglich.

4. Grundlagen der Fluoreszenzpolarisation und -anisotropie

Als Fluoreszenzpolarisation wird das im Jahre 1920 erstmals von Fritz Weigert beschriebene Phänomen bezeichnet, dass Fluorophore, die mit linear polarisiertem Licht angeregt werden, ebenfalls linear polarisiertes Licht emittieren. Dabei ist die molekulare Ebene eines Fluorophors im Verhältnis zum Vektor des einstrahlenden Lichtes dafür verantwortlich, ob das Fluorophor überhaupt angeregt wird und in welchem Winkel die Fluoreszenz anschließend emittiert wird (166). Darüber hinaus konnte Weigert zeigen, dass der Grad der emittierten Polarisation von der Molekülgröße des Fluorophors sowie der Viskosität und Temperatur des Mediums abhängen. Weitere Studien demonstrierten, dass der Polarisationsgrad darüber hinaus von der Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors abhängt (167, 168). Diese Ergebnisse lassen sich auf die Eigenrotation des Fluorophors in der Zeit zwischen Anregung und Emission zurückführen (vgl. Abb. 15)

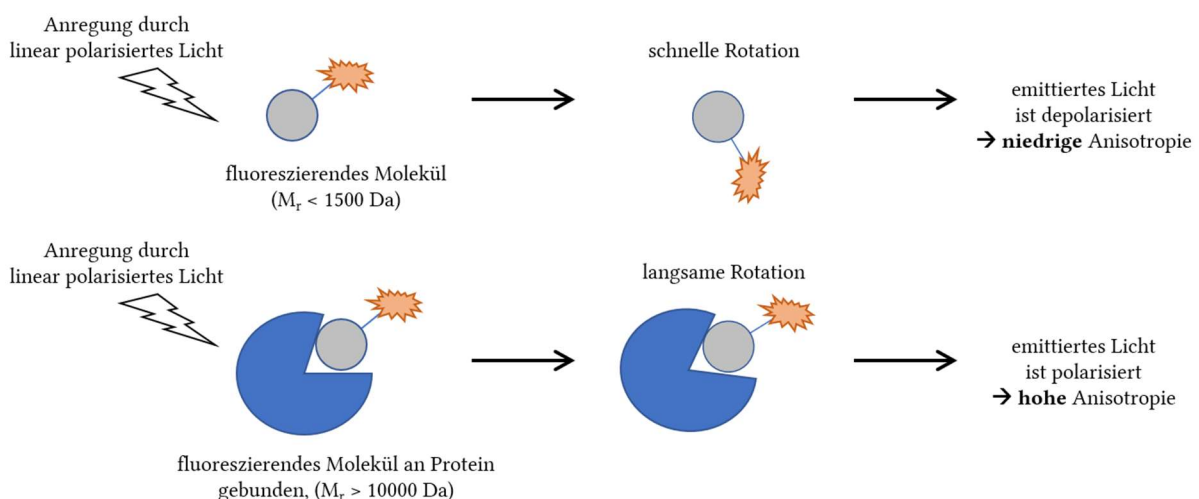


Abb. 15 Prinzip der Fluoreszenzanisotropie (modifiziert nach (169))

Je kürzer die Fluoreszenzlebensdauer ist, desto weniger rotiert das angeregte Fluorophor wodurch die Polarisation weitestgehend erhalten bleibt. Auch die anderen bekannten Einflussfaktoren lassen sich mit der Eigenrotation des Fluorophors erklären. Je größer das Molekül, je größer die Viskosität und je niedriger die Temperatur des Mediums, desto langsamer ist die Eigenrotation und desto stärker bleibt der Polarisationsgrad erhalten. Bei höheren Fluorophorkonzentrationen konnte analog zum Quenching in der Fluoreszenzspektroskopie ein Abfall der Polarisation beobachtet werden, der sich auf einen strahlungsfreien Energietransfer, später als Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) bezeichnet, zwischen angeregten und nichtangeregten Fluorophormolekülen zurückführen

lässt (170). Erstmals als Messverfahren in die Biochemie eingeführt wurde die Fluoreszenzpolarisation im Jahre 1952 von Gregorio Weber (171).

Fluoreszenzpolarisation, P , ist dabei definiert als Funktion der Fluoreszenzintensitäten, die parallel, I_{\parallel} , und perpendicular, I_{\perp} , zum Vektor des anregenden Lichts gemessen werden.

$$P = \frac{I_{\parallel} - G * I_{\perp}}{I_{\parallel} + G * I_{\perp}} \quad (1)$$

Der 1960 von Jablonski (172) eingeführte Begriff der Fluoreszenzanisotropie, A , ist analog wie folgt definiert:

$$A = \frac{I_{\parallel} - G * I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 * G * I_{\perp}} \quad (2)$$

Der Gewichtungsfaktor, G , ist dabei auf gerätespezifische Messfehler zwischen parallel und perpendicular gemessener Fluoreszenz zurückzuführen und wird für jedes Gerät individuell bestimmt (173).

Fluoreszenzpolarisation und -anisotropie liefern in den meisten Fällen identische Informationen und sind somit beide verwendbar. Im Bereich der Biochemie und Biophysik herrscht allerdings die Verwendung der Fluoreszenzanisotropie vor, weshalb diese Methode für die durchgeführten Experimente gewählt wurde.

Die Verwendung der Fluoreszenzanisotropie basiert darauf, dass sich die Molekülgröße der fluoreszierenden Spezies im Verlauf der Messung verändert. Das kann, wie nachfolgend beschrieben, entweder durch kovalente oder nichtkovalente Bindung des (vergleichsweise kleinen) Fluorophormoleküls an ein (wesentlich größeres) nicht-fluoreszierendes Protein oder Peptid geschehen (174).

5. Zielsetzung

TGase 2 wird, wie bereits beschrieben, mit vielfältigen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht und ist somit ein interessantes Zielmolekül für Untersuchungen zur Funktionsweise und Hemmung der TGase-vermittelten Aktivitäten. Zu diesen zählt einerseits die katalytische Transamidaseaktivität und andererseits die GTP-Bindung. Während erstere vornehmlich mit Zöliakie und fibrotischen Veränderungen assoziiert wird, ist letztere wohl maßgeblich an Fortschritt und der Entwicklung von Resistenzmechanismen bei Krebserkrankungen beteiligt.

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines neuen Fluoreszenzanisotropie-basierten Assays zur Quantifizierung der Transamidaseaktivität. Dieser Assay sollte eine Charakterisierung einer Substanzbibliothek von neuen irreversiblen Hemmstoffen ermöglichen, die in der Arbeitsgruppe von Dr. Reik Löser (Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung) maßgeblich von Dr. Robert Wodtke im Zuge seiner Dissertation „Transglutaminase 2 als molekulares Target zur funktionellen Bildgebung von Tumoren – Untersuchungen zu Inhibitoren und fluorogenen Substraten“ entwickelt wurden. Der Assay sollte zunächst mit der Meerschweinchen-Variante der TGase 2, dem gängigsten Modell für die Transamidaseaktivität von TGase 2, etabliert und später auf rekombinante humane TGase 2 übertragen werden.

Zu diesem Zweck sollte ein eukaryotisches Expressionssystem in HEK293-EBNA Zellen sowie ein prokaryotisches Expressionssystem in *Escherichia coli* BL21 (DE3) etabliert werden, die eine Strep-tag-vermittelte, affinitätschromatographische Proteinaufreinigung ermöglichen sollten.

Das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines neuartigen GTP-Bindungs-Assays, der ebenfalls auf einer Veränderung der Fluoreszenzanisotropie basiert. Dafür wurden fluoreszierende Sonden verwendet, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jacek Jemielity (Center of New Technologies, Universität Warschau) entwickelt wurden. Um ein weitergehendes Verständnis für die GTP-Bindung an TGase 2 zu entwickeln, sollte eine Substanzbibliothek von GDP- und GTP-Analoga aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jacek Jemielity als Hemmstoffe der Interaktion zwischen fluoreszenzmarkierter Sonde und TGase 2 an rekombinanter humaner TGase 2 untersucht werden.

Ergebnisse & Diskussion

1. Rekombinante Expression humaner Transglutaminase 2

Humane Transglutaminase 2 ist ein Protein mit einer Länge von 687 Aminosäuren, das nichtpost-translational glykosyliert wird. Es weist eine katalytische Triade bestehend aus den Aminosäuren Cys277, His335 und Asp358, sowie Bindungsstellen für Calciumionen und GTP auf (175). In der Literatur bekannt sind rekombinante Expressionen humaner TGase 2 als Fusionsprotein mit einem His₆-Tag (68, 176, 177) oder mit Glutathion-S-Transferase (GST) in *Escherichia coli* (178–180) sowie mit einem C-terminalen Strep-tag II in HEK293-EBNA Zellen (181).

Zur Aufreinigung rekombinant hergestellter Proteine ist die Verwendung eines Twin-Strep-tags in besonderem Maße geeignet. Dazu wird die hohe Affinität des WSHPQFEK-Motivs des Strep-tags an Strep-Tactin im Zuge einer Affinitätschromatographie genutzt um Proteine in einem einzigen Aufreinigungsschritt in hoher Reinheit zu erhalten (182). Der verwendete Twin-Strep-tag setzt sich aus 2 WSHPQFEK-Motiven zusammen, die durch einen biologisch inerten Linker miteinander verbunden sind, wodurch die Affinität gegenüber der Strep-Tactin-Sepharose deutlich erhöht wird (183). Die Elution unter milden Pufferbedingungen und die biologische Inertheit des kurzen Tags sind weitere Vorteile der Verwendung dieses Verfahrens (182).

Die eukaryotische Expression für aktive hTGase 2 wurde in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) beschrieben, die konstitutiv das Epstein-Barr-Virus-Kernantigen (EBNA) exprimieren (184), wodurch eine semi-stabile Transfektion und ein episomales Vorliegen des Expressionsvektors erreicht wurde. Eine Reproduktion dieses Ansatzes, sie in HEK293-EBNA Zellen zu produzieren, war jedoch nicht erfolgreich. Die hTGase 2 cDNS wurde dazu zunächst erfolgreich in einen pCEP-Pu/BM40SP-NTST-Expressionsvektor kloniert. Dieser Expressionsvektor sollte zur Translation eines Fusionsproteins führen, das aus einem BM40 Signalpeptid, einem Twin-Strep-tag, einer Thrombinschnittstelle und der hTGase 2 besteht. Das Signalpeptid bewirkt eine Sezernierung des exprimierten Proteins, der Twin-Strep-tag erlaubt eine affinitätschromatographische Aufreinigung mittels Strep-

Tactin-Sepharose und die Thrombinschnittstelle kann verwendet werden, um eine Thrombin-induzierte Proteolyse zur Abspaltung des Twin-Strep-tags durchzuführen (181). Nach erfolgter Transfektion, anfänglicher Kultur und anschließender Selektion war die Proliferationsrate der transfizierten Zellen allerdings nie größer als ihre Absterberate, wodurch die Kultur nie soweit vermehrt werden konnte, dass ein nennenswertes Maß an Protein extrahiert werden konnte. Dennoch konnte im Zellüberstand hTGase 2 anhand von Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden (Abb. 16)

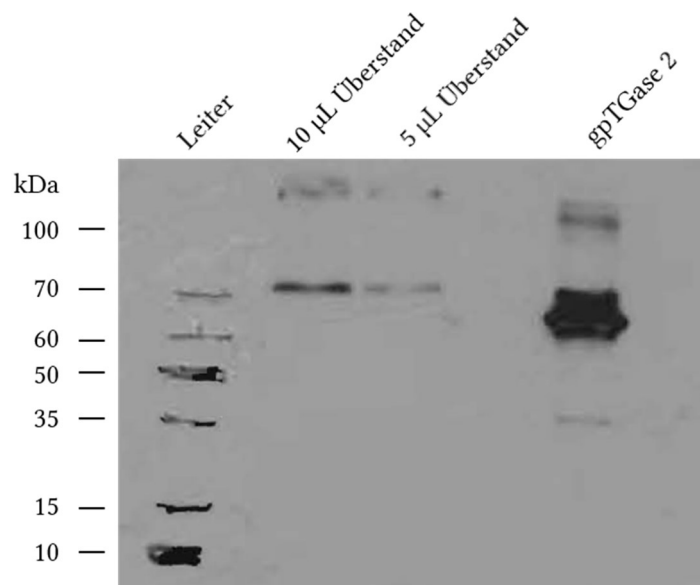


Abb. 16 Western-Blot zur Detektion von hTGase 2 im Überstand der HEK293 EBNA Zellen.

Um größere Mengen rekombinanter hTGase 2 produzieren zu können, wurde daher ein eukaryotisches Expressionssystem in *Escherichia coli* BL21 (DE3)-Zellen etabliert, das den T7-RNA-Polymerase-abhängigen Expressionsvektor pT7-7 verwendet (185). Zur Erzeugung des prokaryotischen Expressionsvektors pT7-7/NTST-hTGase 2 wurde die Sequenz, die für den Twin-Strep-tag, die Thrombinschnittstelle und die hTGase 2 codiert mittels PCR aus dem zuvor erzeugten pCEP-Pu/BM40SP-NTST-hTGase 2 Expressionsvektor kloniert. Das erhaltene Konstrukt wurde mittels Kettenabbruch-Synthese nach Sanger (186) auf Korrektheit überprüft und zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* BL21 (DE3) verwendet.

Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen wurden Testexpressionen für 3 h bei 37 °C, für 5 h bei 30 °C und über Nacht bei 20 °C durchgeführt. Abb. 17 zeigt das Bild eines Gels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) nach Färbung mit Coomassie-Brillantblau G-250

mit Totallysaten von *E. coli* nach den gewählten Inkubationszeiten. Dabei ergaben sich nur minimale Unterschiede von exprimierter hTGase 2, weswegen die weitere Expression zeitsparend mit einer Inkubation für 3 h bei 37 °C durchgeführt wurde.

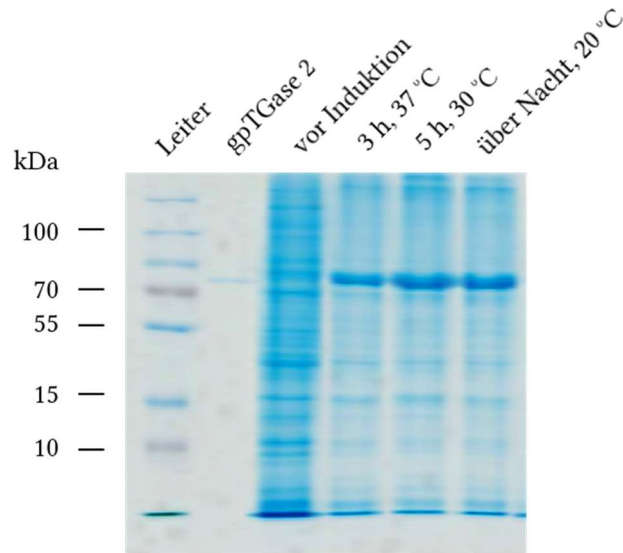


Abb. 17 Coomassiefärbung von Totallysaten von *E. coli* zu den drei gewählten Expressionsbedingungen

Die hTGase 2-exprimierenden *E. coli* wurden durch die Zugabe von Lysozym und einmaliges Einfrieren und Wiederauftauen aufgeschlossen, mit DNase I, PMSF und MgSO₄ behandelt und anschließend zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde schließlich über die ÄKTApurifier und eine Strep-Tactin Superflow Säule affinitätschromatographisch aufgereinigt. Abb. 18 zeigt ein repräsentatives Bild eines SDS-Gels mit Proben der einzelnen Arbeitsschritte.

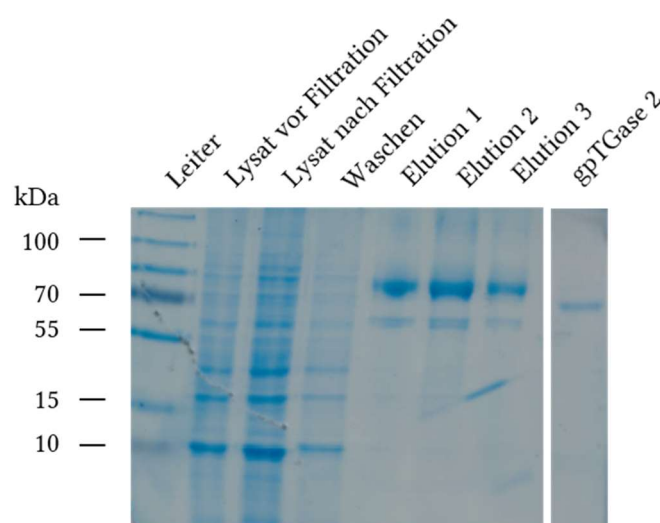


Abb. 18 Coomassiefärbung der einzelnen Arbeitsschritte vom Aufschluss der *E. coli* bis zur Elution

Mit dieser Methode konnte rekombinante hTGase 2 in guter Reinheit und ausreichender Quantität gewonnen werden. Abb. 19 zeigt ein repräsentatives Bild eines mit Coomassie gefärbten SDS-Gels von TGase 2-haltigen Elutionsfraktionen.

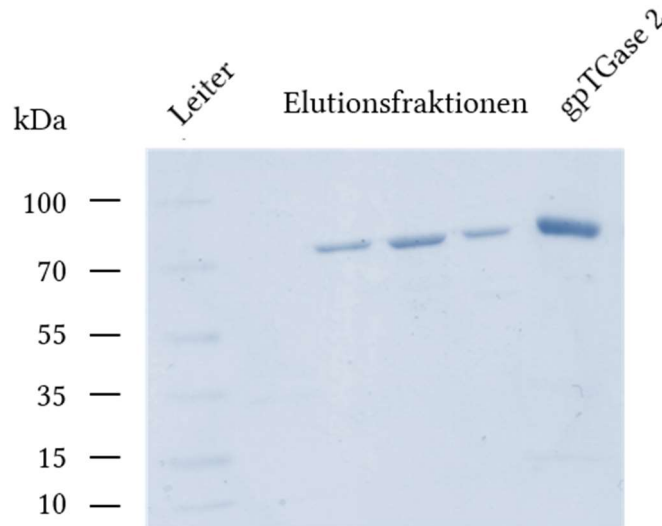


Abb. 19 SDS-PAGE verschiedener Fraktionen nach affinitätschromatographischer Aufreinigung von rekombinanter hTGase 2 aus *E. coli*-Zelllysat. Die Proteinbanden wurden mit Coomassiefärbung sichtbar gemacht.

Zur Feststellung der Proteinidentität wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot durchgeführt. Die Detektion erfolgte zunächst sowohl mit einem Primärantikörper, der direkt gegen TGase 2 gerichtet ist als auch mit einem Antikörper, der den Twin-Strep-tag erkennt. Beide Antikörper lieferten übereinstimmende Ergebnisse, letzterer ließ sich jedoch mit deutlich weniger Hintergrundsignal visualisieren (siehe Abb. 20) und wurde daher in der laufenden Qualitätskontrolle verwendet.

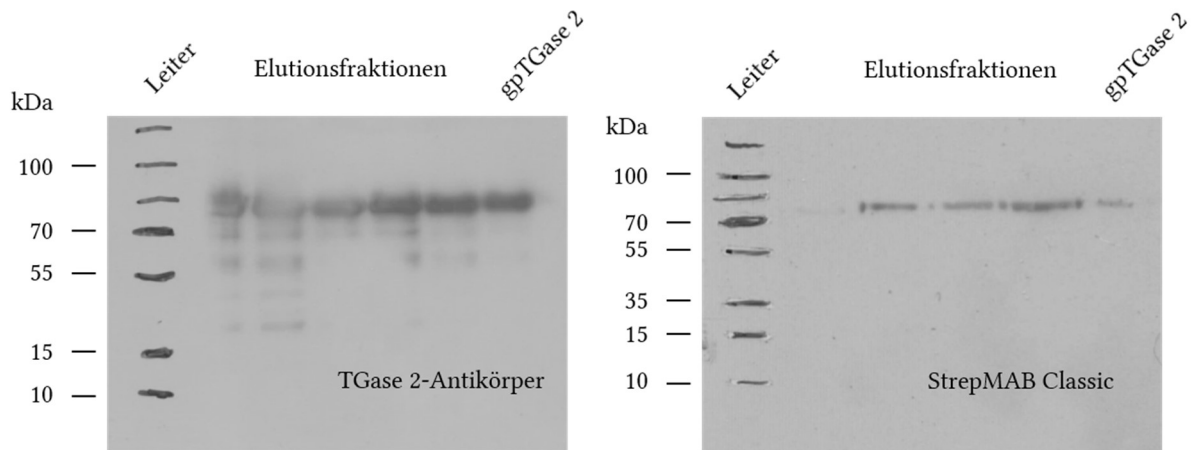


Abb. 20 Western-Blots von Elutionsfraktionen rekombinanter hTGase 2 mit dem direkt gegen TGase 2 gerichteten CUB 7402 (links) und dem gegen den Strep-tag gerichteten StrepMAB Classic

Abb. 21 zeigt ein repräsentatives Bild eines Western-Blots mit Detektion des Twin-Strep-tags von TGase 2-haltigen Elutionsfraktionen.

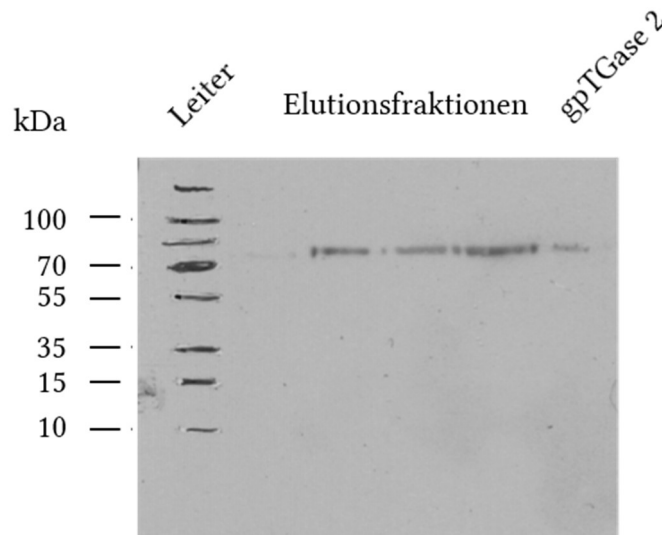


Abb. 21 Western-Blot zu dem in Abb. 19 dargestellten SDS-Gels mit mehreren Elutionsfraktionen nach Aufreinigung von rekombinanter hTGase 2 aus *E. coli*-Zelllysat. Primärantikörper: StrepMAB-Classic

Die anschließende Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte mit der Methode nach Bradford unter Verwendung von BSA als Proteinstandard im Biotek Synergy 2 (187). Die Proteinkonzentrationen der erhaltenen hTGase 2-Chargen ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2 Auflistung der (gepoolten) Enzymchargen rekombinanter hTGase 2, ihrer Proteinkonzentration nach Bradfordassay und des jeweils verwendeten Enzympuffers

Enzymcharge	Proteinkonzentration [mg/mL]	Enzympuffer
1	1,55	EP1
2	1,60	EP2
3	1,25	EP2
4	0,73	EP2
5	0,98	EP2
6	1,58	EP2
7	1,92	EP3
8	2,41	EP3
9	1,41	EP3
10	4,66	EP3
11	1,08	EP3

2. Assays zur Quantifizierung der Transamidaseaktivität von TGase 2

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Assays zur Bestimmung der Aktivität von TGase 2 entwickelt. Die überwiegende Mehrheit dieser Assays weist die Transamidaseaktivität des Enzyms nach, wurde von Pietsch *et al.* akribisch analysiert und in einem systematischen Review dargestellt (18). Einige dieser Methoden wurden zur Identifikation und Charakterisierung von Hemmstoffen verwendet, wobei nur die wenigsten zum Einsatz in Hochdurchsatz-Screening (*engl.* high-throughput screening, HTS)-Verfahren geeignet waren. Die wesentlichen Unterschiede der verschiedenen Assays zeigen sich in den Messverfahren und den zugrundeliegenden molekularen Mechanismen.

Assays, die die Aufnahme von radioaktiv-markierten Verbindungen in Proteine verfolgen (188–190), zeichnen sich in erster Linie durch eine hohe Sensitivität des Signals aus. Dabei kommen [^{14}C]Monodansylcadaverin sowie [^{14}C]- und [^3H]Putrescin zum Einsatz, die TGase 2-katalysiert in verschiedene Formen von Casein eingebaut werden. Die Auswertung erfolgte hier über Präzipitation und anschließende kolorimetrische Bestimmung der Proteinmenge. Die hohe Sensitivität wird durch die Ausbildung einer irreversiblen Bindung zwischen den Substraten als auch durch die Verwendung von kleinsten Mengen radioaktiven Materials erreicht. Dem entgegen steht die Notwendigkeit von Trennungs- und Waschschritten zur Abtrennung nichtgebundenen radioaktiven Materials, wodurch die HTS-Tauglichkeit eingeschränkt wird. Darüber hinaus können solche Assays nur in strahlensicheren Räumlichkeiten und von entsprechend geschultem Personal angewendet werden (191).

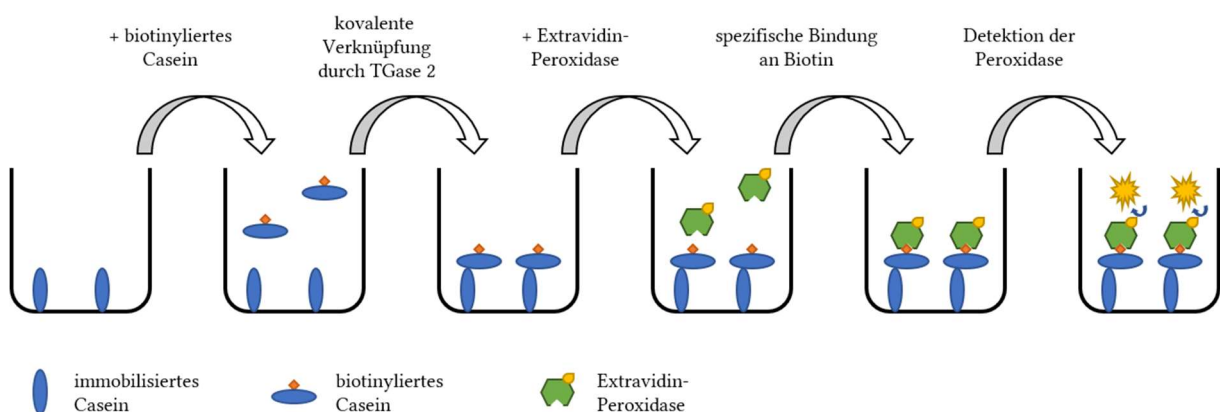


Abb. 22 Reaktionsschema des Assays von Lilley *et al.* (192)

Die Arbeitsgruppe von Martin Griffin beschrieb einen Assay, der ähnlich einem Enzymimmunoassay (*engl.* enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) auf dem Nachweis durch eine spezifischen Bindung basiert (Abb. 22). In dem Assay von Lilley *et al.* wird zunächst durch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid quervernetztes Casein in einer Microtiter-platte immobilisiert. Anschließend zugegebenes, biotinyliertes Casein wird durch die Anwesenheit von gpTGase 2 kovalent an das immobilisierte Casein gebunden woraufhin das markierte Biotin wird in einem weiteren Schritt durch Extravidin-Peroxidase spezifisch gebunden wird. Die Detektion erfolgt kolorimetrisch über die Zugabe von Wasserstoffperoxid, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Schwefelsäure (192). Dieser Assay zeichnet sich ebenso durch eine hohe Sensitivität aus, und wurde erfolgreich zur Charakterisierung von Hemmstoffen eingesetzt (193). Die verschiedenen Reaktions- und vielfachen Waschschrte verhinderten jedoch eine Verwendung im Hochdurchsatzverfahren.

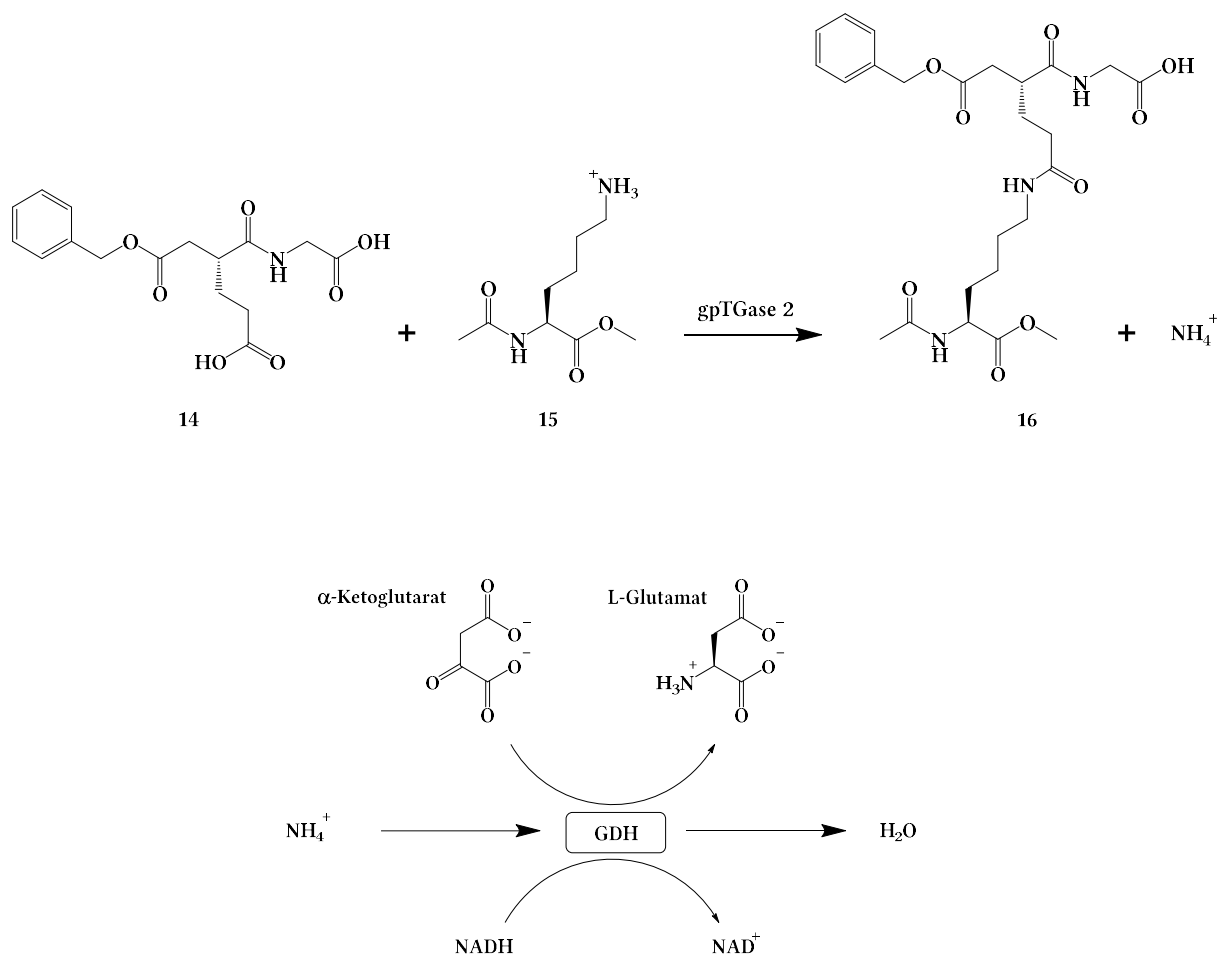


Abb. 23 Reaktionsschema des Assays von Day und Keillor (modifiziert nach (194) und (18))

Zu den spektrophotometrischen Assays zählen in erster Linie die drei nachfolgend beschriebenen Verfahren. Ein mit Glutamatdehydrogenase (GDH) gekoppelter Assay (194) weist die im Zuge der TGase 2-katalysierten Reaktion des Acyldonorsubstrats N-Benzoyloxycarbonyl-L-glutamylglycin (**14**) mit dem Acylakzeptor-substrat N-Acetyl-L-lysinmethylester (**15**) entstehenden Ammoniumionen nach. Dabei wird Nicotinamidadenindinukleotid als Coenzym von seiner reduzierten Form (NADH) in seine oxidierte Form (NAD⁺) überführt (Abb. 23). Die damit einhergehende Verschiebung des Absorptionsmaximums wird zur Quantifizierung des entstandenen NAD⁺ verwendet. Laut Pietsch *et al.* gehört der GDH-gekoppelte Assay zu den bestetablierten TGase 2-Assaystrategien und lässt sich mit einer Vielzahl von Substrat-Paaren wie kleinen Molekülen, Oligopeptiden und Proteinen verwenden (18). Durch eine vergleichsweise niedrige Sensitivität lassen sich hochpotente Inhibitoren mit diesem Assay jedoch nicht charakterisieren (18).

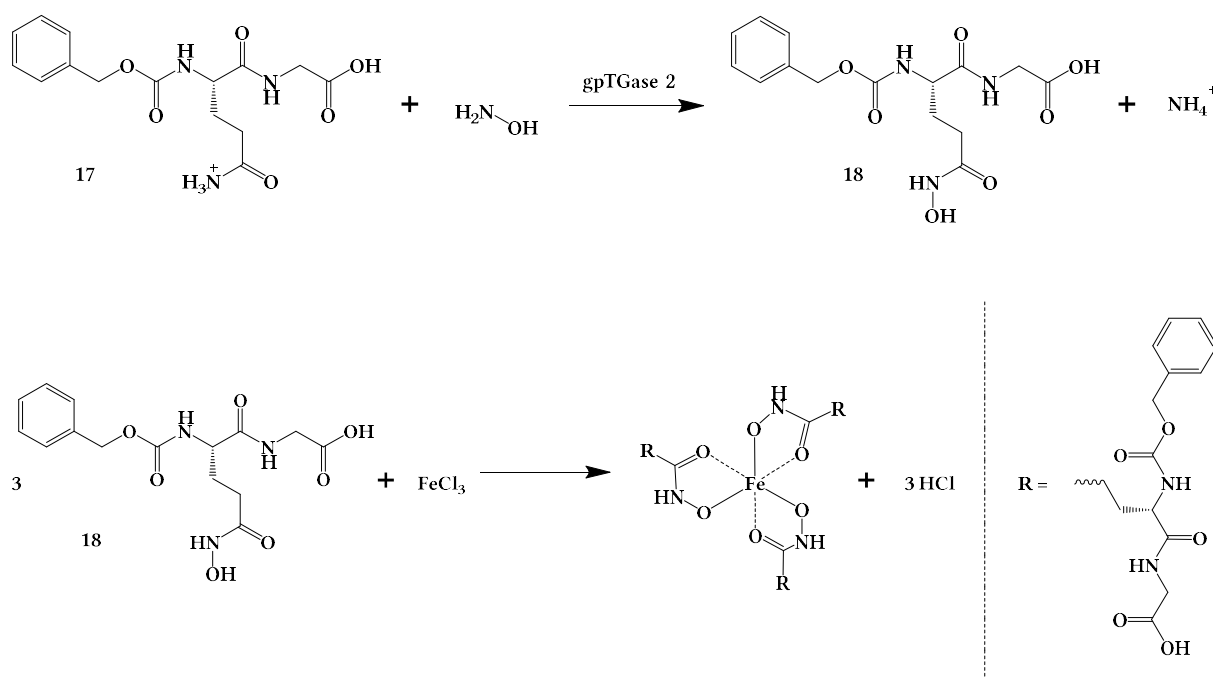


Abb. 24 Reaktionsschema des Hydroxamatassays von Folk und Cole (195)

In dem häufig verwendeten sogenannten Hydroxamatassay, bei dem das eingesetzte Acyldonorsubstrat N-Benzyloxycarbonyl-L-glutamiylglycin (**17**) TGase 2-katalysiert mit Hydroxylamin zu einem Hydroxamat umgesetzt wird, welches anschließend mit FeCl_3 komplexiert und kolorimetrisch quantifiziert wird (Abb. 24) (195). Der schnelle und gut reproduzierbare Hydroxamatassay wurde für ein initiales Inhibitor-Screening verwendet, zeigt jedoch die gleichen Limitationen hinsichtlich der Sensitivität auf und ist durch seinen diskontinuierlichen Mechanismus nicht in einem Hochdurchsatzverfahren zu verwenden.

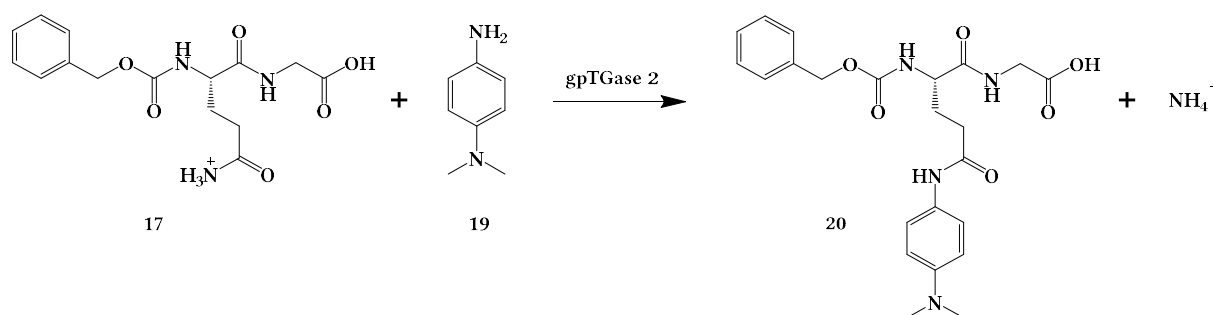


Abb. 25 Reaktionsschema des DMPDA-Assays von de Macédo *et al.* (modifiziert nach (18))

Weiterhin ist der sogenannte DMPDA-Assay zu nennen. Dieser verfolgt kontinuierlich die TGase 2-katalysierte kovalente Verknüpfung von N-Benzyloxycarbonyl-L-glutamiylglycin (**17**) mit N,N-Dimethyl-1,4-phenyldiamin (**19**) und quantifiziert das entstehende Anilid spektrophotometrisch (Abb. 25) (148). Dieser Assay ist aufgrund der niedrigen Absorptionswellenlänge von 278 nm jedoch anfällig für Interferenzen, erlaubt aber dennoch die Charakterisierung ausgewählter TGase 2-Inhibitoren (196).

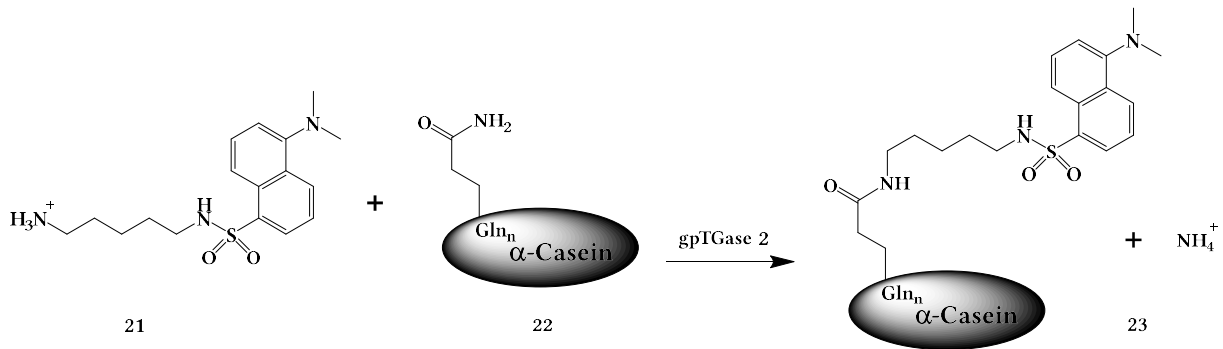


Abb. 26 Reaktionsschema des Fluoreszenzassays von Lorand *et al.* (modifiziert nach (18))

Zu den Fluoreszenzassays gehört der in der Arbeitsgruppe von Laszlo Lorand entwickelte kontinuierliche Assay zur Bestimmung der Aktivität des Fibrin-Stabilisierenden Faktors in Blutplasma (197). Dieser Assay verfolgt den FXIII-katalysierten Einbau von Monodansylcadaverin (21) in α -Casein (22) und die damit einhergehende Verschiebung des Emissionsspektrums von Monodansylcadaverin (Abb. 26).

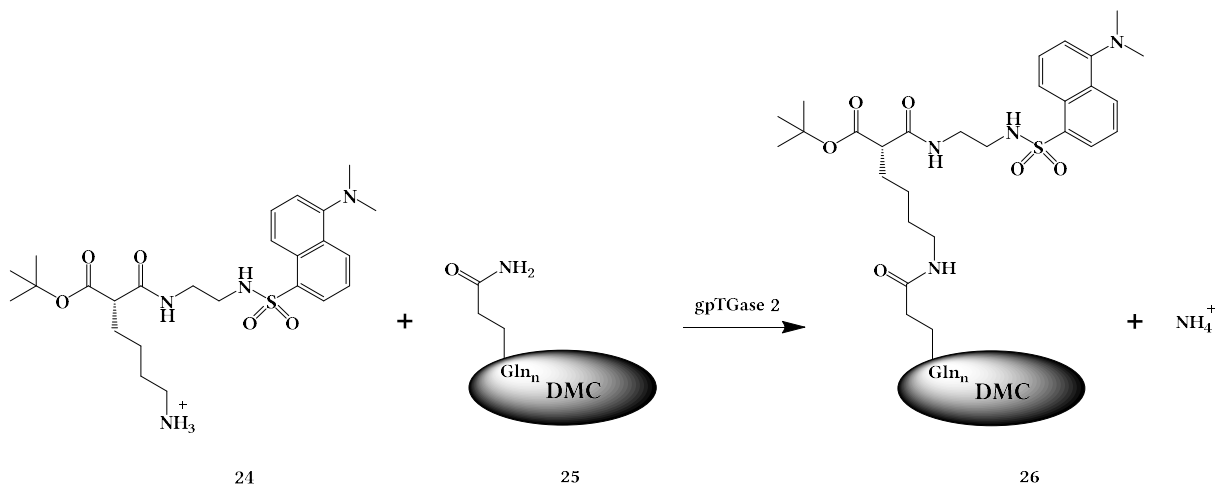


Abb. 27 Reaktionsschema des Fluoreszenzassays von Case *et al.* (198)

Darüber hinaus entwickelte die Arbeitsgruppe von Ross Stein eine Methode der TGase 2-katalysierten Verknüpfung von Boc-K-NH(CH₂)₂NH-Dns (24) mit *N,N*-Dimethylcasein (25) (Abb. 27) (198). Dieser schnelle und kontinuierliche Assay wurde zur Untersuchung von Inhibitoren genutzt, auch wenn das verwendete Dansyl-Fluorophor ($\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$) anfällig für Interferenzen mit einzelnen Stoffen in Substanzbibliotheken sein dürfte (199).

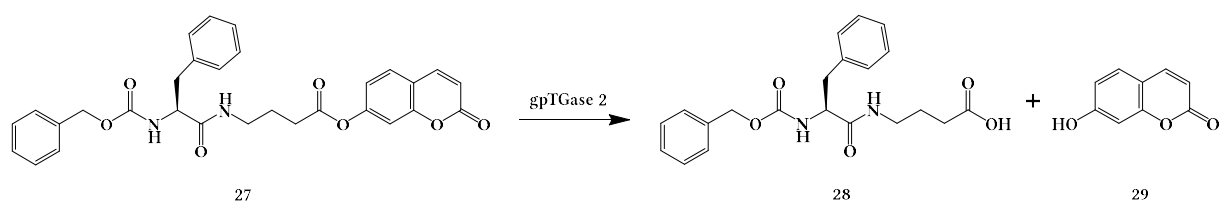


Abb. 28 Reaktionsschema des Fluoreszenzassays von Gillet *et al.* (200)

Ein direkter, fluorimetrischer Assay wurde im gleichen Jahr von der Arbeitsgruppe Jeffrey Keillor publiziert (200). Dieser folgt der TGase 2-abhängigen Hydrolyse von 4-(N-Carbobenzoxy-L-phenylalanyl-amino)-butansäurecoumarin-7-yl-ester (**27**) durch Fluoreszenzmessung des freigesetzten 7-Hydroxycoumarins (**29**) ($\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$) (Abb. 28). Dieser Assay wurde zur Quantifizierung der Transamidaseaktivität sowie zur Charakterisierung von Acylakzeptor-substraten verwendet. Die Anfälligkeit für Interferenzen im HTS dürfte hier aufgrund der geringeren Wellenlänge der Fluoreszenzemission jedoch noch ausgeprägter sein als im zuvor beschriebenen Assay von Case *et al.* (198). Durch Wodtke *et al.* wurden neue und hinsichtlich ihrer Wasserlöslichkeit erheblich verbesserte Acyldonorsubstrate beschrieben, die jedoch eine leicht stärkere Spontanhydrolyse aufweisen (201).

Die erste Anwendung der Fluoreszenzanisotropie zur Quantifizierung von Transamidaseaktivität wurde 1977 von Yamada und Meguro beschrieben, deren Assay die durch Faktor XIII katalysierte Inkorporierung von Monodansylcadaverin (**21**) in *N,N*-Dimethylcasein (**25**) verfolgt (vgl. Abb. 26, hier ist das Casein jedoch durch DMC ersetzt) (202).

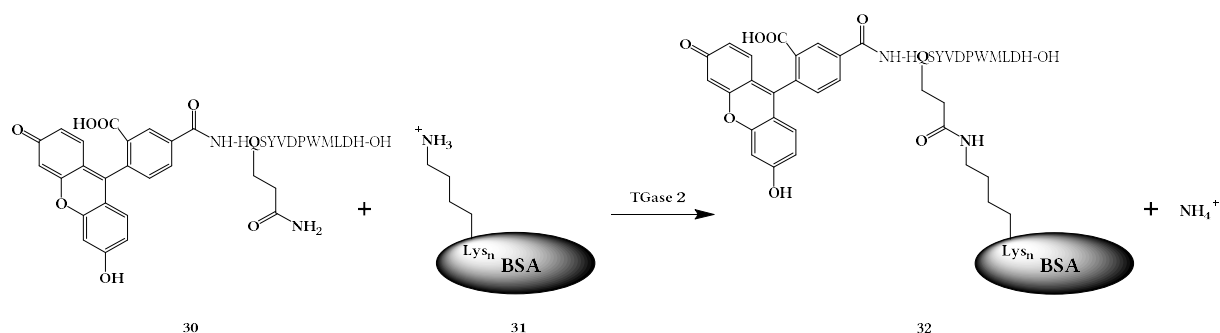


Abb. 29 Reaktionsschema des Fluoreszenzanisotropieassays von Kenniston *et al.* (modifiziert nach (18))

Eine Anwendung an TGase 2 folgte mit der Verwendung von FL-PepT26 (**30**), einem mit Fluorescein markierten Dodecapeptid, und bovinem Serumalbumin (**31**) durch Kenniston *et al.* (Abb. 29) (203). Beide Assays verfolgen den zeitabhängigen Anstieg der

Fluoreszenzanisotropie infolge der enzymkatalysierten Kupplung der entsprechenden Substrat-Paare. Beide Assays verwenden Fluorophore mit einer Emissionswellenlänge von 535 nm und sind entsprechend in gleicher Intensität anfällig für Interferenzen. Die Methode von Kenniston *et al.* konnte jedoch aufgrund seiner hohen Sensitivität in einem Hochdurchsatzverfahren eingesetzt werden.

Zur Entwicklung eines neuen Assays zur Bestimmung der Transamidaseaktivität der TGase 2 galten folglich folgende Grundvoraussetzungen: der Assay sollte ein homogenes, kontinuierliches, nicht-gekoppeltes Format mit einer spektrophotometrischen Messgröße aufweisen. Weiterhin sollten eine hohe Sensitivität, eine niedrige Anfälligkeit für Interferenzen mit Substanzbibliotheken und ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht werden (204)

2.1. Etablierung eines neuen Fluoreszenzanisotropie-basierten Transamidaseassays

Der hier neu entwickelte Assay wurde unter Verwendung von TGase 2 etabliert, die aus Meerschweinchenleber isoliert wurde. Diese gpTGase wird seit mindestens 1965 untersucht (195) und wird aufgrund einer Homologie von 83,2% (UniProt, P21980 vs. P08587) und einer vergleichbaren Enzymaktivität weithin als Modellenzym für humane TGase 2 verwendet (205–208). Unter diesen Voraussetzungen stellt gpTGase 2 eine kosteneffiziente Alternative zu hTGase 2 dar. Der Assay verwendet je eines von drei fluoreszenzmarkierten 1,5-Diaminopentanen (Cadaverinen) als Acylakzeptorsubstrate und *N,N*-Dimethylcasein als Acyldonorsubstrat. Die TGase 2-katalysierte kovalente Verknüpfung der beiden Substrate in Form einer Isopeptid-Bindung führt zum Anstieg der Fluoreszenzanisotropie im Laufe der Reaktion (Abb. 30) Diese Änderung der Fluoreszenzanisotropie über die Zeit stellt die Enzymaktivität dar und wird in den folgenden Auswertungen betrachtet.

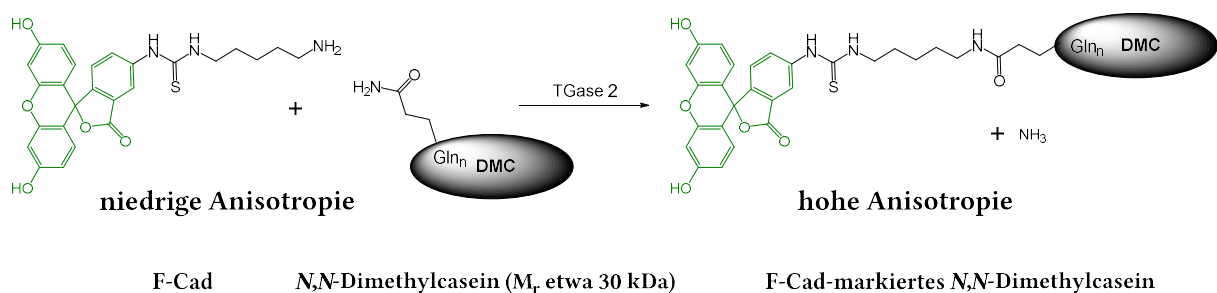


Abb. 30 Reaktionsschema des Transamidaseassays. TGase 2-katalysierte Reaktion zwischen F-Cad und DMC führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzanisotropie über die Zeit.

Die Acylakzeptorsubstrate sind entweder mit Fluorescein (F-Cad) oder Rhodamin B (R-S-Cad und R-I-Cad) markiert, wobei sich die letzteren beiden Substrate durch den verwendeten Linker zwischen Rhodamin B und Cadaverin unterscheiden. Im R-S-Cad ist der Farbstoff über eine Sarcosylgruppe mit Cadaverin verbunden, die eine freie Rotation ermöglicht. Im R-I-Cad sind die beiden Entitäten dagegen durch eine Isonipecotylgruppe verbunden, die eine rigide Struktur und einen festgelegten Winkel zwischen ihnen vorgibt (Abb. 31).

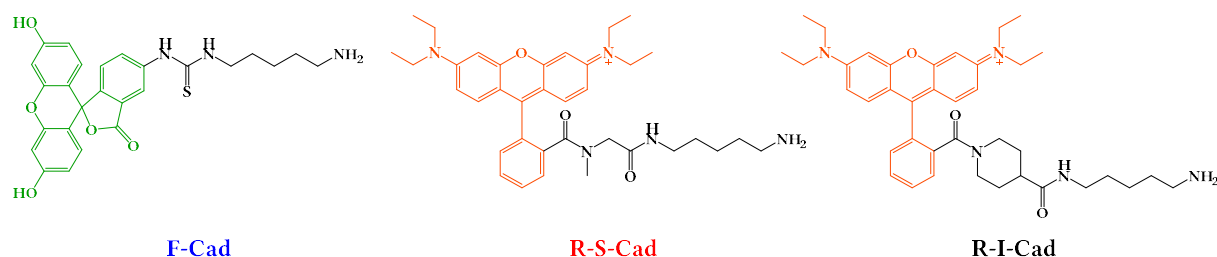


Abb. 31 Strukturformeln der fluoreszenzmarkierten Acylakzeptorsubstrate FITC-Cadaverin (F-Cad, $M = 605.58 \text{ g/mol}$), Rhodamin B-sarcosylcadaverin (R-S-Cad, $M = 825.84 \text{ g/mol}$) und Rhodamin B-isonipecotylcadaverin (R-I-Cad, $M = 865.90 \text{ g/mol}$)

Die Fluoreszenzanisotropie wird bei $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$ für das Fluorescein-tragende Substrat und bei $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$ für die Rhodamin B-markierten Substrate ermittelt. Hierfür werden die Fluoreszenzintensität parallel und perpendicular (I_{\parallel} und I_{\perp}) zur Einstrahlrichtung gemessen und gemäß Gl. 2 die Fluoreszenzanisotropie berechnet. Dabei wird ein – in diesem Fall vom Hersteller voreingestellter – G-Faktor von 0,87, ein gerätespezifischer Wert, verwendet um den intrinsischen Fehler des Detektionssystems einer Polarisationssebene gegenüber der anderen zu korrigieren (209).

In einem ersten Schritt wurde der Konzentrationsbereich der verwendeten Acylakzeptorsubstrate bestimmt, in dem eine lineare Abhängigkeit zwischen eingesetzter Konzentration und gemessenem Fluoreszenzsignal besteht. Diese Proportionalität wurde für alle drei Substrate für einen Bereich von 0,406 bis 4,06 μM demonstriert (Abb. 32).

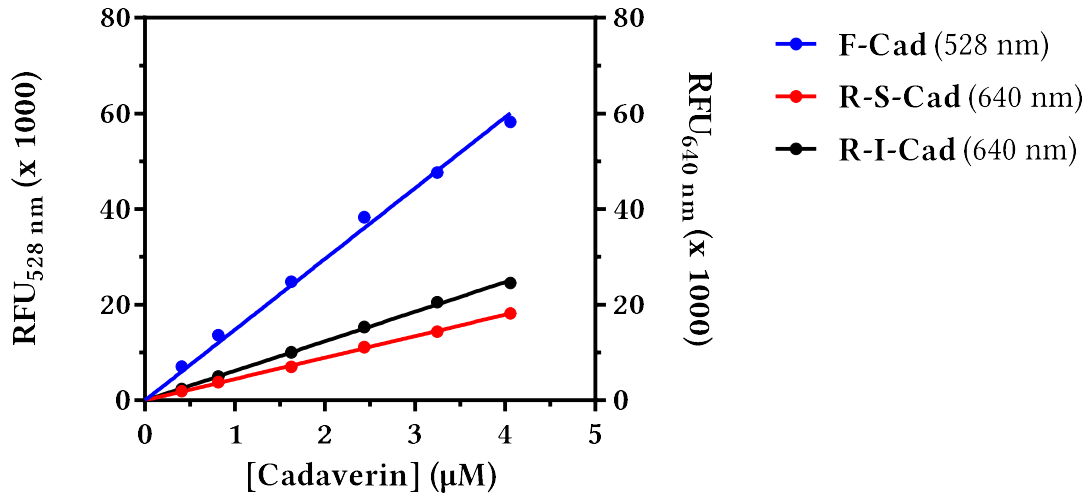


Abb. 32 Bestimmung der Fluoreszenz der drei Cadaverin-Derivate. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Arithmetischen Mittels (SEM) von drei unabhängigen Experimenten im Triplikate. Die Fluoreszenzwerte wurden um jene Werte korrigiert, die in Abwesenheit der Cadaverine gemessen wurden und die lineare Regression wurde durch den Ursprung gezwungen. Die Fehlerbalken sind in diesem Fall kleiner als die Datenpunkte (aus (210))

Diesem Schritt folgten Experimente zur Bestimmung der optimalen gpTGase 2-Konzentration. Dazu wurden festgelegte Substratkonzentrationen von $0,81 \mu\text{M}$ Acylakzeptorsubstrat und $10 \mu\text{M}$ DMC (für F-Cad und R-S-Cad) bzw. $30 \mu\text{M}$ DMC (für R-I-Cad) als Acyldonorsubstrat mit Enzymkonzentrationen zwischen 0 und $5 \mu\text{g/mL}$ gpTGase 2 untersucht. Die so bestimmten Werte für die Fluoreszenzanisotropie wurden gegen die Zeit aufgetragen und durch eine lineare Regression wurde daraus die Enzymaktivität bestimmt.

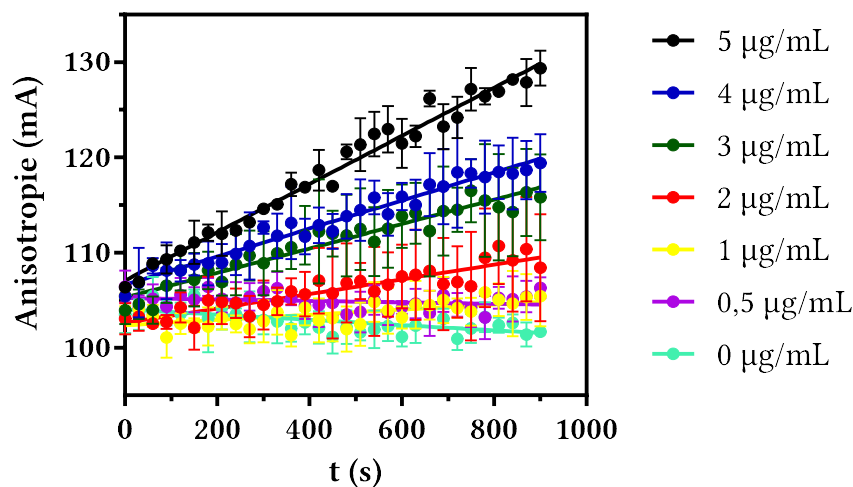


Abb. 33 Primärkurven der Aktivitätsbestimmung von gpTGase 2 mit DMC und F-Cad. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung eines Experimentes im Triplikate (aus (210))

Die folgende Auftragung der Enzymaktivität gegen die Enzymkonzentration ist in den Abb. 33 und 34 dargestellt. Eine lineare Abhängigkeit der Aktivität von der Enzymkonzentration konnte über den gesamten Konzentrationsbereich festgestellt werden. Diese Linearität ist essenziell für die Charakterisierung von Inhibitoren, da nur in diesem linearen Bereich ein um 50 % niedrigeres Signal einer zur Hälfte gehemmten Enzymmenge entspricht und sich die Hemmstärke der getesteten Inhibitoren so als IC_{50} -Wert darstellen lässt. Dieser Wert beschreibt die Inhibitorkonzentration, die zur Hemmung von 50% der Enzymaktivität nötig ist, wobei das inhibitorische Potential einer Substanz mit abnehmendem IC_{50} -Wert steigt. Um darüber hinaus ein möglichst großes Messfenster zu erreichen, wurde die höchste untersuchte Konzentration von 5 $\mu\text{g/mL}$ gpTGase 2 für alle nachfolgenden Experimente gewählt.

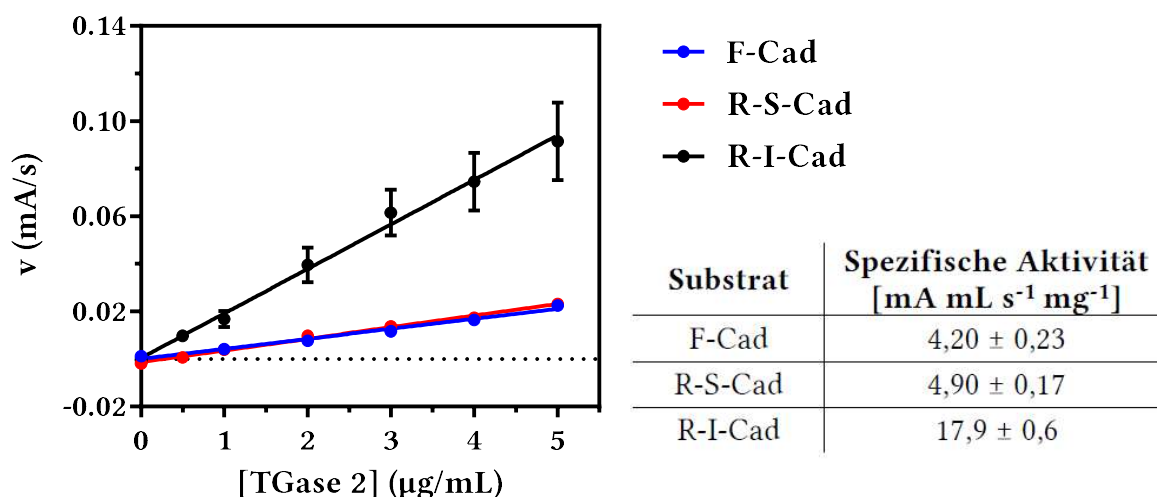


Abb. 34 Bestimmung der Aktivität von gpTGase 2 für die Reaktion von DMC mit den drei Cadaverinderivaten. Die dargestellten und angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten im Triplikate (aus (210))

2.2. Charakterisierung der Substrat-Enzym-Interaktion an gpTGase 2

Nachdem die optimale Enzymkonzentration bestimmt wurde, wurden die Substrat-Enzym-Interaktionen charakterisiert. Um die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der DMC-Konzentration zu untersuchen, wurden acht Konzentrationen zwischen 0,3 und 300 μM DMC mit einer festgelegten Konzentration jedes Cadaverins (0,81 μM) verwendet. Die erhaltenen Aktivitäten wurden gegen die DMC-Konzentration aufgetragen und einer nichtlinearen Regression unterworfen. Während die Reaktion von DMC mit F-Cad am besten durch eine Michaelis-Menten-Kinetik (vgl. Gl. 3) beschrieben werden konnte, folgten die Reaktionen

von DMC mit den Rhodamin B-tragenden Cadaverinen dem Modell der Substrathemmung (vgl. Gl. 4) (211). Aus beiden Analyse-Verfahren konnten die Michaelis-Konstante, K_m , und die maximale Produktbildungsgeschwindigkeit, v_{max} , berechnet werden; aus Gl. 4 zusätzlich die Dissoziationskonstante der Substrathemmung, K_i . Die erhaltenen Kurven sind in Abb. 35 dargestellt, die kinetischen Parameter in Tabelle 3.

$$v = \frac{v_{max} * [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

$$v = \frac{v_{max} * [S]}{K_m + [S] * \frac{1 + [S]}{K_i}} \quad (4)$$

v = Produktbildungsgeschwindigkeit

$[S]$ = Substratkonzentration

Wie bereits in den Experimenten zur Findung der Enzymkonzentration, zeigte sich auch hier eine signifikant höhere Produktbildungsgeschwindigkeit bei der Verwendung von R-I-Cad gegenüber F-Cad und R-S-Cad. Um ein vergleichbares Verhältnis von Substratkonzentration zu K_m -Wert zu erreichen, wurde für Messungen mit F-Cad und R-S-Cad je $10 \mu\text{M}$ DMC (= $3,28$ bzw. $1,98 \times K_m$), für Messungen mit R-I-Cad dagegen $30 \mu\text{M}$ DMC (= $1,09 \times K_m$) verwendet (Tabelle 3).

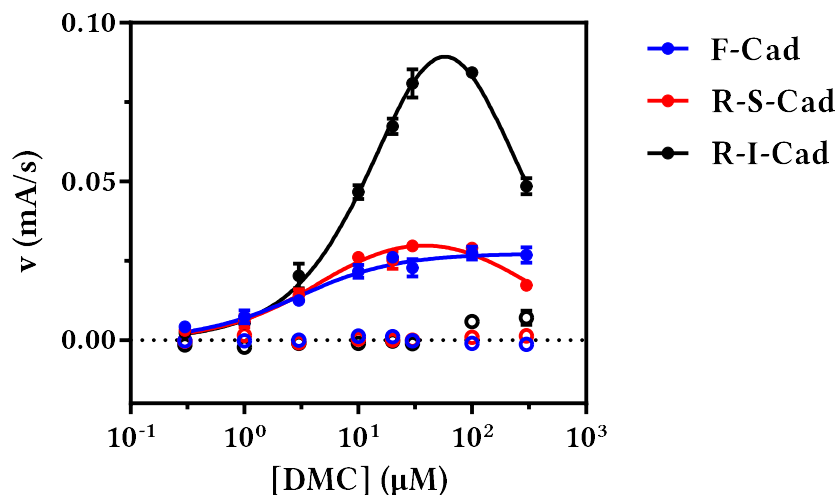


Abb. 35 Bestimmung der kinetischen Parameter K_m , v_{max} und K_i für die Reaktion von DMC mit den drei Cadaverinderivaten in Abwesenheit (leere Symbole) und Anwesenheit (volle Symbole) von 5 $\mu\text{g/mL}$ gpTGase 2. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten im Triplikate (aus (210))

Zur Betrachtung der Substratspezifität der gpTGase 2 werden die Parameter v_{max}/K_m bzw. k_{cat}/K_m herangezogen. Dabei errechnet sich die molekulare Aktivität, k_{cat} , gemäß Gl. 5

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{E_{aktiv}} \quad (5)$$

Hierbei ergeben sich für die drei untersuchten Donor-/Akzeptorpaare Spezifitätskonstanten, die sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Die Spezifität der TGase 2 für die drei Akzeptorsubstrate ist somit identisch. Werden die beiden Werte für K_m und v_{max} jedoch separat betrachtet, zeigt sich ein Anstieg um den Faktor 1,7 bzw. 1,4 für R-S-Cad gegenüber F-Cad bzw. um den Faktor 9,0 bzw. 6,5 bei der Verwendung für R-I-Cad gegenüber F-Cad (Tabelle 3). Dieser Tatsache liegt möglicherweise ein größer werdender Abstand zwischen Cadaverin und Fluorophor von F-Cad über R-S-Cad nach R-I-Cad zugrunde. Darüber hinaus trägt möglicherweise die fehlende Rotationsmöglichkeit zwischen Cadaverin und Fluorophor im R-I-Cad zu dessen maximaler Produktbildungsgeschwindigkeit gegenüber R-S-Cad bei.

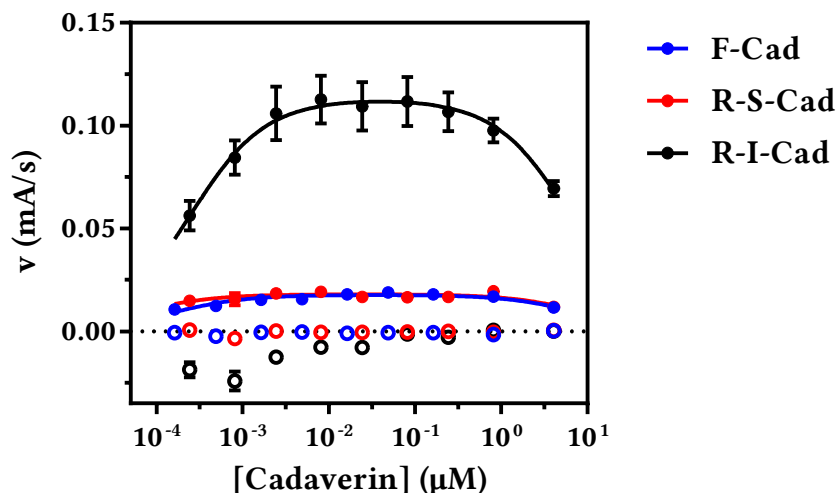


Abb. 36 Bestimmung der kinetischen Parameter K_m , v_{max} und K_i für die Reaktion der drei Cadaverinderivate mit DMC in Ab- (leere Symbole) und Anwesenheit (volle Symbole) von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gpTGase 2. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten im Triplikate. Teilweise sind die Fehlerbalken kleiner als die Datenpunkte (aus (210))

Werden die Konzentrationen der Acylakzeptorsubstrate in Anwesenheit einer festgelegten Konzentration DMC ($\sim 1.1\text{--}3.3 \times K_m$) variiert, zeigt sich für alle drei Substrate ein Verhalten, das sich ebenfalls am besten durch eine Substrathemmung beschreiben lässt (Abb. 36). Bestätigt wird dies durch Experimente unter der Verwendung von Dansylcadaverin als Acylakzeptorsubstrat (212). Eine Sättigung des Enzyms mit Acylakzeptorsubstrat wird für einen Konzentrationsbereich von 2,5 Größenordnungen beobachtet und liefert v_{max} -Werte, die über diesen Sättigungsbereich erreicht werden sowie apparente K_m -Werte im subnanomolaren Bereich (Tabelle 3). Diese Werte liegen jedoch deutlich unterhalb der berichteten Werte für F-Cad (213) oder Dansylcadaverin (197) und sollten daher nicht als kinetische Parameter interpretiert werden.

Für die nachfolgenden Studien wurden sodann Substratkonzentrationen eingesetzt, die eine maximale Enzymaktivität gewährleisten. Die Acylakzeptorsubstrate wurden dabei stets in einer Konzentration von 0,81 μM verwendet, wobei zur Assayvalidierung alle drei Substrate, in den Hemmstudien der Substanzbibliothek an gpTGase 2 F-Cad und an Experimenten mit hTGase 2 R-I-Cad zum Einsatz kamen. Die DMC-Konzentration richtete sich dabei nach dem eingesetzten Cadaverinderivat und betrug in Kombination mit F-Cad und R-S-Cad jeweils 10 μM und in Kombination mit R-I-Cad 30 μM .

Tabelle 3 Übersicht der kinetischen Parameter K_m , v_{max} und K_i für gpTGase 2. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten im Triplikat.

	K_m (μM)	v_{max} (mA s^{-1})	K_i (μM)
DMC (mit F-Cad)	$3,05 \pm 0,44$	$0,027 \pm 0,002$	-
DMC (mit R-S-Cad)	$5,06 \pm 0,74$	$0,038 \pm 0,002$	303 ± 45
DMC (mit R-I-Cad)	$27,5 \pm 6,4$	$0,179 \pm 0,028$	135 ± 32
F-Cad	$2,22 \pm 1,40 \cdot 10^{-4}$	$0,018 \pm 0,001$	$9,2 \pm 3,1$
R-S-Cad	$0,66 \pm 0,37 \cdot 10^{-4}$	$0,018 \pm 0,001$	$10,2 \pm 2,0$
R-I-Cad	$2,42 \pm 0,69 \cdot 10^{-4}$	$0,113 \pm 0,013$	$7,1 \pm 2,2$

2.3. Charakterisierung der Substrat-Enzym-Interaktion für humane TGase 2

TGase 2 aus der Leber von Meerschweinchen wird seit 1965 untersucht (195) und aufgrund einer Homologie von 83,2% (UniProt, P21980 vs. P08587), einer vergleichbaren Enzymaktivität weithin als Modellenzym für humane TGase 2 verwendet (205–208). Unter diesen Voraussetzungen stellt gpTGase 2 eine kosteneffiziente Alternative zu hTGase 2 dar.

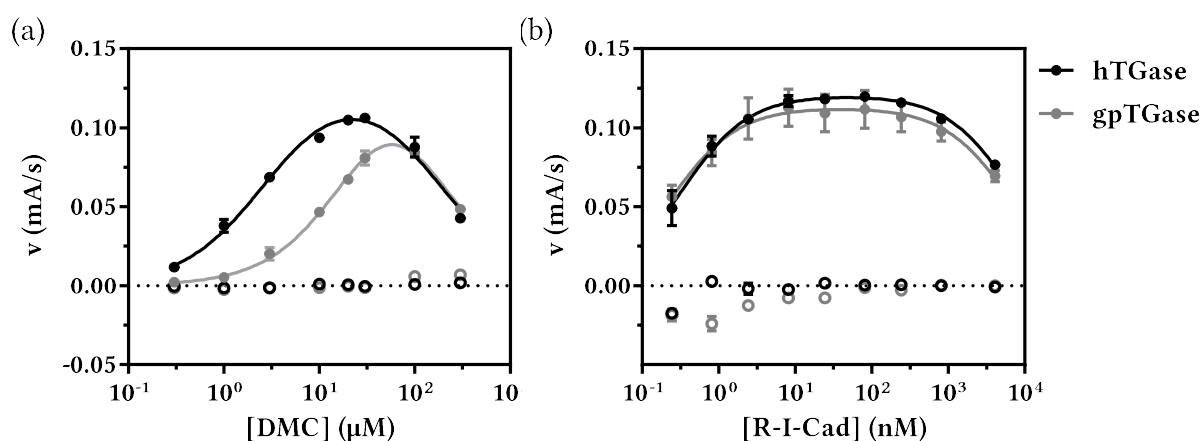


Abb. 37 Bestimmung der kinetischen Parameter K_m , v_{max} und K_i für die Reaktion von DMC (variiert oder $30 \mu\text{M}$) mit R-I-Cad (variiert oder $0,81 \mu\text{M}$) katalysiert durch $5 \mu\text{g/mL}$ hTGase 2 bzw. gpTGase 2. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von zwei (hTGase 2) oder drei (gpTGase 2) unabhängigen Experimenten im Duplikat (hTGase 2) oder Triplikat (gpTGase 2). Die Fehlerbalken sind teilweise kleiner als die Datenpunkte (aus (214))

Die Charakterisierung der Substrat-Enzym-Interaktionen für hTGase 2 erfolgte analog gpTGase 2 unter Verwendung von R-I-Cad (Abb. 37, Tabelle 4). Die anderen Acylakzeptorsubstrate wurden mit dem humanen Enzym nicht verwendet. Das kinetische Verhalten beider Enzyme war sehr ähnlich und unterschied sich lediglich im K_m -Wert von

DMC, welcher am humanen Enzym um den Faktor 6,2 niedriger war als an gpTGase 2. Die maximale Produktbildungsgeschwindigkeit wiesen beide Enzyme bei einer DMC-Konzentration von ca. 30 μM auf, weshalb diese DMC-Konzentration in allen nachfolgenden Experimenten verwendet wurde. Das Verhalten bei variiertem R-I-Cad-Konzentration ist für beide Enzyme nahezu identisch und ergibt apparente K_m - und v_{\max} -Werte, die auch hier nicht als Kinetische Parameter interpretiert werden sollten. In Tabelle 4 werden die ermittelten (kinetischen) Parameter für gpTGase 2 und hTGase 2 aufgeführt. Ein Vergleich der v_{\max}/K_m -Werte erfolgt an dieser Stelle nicht, da die aktive Enzymmenge, E_{aktiv} , für die beiden TGasen nicht separat bestimmt wurde der davon abhängige Parameter der maximalen Produktbildungsgeschwindigkeit (vgl. Gl. 5) somit unterschiedlich ist.

Tabelle 4 Übersicht der kinetischen Parameter K_m , v_{\max} und K_i für hTGase 2. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von zwei (hTGase 2) oder drei (gpTGase 2) unabhängigen Experimenten im Duplikat (hTGase 2) oder Triplikat (gpTGase 2).

Enzym	Substrat	K_m (μM)	v_{\max} (mA s^{-1})	K_i (μM)
gpTGase 2	DMC	$27,5 \pm 6,4$	$0,179 \pm 0,028$	135 ± 32
	R-I-Cad	$2,42 \pm 0,69 \cdot 10^{-4}$	$0,113 \pm 0,013$	$7,1 \pm 2,2$
hTGase 2	DMC	$2,78 \pm 0,10$	$0,132 \pm 0,001$	174 ± 16
	R-I-Cad	$3,43 \pm 1,13 \cdot 10^{-4}$	$0,121 \pm 0,002$	$6,8 \pm 0,5$

2.4. Validierung des neuen Assays mittels literaturbekannter Hemmstoffe

Zur Validierung des neuen Transamidaseassays für Hemmstudien wurden IC_{50} -Werte von drei literaturbekannten Inhibitoren unterschiedlicher Natur bestimmt (Abb. 38): Iodacetamid (33), dem N^{ϵ} -Acryloyl-lysinpiperazid 34 und GTP.

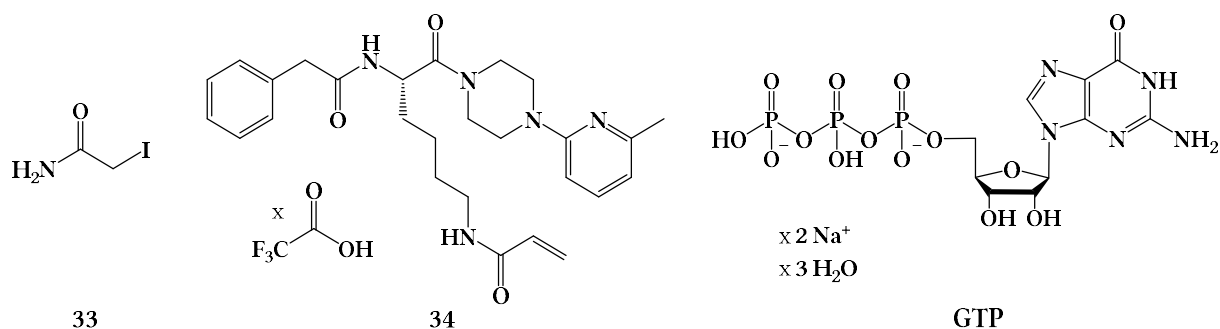


Abb. 38 Strukturformeln der TGase 2-Inhibitoren 33, 34 und GTP.

Iodacetamid ist ein unselektiver, irreversibler Hemmstoff von Cysteinproteasen und reagiert unter Abspaltung von Iodwasserstoff mit der Thiol-Gruppe des katalytisch aktiven Cysteins wodurch eine Thioether-Struktur ausgebildet wird (148). Die reaktive Gruppe von Substanz 1 ist eine N -Acryloylgruppe, die vom katalytischen Cystein 277 im Rahmen einer Michael-Addition angegriffen wird und ebenfalls zur Ausbildung einer Thioetherbindung führt. Dieser Hemmstoff wirkt selektiv auf TGase 2 (161). Darüber hinaus wurde GTP als endogener, reversibler Hemmstoff der TGase 2 verwendet (215).

Die drei Verbindungen wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit die Transamidaseaktivität der gpTGase 2 zu hemmen charakterisiert. Hierbei kamen jeweils alle drei Cadaverinderivate in separaten Experimenten zum Einsatz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt. Die verbliebene Aktivität wurde nach 30 Minuten Vorinkubation von Enzym und Hemmstoff durch Zugabe von DMC zum Reaktionsansatz gemessen und die IC_{50} -Werte anhand von Gl. 6 ermittelt.

$$v = \frac{(top - bottom) * [I]^{n_H}}{[I]^{n_H} + IC_{50}^{n_H}} + bottom \quad (6)$$

v = Produktbildungsgeschwindigkeit

n_H = Hill-Koeffizient

top = oberes Plateau der sigmoidalen Kurve

$bottom$ = unteres Plateau der sigmoidalen Kurve

Für alle drei Inhibitoren wurde eine dosisabhängige Hemmung gefunden, die in hohen Konzentrationen zur völligen Auslöschung der Enzymaktivität führte (Abb. 39). Das verwendete Cadaverinderivat hatte dabei keinen Einfluss auf die IC_{50} -Werte von Iodacetamid und Verbindung 1 (Tabelle 5). Lediglich für GTP gab es einen signifikanten Unterschied der IC_{50} -Werte bei Verwendung von F-Cad und R-I-Cad (Tabelle 5). Für die nichtlineare Regression wurde Gl. 6 mit variablem Hill-Koeffizienten verwendet, um eine bessere Anpassung der Kurve an die Datenpunkte zu erhalten. Dabei unterschied sich die überwiegende Mehrheit der ermittelten Hill-Koeffizienten nicht signifikant von 1, was die Vermutung unterstreicht, dass alle verwendeten Hemmstoffe im molaren Verhältnis von 1 zu 1 mit gpTGase 2 interagieren.

Für Iodacetamid wurde ein IC_{50} -Wert von 0,019-0,022 μM ermittelt, was in etwa der halben in diesem Assay verwendeten Enzymmenge entspricht, die nach Angaben des Herstellers zu 0,053 μM berechnet wurde. Somit reagiert Iodacetamid innerhalb der gewählten Vorinkubationszeit von 30 min mit sämtlichen unbesetzten Enzymmolekülen und inaktiviert es auf diese Weise vollständig. Für Substanz 1 wurde dagegen ein IC_{50} -Wert von 0,267-0,277 μM ermittelt. Dieser Wert ist um eine Größenordnung höher als der entsprechende Wert für Iodacetamid als auch der von Wityak *et al.* ermittelte IC_{50} -Wert. Diese Diskrepanz ist in erster Linie darauf zurückzuführen, dass gpTGase 2 an Stelle von hTGase 2 verwendet wurde, welches grundsätzlich langsamer mit den beschriebenen N^{E} -Acryloyllysinpiperaziden interagiert (161). Auch ist die genaue aktive Enzymkonzentration in beiden Fällen unbekannt. Daneben haben Enzymmenge, Art und Konzentration der verwendeten Substrate, Pufferzusammensetzung und – besonders für irreversible Hemmstoffe relevant – die Dauer der Vorinkubation einen Einfluss auf den gemessenen IC_{50} -Wert. Dieser sollte daher eher zum Vergleich verschiedener Inhibitoren innerhalb einer Studie verwendet werden denn zum Vergleich mit Literaturdaten (216, 217).

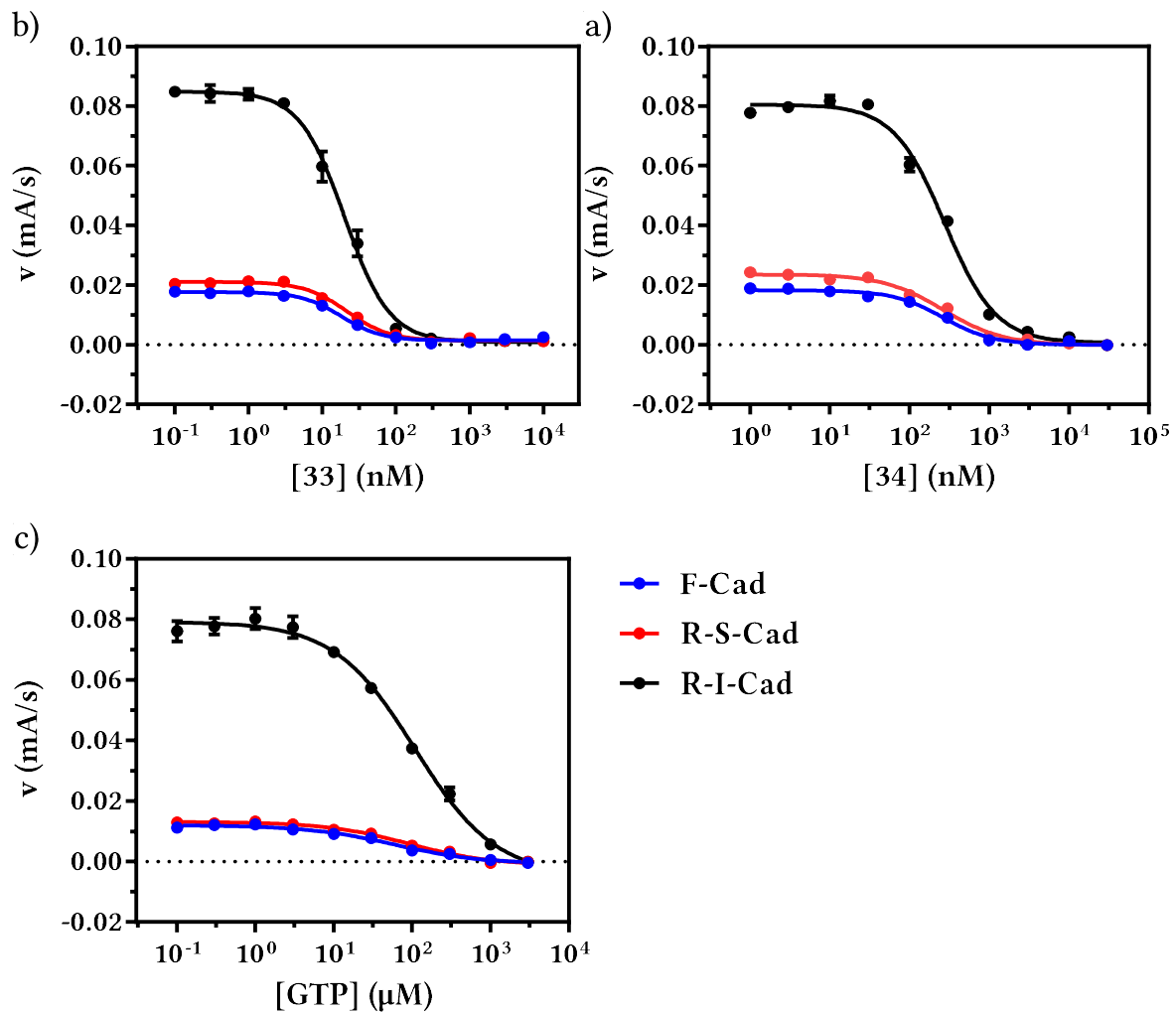


Abb. 39 Hemmung der gpTGase 2-katalysierten Reaktion von DMC mit den drei Cadaverinderivaten durch **34** (a), Iodacetamid (b) und GTP (c). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei bis vier unabhängigen Experimenten im Triplikate. Die Fehlerbalken sind teilweise kleiner als die Datenpunkte (aus (210))

Die Hemmung von TGase 2 durch GTP konnte aufgrund der bekannten Ca^{2+} -Abhängigkeit nicht wie geplant in dem unter anderem von Day und Keillor sowie von Gillet *et al.* (194, 200) verwendeten und auf 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) basierendem Puffersystem durchgeführt werden, sondern wurde analog zu Case *et al.* (198) bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 1 mM in HEPES-Puffer bei einem pH-Wert von 7.4 durchgeführt. Dieser Aufbau führte zu einem IC_{50} -Wert von 66,6 μM (für F-Cad), einem Wert vergleichbar mit dem K_i -Wert von 90 μM , der von Achyuthan und Greenberg ermittelt wurde (215). Beim Einsatz von R-S-Cad und R-I-Cad ergaben sich signifikant höhere IC_{50} -Werte von 91,4 μM bzw. 109 μM (Tabelle 5). Dabei musste der letztgenannte Wert mit einer DMC-Konzentration von 10 μM bestimmt werden, da die übliche DMC-Konzentration von 30 μM zu einem Anstieg des IC_{50} -Werts um das Dreifache führte.

Dabei kommt der Einfluss höherer DMC-Konzentrationen zum Tragen, welche die elongierte Konformation der TGase 2 stabilisieren (23). Da die Bindung von GTP an TGase 2 jedoch nur

in ihrer sphärischen Konformation (vgl. Abb. 4) möglich ist, bewirkt eine höhere DMC-Konzentration eine verminderte Bindung von GTP an TGase 2. Genauere Untersuchungen zur Ca^{2+} -Abhängigkeit der Konformation und der daraus resultierenden Aktivitäten sind im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

Tabelle 5 Übersicht über die IC_{50} -Werte der eingesetzten Inhibitoren in Abhängigkeit von den eingesetzten Acylakzeptorsubstraten. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei bis vier unabhängigen Experimenten im Triplikat. Die Hill-Koeffizienten lagen im Bereich von 0,69 bis 1,91, jedoch war er in keinem Experiment signifikant unterschiedlich von 1 (Einstichproben-*t*-Test).

Inhibitor	IC_{50} (nM) mit F-Cad	IC_{50} (nM) mit R-S-Cad	IC_{50} (nM) mit R-I-Cad
33	$18,7 \pm 1,9$	$21,7 \pm 2,0$	$20,7 \pm 3,9$
34	270 ± 35	267 ± 9	277 ± 6
GTP	$66,6 \pm 7,2 \times 10^3$	$91,4 \pm 10,9 \times 10^3$	$109 \pm 7 \times 10^3$

2.5. Charakterisierung der Calciumabhängigkeit der Transamidaseaktivität von TGase 2

Alle bisher beschriebenen Experimente mit dem Transamidaseassay wurden in Anwesenheit von 1-3 mM CaCl_2 durchgeführt. Diese unphysiologisch hohe Konzentration führt zur Stabilisierung der offenen, elongierten Konformation der TGase 2 und erlaubt so eine vollständige Transamidaseaktivität. Um den bekannten Einfluss von Ca^{2+} auf die Transamidaseaktivität zu charakterisieren, wurde mit einem calciumfreien Puffersystem gearbeitet und die Ca^{2+} -Konzentration in einem Bereich von 10^{-6} bis 10^{-1} M variiert. Dabei wurde das Substratpaar DMC/R-I-Cad in Konzentrationen von 30 μM bzw. 0,81 μM verwendet. Die erhaltene Transamidaseaktivität wurde gegen die Ca^{2+} -Konzentration aufgetragen, gemäß Gl. 6 ausgewertet und derart normalisiert, dass die oberen und unteren Plateaus der erhaltenen sigmoidalen Kurve Werte von 1 bzw. 0 aufwiesen (Abb. 40). Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen bis ca. 0,05 mM war keine Transamidaseaktivität messbar, bei Ca^{2+} -Konzentrationen > 2 mM lag dagegen eine nahezu maximale Transamidaseaktivität vor. Dazwischen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Aktivierung der Transamidaseaktivität mit einer Konzentration halbmaximaler Aktivität, EC_{50} , von 0,35 mM. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Angabe, dass intrazelluläre Transglutaminasen EC_{50} -Werte für Ca^{2+} im Bereich 0,1-0,5 mM aufweisen (218). Unter physiologischen Bedingungen liegt die Calciumkonzentration im Zellplasma bei etwa $1 \cdot 10^{-7}$ M (44, 219), womit eine Transamidaseaktivität ausgeschlossen scheint. In der

Interstitialflüssigkeit beträgt die Konzentration dagegen etwa 1,2 mM (219), wodurch bei Calciumioneneinstrom in die Zelle Werte erreicht werden, die eine Transamidaseaktivität ermöglichen.

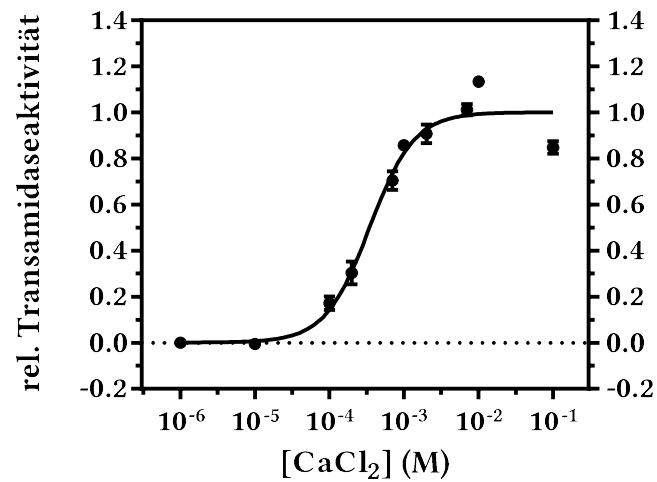


Abb. 40 Einfluss der Calciumkonzentration auf die Transamidaseaktivität der hTGase 2. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten im Triplikate. Die Fehlerbalken sind teilweise kleiner als die Datenpunkte.

2.6. Anwendung des Assays auf weitere TGasen

Da die Mitglieder der Transglutaminase-Enzymfamilie einen ähnlichen katalytischen Mechanismus aufweisen, wurde der neu entwickelte Assay auch auf andere Transglutaminasen, i.e. die TGasen 1, 3 und 6 sowie den Fibrin-Stabilisierenden Faktor (Faktor XIII der Blutgerinnungskaskade), angewendet.

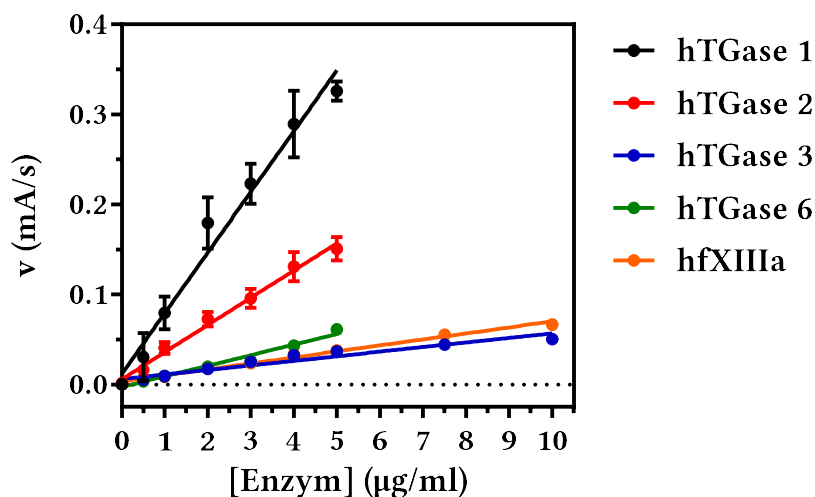


Abb. 41 Bestimmung der Transamidaseaktivität der humanen TGasen 1, 2, 3, 6 und FXIIIa für die Reaktion von DMC mit R-I-Cad. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten im Triplikat. Die Fehlerbalken sind teilweise kleiner als die Datenpunkte.

Die Bestimmung der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Enzymkonzentration wurde, wie für gpTGase 2 beschrieben, mit den Substraten R-I-Cad ($0,81 \mu\text{M}$) und DMC ($30 \mu\text{M}$) durchgeführt. Dabei zeigte sich eine lineare Abhängigkeit der Enzymaktivität im Konzentrationsbereich $0-5 \mu\text{g/mL}$ Enzym für die TGasen 1, 2 und 6 bzw. im Konzentrationsbereich $0-10 \mu\text{g/mL}$ Enzym für TGase 3 und FXIIIa (Abb. 41 und Tabelle 6).

Tabelle 6 Spezifische Transamidaseaktivität der untersuchten humanen TGase 1, 2, 3, 6 und FXIIIa. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten im Triplikate.

Enzym	Spezifische Aktivität [mA mL s ⁻¹ mg ⁻¹]
hTGase 1	68,4 \pm 4,5
hTGase 2	30,3 \pm 2,6
hTGase 3	7,55 \pm 0,47
hTGase 6	11,5 \pm 0,8
hFXIIIa	7,66 \pm 0,71

Die Charakterisierung der Enzym-Substrat-Interaktionen für die verschiedenen Transglutaminasen wurde analog der TGase 2 durch Variation der Konzentration des Acyldonorsubstrats in Anwesenheit einer fixen Konzentration des Acylakzeptorsubstrats R-I-Cad (0,81 μ M) bei Enzymkonzentrationen von 2 μ g/mL (TGase 1) oder 5 μ g/mL (alle anderen TGasen) durchgeführt. Alle getesteten Vertreter der TGase-Familie zeigten ein Verhalten, dass sich wie bei TGase 2 am ehesten mit dem Modell der Substrat-Hemmung analysieren ließ (Abb. 42). Die erhaltenen kinetischen Parameter wurden auf die Enzymkonzentration (in mg/mL) normiert und sind in Tabelle 7 dargestellt.

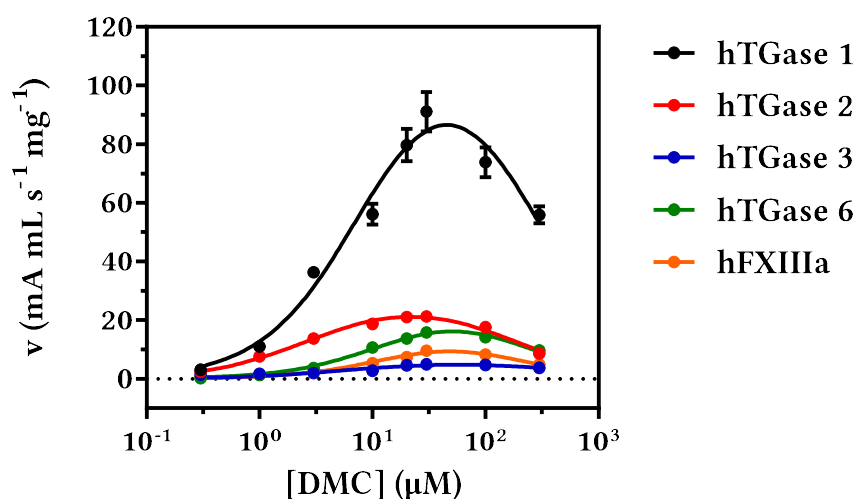


Abb. 42 Bestimmung der kinetischen Parameter K_m , v_{max} und K_i für die Reaktion von DMC mit R-I-Cad. Dargestellt ist die Transamidaseaktivität, normiert auf die Enzymkonzentration (mg/mL), aufgetragen gegen die Substratkonzentration. Die Werte für hTGase 2 sind Abb. 37 entnommen. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von zwei (hTGase 2) oder drei unabhängigen Experimenten im Duplikat (hTGase 2) oder Triplikate. Die Fehlerbalken sind teilweise kleiner als die Datenpunkte.

Der Einfluss variierender Konzentrationen von R-I-Cad wurde nicht weiter untersucht, da bei vergleichbaren Experimenten mit TGase 2 konstante Produktbildungsgeschwindigkeiten über einen Bereich von 2,5 Größenordnungen erhalten wurden. Daher wurde auch für die Experimente mit den anderen untersuchten TGasen R-I-Cad in einer Konzentration von 0,81 μM verwendet.

Tabelle 7 Übersicht über die kinetischen Parameter K_m , v_{\max} , K_i und v_{\max}/K_m für die untersuchten hTGasen. Die Parameter K_m und K_i für hTGase 2 sind Tabelle 4 entnommen. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von zwei (hTGase 2) oder drei unabhängigen Experimenten im Duplikat (hTGase 2) oder Triplikat.

	K_m (μM)	K_i (μM)	v_{\max} ($\text{mA mL s}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	v_{\max}/K_m ($\text{mA mL s}^{-1} \mu\text{M}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
hTGase 1 $n = 3$	$8,77 \pm 1,69$	270 ± 72	121 ± 13	$14,3 \pm 1,3$
hTGase 2 $n = 2$	$2,78 \pm 0,10$	174 ± 16	$26,4 \pm 0,3$	$9,52 \pm 0,44$
hTGase 3 $n = 3$	$6,29 \pm 1,52$	571 ± 53	$5,80 \pm 0,09$	$1,04 \pm 0,24$
hTGase 6 $n = 3$	$16,5 \pm 4,7$	189 ± 61	$27,1 \pm 4,1$	$1,75 \pm 0,22$
hFXIIIa $n = 3$	$17,5 \pm 0,7$	135 ± 14	$16,0 \pm 1,1$	$0,92 \pm 0,10$

Der Parameter v_{\max}/K_m ist hierbei gewissermaßen ein Indikator für die Substratspezifität und erlaubt in geringem Umfang einen Vergleich der Eignung der Substrate für die jeweiligen Enzyme. Wie bereits in Kapitel II.2.2 beschrieben, ist der Parameter v_{\max}/K_m jedoch dahingehend limitiert, dass die aktive Enzymmenge der untersuchten TGasen nicht bestimmt wurde. Ein unterschiedliches Molekulargewicht und eine damit einhergehende verschiedene molare Konzentration ist dagegen nur für TGase 1 ($M_r = 90$ kDa) gegenüber den restlichen Isoformen ($M_r =$ jeweils 78 kDa) zu betrachten. Unter diesen Voraussetzungen ist festzuhalten, dass sich der beschriebene Assay mit dem Substratpaar DMC/R-I-Cad sehr gut für die Verwendung mit den TGasen 1 und 2 eignet, und von den weiteren Isoformen um einen Faktor von etwa 5-10 weniger gut umgesetzt. Da sich das Substratpaar DMC/R-I-Cad, wie nachfolgend gezeigt, für zuverlässige Hemmstudien der TGase 2 eignet, lässt sich vermuten, dass dasselbe auch für die weiteren untersuchten TGasen gilt.

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten wurden teilweise von Frau Renata Kasprzyk, Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jacek Jemielity an der Universität Warschau, Polen, im Rahmen eines zweimonatigen Forschungsaufenthaltes während ihrer Promotion erhoben.

2.7. Identifizierung und Charakterisierung neuer Hemmstoffe am aktiven Zentrum der TGase 2

Nach Etablierung und Validierung des Transamidaseassays wurde eine Substanzbibliothek von 32 neu synthetisierten *N*^ε-Acryloyllysinpiperaziden untersucht und im Hinblick auf ihr inhibitorisches Potential charakterisiert. Diese Substanzen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Reik Löser (Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung) zur Verfügung gestellt. In den Tabellen 8-11 sind die Strukturen und Hemmstärken der Substanzen **34-65** aufgeführt.

2.8. Bestimmung der Reversibilität von Inhibitoren mit *N*^ε-Acryloyllysinpiperazidmotiv

Um den Wirkungsmechanismus der neuen Hemmstoffe zu untersuchen, wurde ein Sprung-Verdünnungs-Experiment (*engl.* jump-dilution experiment) nach Copeland durchgeführt (220). Dabei wird ein regulärer Hemmversuch mit einem Ansatz verglichen, bei dem die 100-fache Enzymmenge mit der 100-fachen IC₅₀-Konzentration des Hemmstoffs prä-inkubiert und zum Start der Reaktion 100-fach in ein Gemisch aus Assaypuffer und Substraten verdünnt wird, um wieder die nominellen Assay-Konzentrationen zu erhalten. Im konzentrierten Ansatz kommt es zu einer vollständigen Enzymhemmung, die sich bei reversibel agierenden Inhibitoren im Zuge der Verdünnung dem Grad des regulären Hemmversuchs annähert, d.h. es resultiert die halbmaximale Enzymaktivität. Diese Wiederherstellung der Aktivität erfolgt bei schnell-bindenden Inhibitoren (*engl.* quick binders) zügig, bei langsam-bindenden Inhibitoren (*engl.* slow binders) langsamer. Handelt es sich jedoch um einen irreversiblen Hemmstoff, wird die Enzymaktivität nicht wiederhergestellt (220).

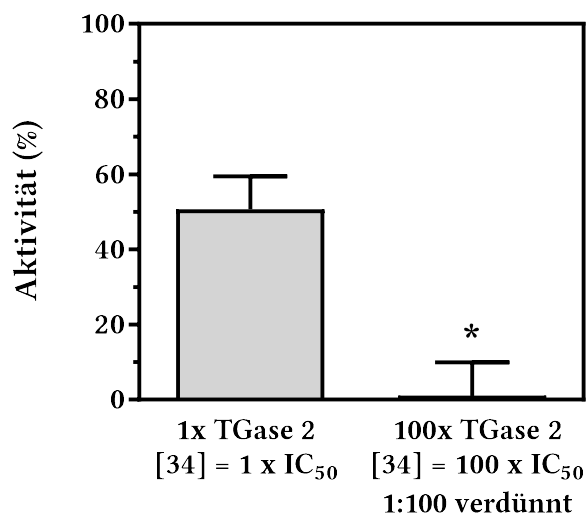


Abb. 43 Ergebnis des Sprung-Verdünnungs-Experiments zur Bestimmung der Reversibilität der Hemmung der Transamidaseaktivität von gpTGase 2 durch 34. Die beiden Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten im Triplikate und sind signifikant voneinander verschieden ($P = 0,0004$, Zweistichproben-*t*-Test für ungepaarte Stichproben) (aus (214))

Als Modell für die neue Reihe an Inhibitoren wurde Substanz 1 untersucht. Im regulären Hemmversuch wurde bei einer Inhibitorkonzentration von 300 μ M eine Restaktivität der gpTGase 2 von 50,7% gemessen, während im Sprung-Verdünnungs-Experiment eine Restaktivität von 1,0% resultierte (Abb. 43).

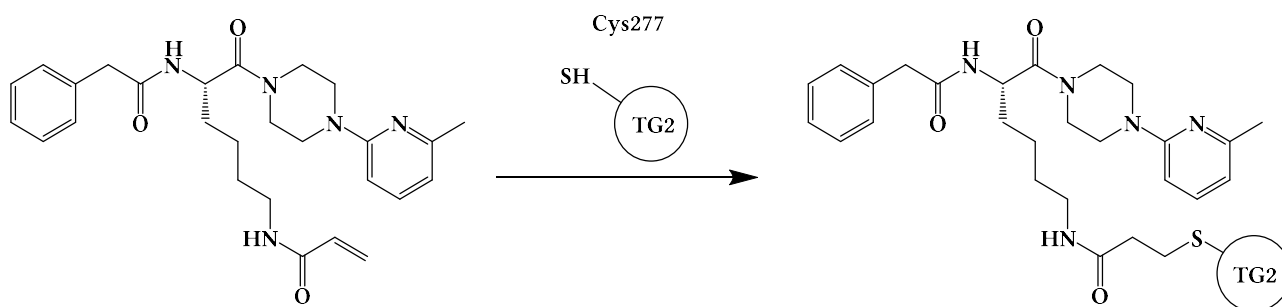


Abb. 44 postulierter Wirkmechanismus der N^{ϵ} -Acryloyl-lysinpiperazide (hier Substanz 34) an TGase 2

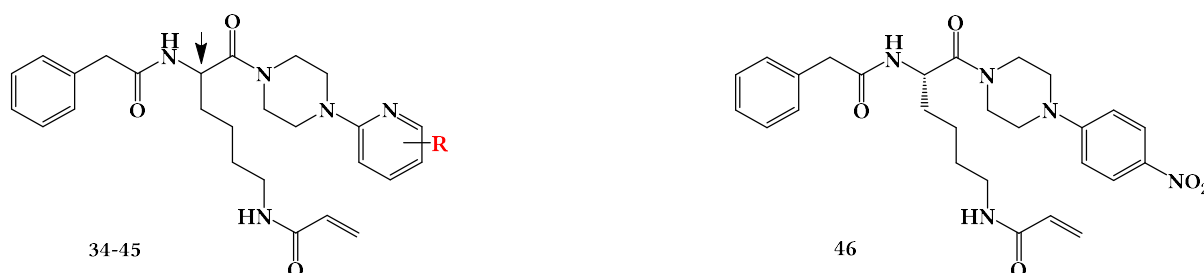
Der postulierte Reaktionsmechanismus der N^{ϵ} -Acryloyl-lysinpiperazide an TGase 2 ist der einer Michael-Addition der Acryloylgruppe an die Thiolgruppe des katalytischen Cys277 (161) (Abb. 44). Die Annahme, dass dieser Wirkmechanismus in einer irreversiblen Hemmung der Transamidaseaktivität der TGase 2 resultiert, konnte dadurch untermauert werden.

2.9. Charakterisierung der N^ε-Acryloyl-lysinpiperazide an gpTGase 2

Transglutaminase 2 ist, wie einleitend beschrieben, an vielfältigen und schwerwiegenden Erkrankungen beteiligt, was sie zu einer vielversprechenden Zielstruktur für die Entwicklung von Liganden macht. Im Vordergrund stehen dabei sowohl therapeutische als auch diagnostische Zielstellungen, die durch direkte Hemmung des Enzyms bzw. die Entwicklung bildgebender Verfahren unter Verwendung markierter Verbindungen erreicht werden könnten (221). Darüber hinaus könnten neu entwickelte Liganden, insbesondere Inhibitoren, wichtige Werkzeuge darstellen, die zur weiteren Aufklärung detaillierter Funktionen beitragen können.

Zu diesem Zweck wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Reik Löser (Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung) eine Substanzbibliothek mit 32 N^ε-Acryloyl-lysinpiperaziden entwickelt und charakterisiert. Diese Ergebnisse wurden im Jahr 2018 publiziert (214).

Tabelle 8 Strukturformeln der Verbindungen **34-45** (links) und **46** (rechts) sowie Übersicht über die IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten als Mittelwerte \pm SEM und Anzahl der Experimente, n , jeweils im Triplikat durchgeführt. Verbindung **35** ist, im Gegensatz zu den anderen Verbindungen in den Tabellen 8-11, an der markierten Position R -konfiguriert und stellt das Enantiomer von Verbindung **34** dar.



Verbindung	R	IC_{50} (nM)	n_H	n
34	6-CH ₃	250 \pm 24	1,43 \pm 0,12	10
35	6-CH ₃	785 \pm 121	1,42 \pm 0,29	4
36	H	238 \pm 39	1,28 \pm 0,09	8
37	6-F	137 \pm 19	1,39 \pm 0,30	3
38	6-Cl	116 \pm 24	1,33 \pm 0,09	6
39	6-Br	93,1 \pm 12,7	1,27 \pm 0,34	3
40	6-I	73,2 \pm 6,3	1,27 \pm 0,22	3
41	5-F	267 \pm 59	1,27 \pm 0,09	3
42	6-NO ₂	119 \pm 5	1,81 \pm 0,16	3
43	6-phenyl	153 \pm 10	1,48 \pm 0,08	3
44	6- <i>tert.</i> -butyl	167 \pm 14	1,17 \pm 0,04	3
45	6-(2-fluorethoxy)	246 \pm 26	1,39 \pm 0,23	3
46	-	122 \pm 6	1,49 \pm 0,08	2

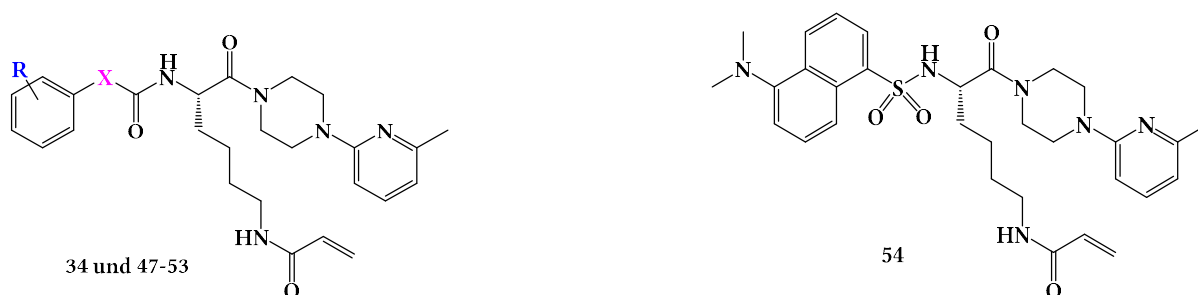
Die in Tabelle 8 aufgeführten Substanzen leiten sich direkt von Ausgangssubstanz **1** ab, die von Wityak *et al.* bereits 2012 beschrieben wurde (161). Diese Verbindung wurde aufgrund ihrer Selektivität zu TGase 2 gegenüber anderen TGase-Isoformen gewählt. Weitere Argumente, diese Verbindung als Leitstruktur zu verwenden waren ihre hohe Potenz sowie ihre hohe Plasmastabilität (18, 161). In einem ersten Schritt wurde die Konfiguration des chiralen Kohlenstoffatoms des Lysin-Grundgerüsts variiert. Verändert man die Konfiguration an dieser Stelle von S zu R (Substanz **44**), verringert sich die Hemmstärke um den Faktor 3. Die Verwendung eines S - (oder L -) Lysin-Grundgerüsts liefert also potentere Inhibitoren, weshalb diese Konfiguration für alle weiteren Substanzen gewählt wurde.

Die Modifikationen der Substanzen **36-45** gegenüber Verbindung **34** betreffen das Substitutionsmuster des Pyridinrestes. Wird die Methylgruppe aus **34** durch ein Wasserstoffatom ersetzt (**36**), verändert sich die Hemmstärke nicht signifikant. Die Substitution durch ein Halogenatom (**37-40**) an derselben Stelle zeigt eine Tendenz zu kleineren IC_{50} -Werten bei Substituenten mit größerem Atomradius. Eine Verschiebung des Substituenten von Position 6 zu Position 5 des Pyridins (Substanz **41** vs. **37**) wird weniger gut toleriert und bewirkt ein Absinken der Hemmstärke um den Faktor 2. Die Verwendung einer Nitrogruppe (**42**) führt zu einer Hemmstärke vergleichbar mit einem Chlorsubstituenten. Hydrophobe Substituenten wie eine Phenyl- (**43**) oder eine *tert.*-butyl-Gruppe (**44**) senken den IC_{50} -Wert in etwa auf das Niveau einer Fluorsubstitution.

Wird die substituierte Pyridingruppe gegen eine 4-Nitrophenylgruppe ersetzt (**46**), steigt die Hemmstärke gegenüber der Leitsubstanz um den Faktor 2.

Von Dr. Robert Wodtke wurden ausführliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen der hier erhobenen Daten durchgeführt und publiziert (214). Demnach korreliert die Größe des Substituenten an der untersuchten Position mit der Hemmstärke des Inhibitors, sodass größere Substituenten zu niedrigeren IC_{50} -Werten führen. Ein durch die Substitution veränderter pK_s -Wert des Pyridin-Stickstoffs hat dahingegen jedoch keinen Einfluss. Die vergrößerte Hemmstärke von Substanz **46** lässt sich dahingegen auf zusätzliche ionische Wechselwirkung bzw. durch die Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung der Nitrogruppe zurückführen.

Tabelle 9 Strukturformel der *N*-Acryloyl-lysinpiperazide **33**, **47-53** (links) und **54** (rechts) und Übersicht über die IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten als Mittelwerte \pm SEM und Anzahl der Experimente, *n*, jeweils im Triplikat durchgeführt.

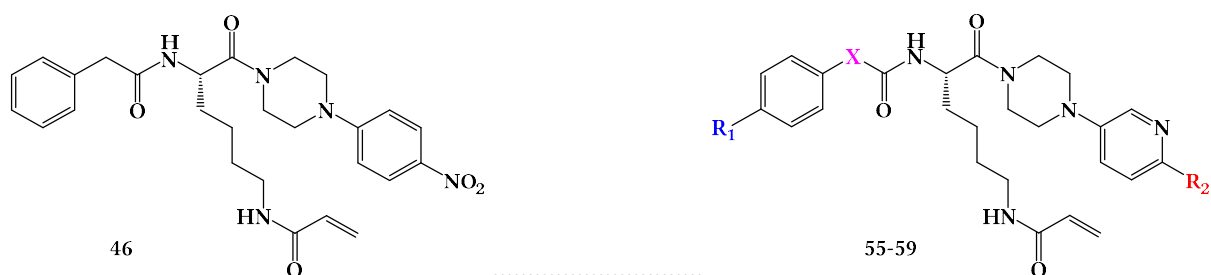


Verbindung	R	X	IC_{50} (nM)	n_H	n
34	H	CH ₂	250 \pm 24	1,43 \pm 0,12	10
47	4-CH ₃	CH ₂	71,0 \pm 17,4	1,19 \pm 0,10	4
48	4-F	CH ₂	193 \pm 20	1,54 \pm 0,10	8
49	4-Cl	CH ₂	147 \pm 28	1,40 \pm 0,09	3
50	4-Br	CH ₂	186 \pm 28	1,32 \pm 0,12	3
51	4-I	CH ₂	157 \pm 31	1,65 \pm 0,14	3
52	H	-	1352 \pm 393	1,28 \pm 0,35	4
53	4-F	-	290 \pm 30	1,32 \pm 0,27	3
54	3-I	-	392 \pm 42	1,27 \pm 0,30	3

Die zweite Gruppe untersuchter Substanzen betrifft Veränderungen in der Phenylacetylfunction (Tabelle 9). Eine Methylierung an Position 4 (Verbindung **47**) steigert die Hemmstärke gegenüber der Leitstruktur um den Faktor 4, während Halogensubstituenten (**49-52**) sie nur unwesentlich verändern. Darüber hinaus sind die halogensubstituierten Verbindungen untereinander nicht signifikant unterschiedlich.

Wird die Phenylacetylgruppe zu einer Benzoylgruppe verkleinert (**52** vs. **34**), reduziert sich die Hemmstärke um den Faktor 5. Zusätzliche Halogensubstitutionen (**53-54**) stellen sie dagegen teilweise wieder her.

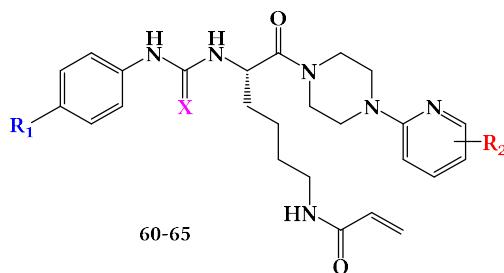
Tabelle 10 Strukturformel der *N*^F-Acryloyl-lysinpiperazide **46** (links) und **55-59** (rechts) und Übersicht über die IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten als Mittelwerte ± SEM und Anzahl der Experimente, *n*, jeweils im Triplikat durchgeführt.. Werte zu Verbindung **46** sind Tabelle 9 entnommen und zur Veranschaulichung hier ebenfalls aufgeführt



Verbindung	R ₁	X	R ₂	IC ₅₀ (nM)	<i>n</i> _H	<i>n</i>
46	-	-	-	122 ± 6	1,49 ± 0,08	2
55	H	NH	NO ₂	296 ± 48	1,32 ± 0,11	4
56	H	CH ₂	NO ₂	149 ± 14	1,18 ± 0,13	6
57	H	CH ₂	CF ₃	300 ± 48	1,67 ± 0,38	2
58	F	CH ₂	NO ₂	176 ± 11	1,10 ± 0,06	3
59	F	-	NO ₂	494 ± 37	1,63 ± 0,16	3

Die dritte Gruppe umfasst verschiedene Substanzen von denen immer je 2 Substanzen nur durch eine einzige Substitution voneinander verschieden sind (Tabelle 10). So zeigt sich, dass sich eine Veränderung der Phenylacetylgruppe (**56**) hin zu einer Phenylureidogruppe (**55**) um den Faktor 2 nachteilig auf die Hemmstärke auswirkt, was durch eine Rigidisierung der Struktur hervorgerufen werden könnte (214). Eine Substitution der Nitrogruppe (**56**) durch eine Trifluormethylgruppe (**57**) bewirkt eine ebensolche Abschwächung der Hemmstärke durch den Wegfall der zusätzlichen ionischen Wechselwirkung bzw. Wasserstoffbrückenbindung. Eine Fluorierung von Substanz **56** an Position 4 der Phenylacetylgruppe (**58**) bewirkt auf dieser Seite des Moleküls keine Verbesserung sondern eine leichte Verschlechterung der Hemmstärke. Eine Verkürzung der Phenylacetylgruppe um eine Methyleneinheit (**59** vs. **58**) zeigt jedoch auch hier eine Erhöhung des IC₅₀-Wertes um den Faktor 3.

Tabelle 11 Strukturformel der *N*^F-Acryloyl-lysinpiperazide **60-65** und Übersicht über die IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten als Mittelwerte ± SEM und Anzahl der Experimente, *n*, jeweils im Triplikat durchgeführt.



Verbindung	R ₁	X	R ₂	IC ₅₀ (nM)	n _H	n
60	H	O	5-F	607 ± 155	1,53 ± 0,24	4
61	H	O	6-F	270 ± 52	1,02 ± 0,05	3
62	H	O	6-CH ₃	399 ± 67	1,70 ± 0,29	3
63	H	S	6-CH ₃	1308 ± 37	1,29 ± 0,11	3
64	F	O	6-CH ₃	464 ± 67	1,49 ± 0,16	3
65	F	S	6-CH ₃	1851 ± 141	1,18 ± 0,07	4

Die letzte untersuchte Gruppe befasst sich mit Ureiden und Thioureiden an Stelle der Phenylacetylgruppe (Tabelle 11). Wie schon in der dritten Gruppe (Tabelle 10) beschrieben, reduziert sich bei dieser Veränderung die Hemmstärke etwa um den Faktor 2 (**60** vs. **41**, **61** vs. **37**, **62** vs. **34**, **64** vs. **48**). Darüber hinaus verschlechtert sie sich beim Übergang von Ureiden zu Thioureiden weiterhin etwa um den Faktor 3-4 (**63** vs. **62**, **65** vs. **64**). Diese insgesamt Verschlechterung der Hemmstärke scheint auch hier auf einer Rigidisierung des Moleküls zu beruhen (214).

Als positive Einflüsse auf die Hemmstärke gegenüber der Leitstruktur lassen sich folgende Punkte festhalten: eine Substitution der Pyridingruppe in *meta*-Stellung zum Piperazin mit hydrophoben Gruppen, Halogenatomen oder einer Nitrogruppe (ebenso in *para*-Stellung) sowie eine Substitution des Wasserstoffatoms der Phenylacetylgruppe in Position 4 durch eine Methylgruppe oder – weniger stark ausgeprägt – durch ein Halogenatom.

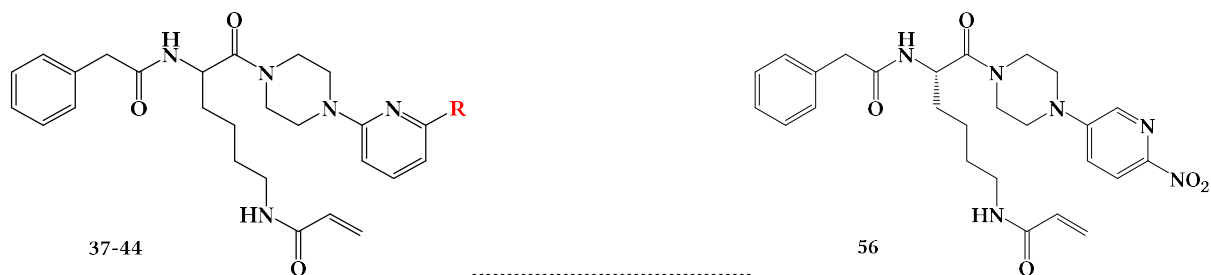
Als negative Einflüsse lassen sich zusammenfassen: eine *R*- (oder *D*-)Konformation des LysinGrundgerüsts; die Verkürzung der Phenylacetylgruppe zu einer Benzoylgruppe oder die Verwendung einer Ureido- oder Thioureidogruppe sowie die Substitution des Pyridins in *para*-Stellung zum Piperazin.

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten wurden teilweise von Frau Anna Wojtczak, Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jacek Jemielity an der Universität Warschau, Polen, im Rahmen eines zweimonatigen Forschungsaufenthaltes während ihrer Promotion, und Frau Serife Tümer, Studentin der Humanmedizin an der Universität zu Köln, im Rahmen eines dreiwöchigen Praktikums erhoben.

2.10. Charakterisierung ausgewählter Hemmstoffe an hTGase 2

Einige der an gpTGase 2 untersuchten neuen Hemmstoffe mit *N*^F-Acryloyllysin-piperazidmotiv wurden auch an hTGase 2 charakterisiert (Tabelle 12). Durch Voruntersuchungen stellte sich heraus, dass diese Hemmstoffklasse deutlich schneller mit der humanen Isoform des Enzyms reagiert als mit der Meerschweinchenisoform. Dieser Umstand drückt sich in deutlich kleineren IC₅₀-Werten im Bereich der vollständigen Enzymhemmung aus, die an hTGase 2 ermittelt werden konnten. Um dennoch die Hemmstärke der einzelnen Substanzen differenzieren zu können, wurde die Vorinkubationszeit von Enzym und Inhibitor von 30 min auf 5 min reduziert. Daher werden die so erhaltenen IC₅₀-Werte an hTGase 2 nicht direkt mit den entsprechenden Werten an gpTGase 2 verglichen.

Tabelle 12 Strukturformeln der an hTGase 2 untersuchten *N*-Acryloyl-lysinpiperazide und Übersicht über die IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten als Mittelwerte \pm SEM und Anzahl der Experimente, *n*, jeweils im Duplikat durchgeführt.



Verbindung	R	IC_{50} (nM)	n_H	n
37	F	108 ± 3	$1,20 \pm 0,21$	3
38	Cl	184 ± 16	$1,65 \pm 0,20$	3
39	Br	222 ± 41	$1,54 \pm 0,16$	3
40	I	138 ± 8	$1,77 \pm 0,09$	3
44	<i>tert.</i> -butyl	168 ± 6	$1,26 \pm 0,18$	3
56	-	$90,3 \pm 7,7$	$1,54 \pm 0,15$	3

Der Trend, dass sich die Hemmstärke gegenüber gpTGase 2 bei größer werdenden Halogensubstituenten (37-40) verbessert, lässt sich gegenüber hTGase 2 nicht bestätigen. Es scheint sich gegenteilig eine Abnahme der Hemmstärke beobachten zu lassen. Dieser Trend wird jedoch durch die Iodsubstitution durchbrochen. Eine *tert.*-butyl-Gruppe (44) an gleicher Stelle bringt jedoch auch beim humanen Enzym einen ähnlich starken Inhibitor hervor, wie ein Fluoratom. Die Nitrogruppe in Substanz 56 (bei formal um eine Stelle rotiertem Pyridin) liefert am humanen Enzym die größte Hemmstärke der untersuchten Substanzen. Es lässt sich zusammenfassen, dass alle getesteten Inhibitoren der gpTGase 2 ebenfalls hTGase 2 in großem Maße hemmen, ohne dabei jedoch den für gpTGase 2 beschriebenen Trends zu folgen. Die IC_{50} -Werte der untersuchten Substanzen sind war untereinander statistisch signifikant, jedoch liegen sie in einem sehr engen Bereich beieinander.

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten wurden teilweise von Frau Anna Wojtczak, Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jacek Jemielity an der Universität Warschau, Polen, im Rahmen eines zweimonatigen Forschungsaufenthaltes während ihrer Promotion erhoben.

2.11. Bestimmung der Selektivität ausgewählter Hemmstoffe gegenüber weiteren TGase-Isoformen

Zur Untersuchung der Selektivität der getesteten Substanzen gegenüber weiteren Vertretern der TGase-Enzymfamilie, wurden die Substanzen **34** und **56** stellvertretend für die *N*^ε-Acryloyl-lysinpiperazide getestet. Wie in Kapitel II.2.5. gezeigt, lässt sich der Transamidaseassay nicht nur auf TGase 2 sondern auch auf die TGasen 1, 3, 6 und FXIIIa anwenden. Dazu wurden 2 µg/mL (TGase 1) oder 5 µg/mL (alle anderen TGasen) Enzym, 0,81 µM R-I-Cad, 30 µM DMC sowie Inhibitorkonzentrationen im Bereich 0,3-30000 nM verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Aktivitäten, die für die ungehemmten Enzymreaktionen gemessen wurden, erfolgte eine Normierung der gemessenen Aktivitäten (v) auf jene des entsprechenden ungehemmten Enzyms (v_0) (Abb. 45). Die Präinkubation in diesem Versuchsaufbau betrug 30 min.

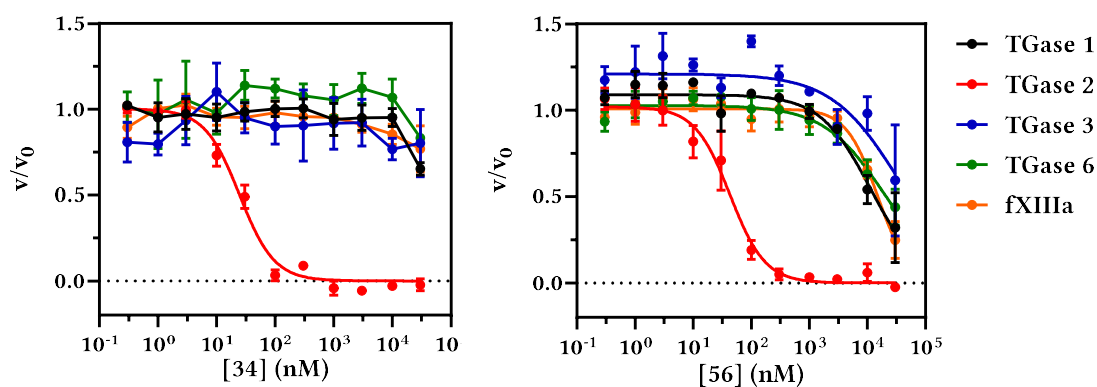


Abb. 45 Hemmung der humanen TGasen 1, 2, 3, 9 und FXIIIa durch die Inhibitoren **34** und **56**. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten im Triplikate.

Erwartungsgemäß zeigte sich für beide Substanzen an TGase 2 eine dosisabhängige Inhibition (Abb. 45, Tabelle 12). Die so erhaltenen IC_{50} -Werte entsprechen der halben eingesetzten Enzymkonzentration, was auf eine vollständige Hemmung des Enzyms hinweist. Substanz **34** rief im gemessenen Konzentrationsbereich keine Hemmung der anderen TGase-Isoformen hervor und bestätigt so die von Wityak *et al.* demonstrierte Selektivität (vgl. Tabelle 1) (161). Substanz **56** zeigt dahingegen eine dosisabhängige Hemmung aller untersuchten TGasen. Um aussagekräftige sigmoidale Hemmkurven für die anderen TGase-Isoformen zu erhalten, wurde hier – anders als in anderen Experimenten – das untere Plateau auf einen Wert von 0 festgelegt.

Tabelle 13 Übersicht über die IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten im Duplikat (hTGase 2 und 3) oder Triplikat.

Enzym	IC ₅₀ (nM)	n _H
hTGase 1	8990 ± 1180	1,32 ± 0,15
hTGase 2	49,8 ± 23,1	2,00 ± 0,83
hTGase 3	32800 ± 6600	0,72 ± 0,25
hTGase 6	19500 ± 1300	1,01 ± 0,22
hFXIIIa	17500 ± 5600	1,64 ± 0,26

Die für Substanz **56** im Vergleich zu Substanz **34** beobachtete größere Hemmstärke gegenüber TGase 2 schlägt sich also auch in einer stärkeren Hemmung weiterer TGase-Isoformen nieder. Dabei liegen die erhaltenen IC₅₀-Werte jedoch um den Faktor 250 bis 750 über dem für TGase 2. Diese Werte sollten jedoch nicht als Selektivitätsfaktoren interpretiert werden, da die gewählte Prä-Inkubation von 30 min zu einer vollständigen Hemmung und somit zur Erreichung des niedrigstmöglichen IC₅₀-Wertes an TGase 2 führt. Diese für irreversible Hemmstoffe relevante Limitation begründet somit auch die Diskrepanz der gefundenen Selektivitätsfaktoren bisher untersuchter N^ε-Acryloyl-lysinpiperazide (138, 159–161)

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten wurden teilweise von Frau Renata Kasprzyk, Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jacek Jemielity an der Universität Warschau, Polen, im Rahmen eines zweimonatigen Forschungsaufenthaltes während ihrer Promotion erhoben.

2.12. Weitere Anwendungen des neuen Assays

Das kontinuierliche und homogene Design des beschriebenen Assays sowie die erreichte Minimierung der Hintergrundsignale ermöglichen die Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration in einer TGase 2-Proteinprobe und tragen dazu bei, dass der beschriebene Assay die formalen Voraussetzungen zur Verwendung in einem Hochdurchsatzverfahren erfüllt.

Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration

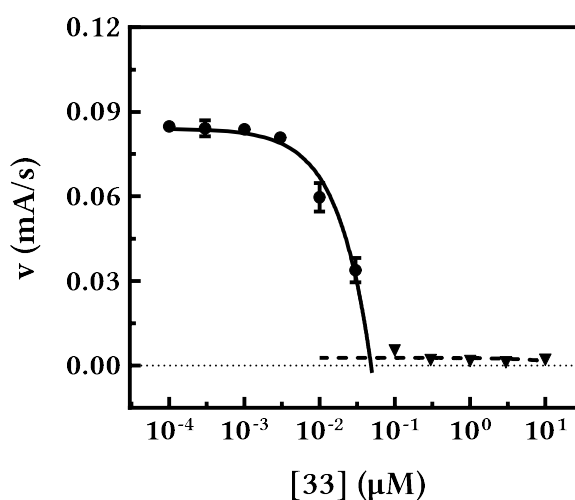


Abb. 46 Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration von gpTGase 2 durch die Hemmung mit **33**. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten im Duplikat. Die Linien stellen lineare Regressionen der Werte unterhalb (durchgezogen) und oberhalb (gestrichelt) der theoretischen totalen Enzymkonzentration dar. Die Fehlerbalken sind teilweise kleiner als die Datenpunkte (aus (210))

Der Transamidaseassay ermöglicht eine indirekte Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration in einer TGase 2-Proteinprobe, beispielsweise nach rekombinanter Expression und Aufreinigung des Enzyms. Die Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration, E_{akt} , erfolgte durch Alkylierung der aktiven Cysteine in gpTGase 2 mit verschiedenen Konzentrationen an Iodacetamid (**33**), das bekanntermaßen TGase 2 in äquimolarer Weise hemmt (188, 222).

Zu diesem Zweck wurde zunächst unter der Annahme, dass in der verwendeten Probe ausschließlich gpTGase 2 enthalten war, die theoretische totale Enzymkonzentration berechnet, was einen Wert von $E_{\text{tot}} = 65,3 \text{ nM}$ ergab ($M_r = 76,6 \text{ kDa}$ nach Angaben des Herstellers). Im Anschluss wurde ein regulärer Hemmversuch mit Iodacetamid als Inhibitor in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10000 nM durchgeführt (Abb. 46). Die gemessenen Enzymaktivitäten von Iodacetamid-Konzentrationen, die kleiner bzw. größer als

die theoretische E_{tot} waren, wurden separaten linearen Regressionen unterworfen und der Schnittpunkt beider Geraden anhand Gl. 7 ermittelt.

$$x = (n_2 - n_1) / (m_1 - m_2) \quad (7)$$

$m = \text{Steigung}$

$n = \text{Ordinatenabschnitt}$

Wird am Schnittpunkt beider Geraden ein Lot auf die Abszisse gefällt, entspricht der so erhaltene Wert der aktiven Enzymkonzentration und ergab in diesem Fall einen Wert von $E_{\text{akt}} = 47,9 \pm 8,5 \text{ nM}$ oder $73,4 \pm 13,0 \%$. Dieser Wert ist nicht signifikant unterschiedlich zu Aktivitätsdaten (80,6 %), die auf der Basis des Hydroxamatassays (223) ermittelt und vom Hersteller bereit gestellt wurden (Einstichproben-*t*-Test).

Die vorgestellte Methode zur Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration von TGase 2 ist schnell und einfach anzuwenden und erfordert im Gegensatz zu direkten radioaktiven Methoden (188) keine Reaktionstermination, Waschschrte oder Abtrennung von nicht gebundenem radioaktivem Material. Die direkten und indirekten nicht-radioaktiven Ansätze zur Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration, die von Folk und Gross beschrieben wurden (224, 225), verwenden die Inhibitoren α -Brom-4-hydroxy-3-nitroacetophenon (BHNA) bzw. *N*-(2-hydroxy-5-nitrophenylacetyl)-L-2-amino-4-oxo-5-chlorpentansäuremethylester (L-PACK) in einem spektrophotometrischen Assay mit dem Substrat Nitrophenylpivalat. Hierfür wurden jedoch Enzymkonzentrationen im zweistellig mikromolaren Bereich benötigt, die etwa drei Größenordnungen über der beim Transamidaseassay verwendeten Enzymmenge liegen.

Eignung des Assays zur Verwendung in einem Hochdurchsatzverfahren

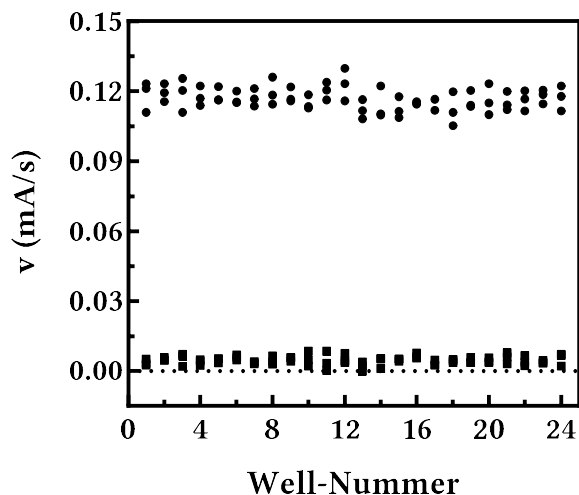


Abb. 47 Bestimmung des Z' -Faktor in Anwesenheit von 3 mM CaCl_2 durch Messung der Änderung der Fluoreszenzanisotropie pro Zeiteinheit in Anwesenheit (Quadrate) und Abwesenheit (Punkte) von 10 μM **33** (aus (210))

Zur Überprüfung, ob der Transamidaseassay sich zur Verwendung in einem Hochdurchsatzverfahren (*engl.* high-throughput screening, HTS), wurde der Z' -Faktor des Assays ermittelt (226). Dieser Faktor dient als Maßzahl für die Assay-Qualität sowie die „Reproduzierbarkeit und Trefferidentifikation“ (226). Dazu wurde die Enzymaktivität von rekombinanter gpTGase 2 in Anwesenheit (Quadrate) und Abwesenheit (Punkte) von 10 μM **33**, was zu einer vollständigen Enzymhemmung führt, in drei unabhängigen Experimenten mit 23-24 Messpunkten pro Ansatz und Experiment bestimmt (Abb. 47).

Der Z' -Faktor wurde anhand Gl. 8 kalkuliert, wobei der erhaltene Wert von $0,86 \pm 0,01$ laut Zhang *et al.* für einen „exzellenten Assay“ spricht (226).

$$Z' = 1 - \frac{(3 * SD_{Akt_-} + 3 * SD_{Akt_+})}{|mean_{Akt_-} - mean_{Akt_+}|} \quad (8)$$

SD = Standardabweichung

$mean$ = Mittelwert

Akt_+ = Aktivität in Anwesenheit von Inhibitor

Akt_- = Aktivität in Abwesenheit von Inhibitor

Der erhaltene Z' -Faktor von 0,86 fügt sich in die Bandbreite üblicherweise für FA-Assays gefundener Z' -Faktoren von 0,7 bis 0,9 ein (174, 203). Auch der Fluoreszenzassay von Case *et al.*, sowie der kolorimetrische Assay von Perez Alea *et al.* liefern Z' -Faktoren ähnlicher Größe (198, 227).

Durch Zugabe von 0,5 mM statt 3 mM CaCl_2 reduziert sich der ermittelte Z' -Wert von $0,86 \pm 0,01$ signifikant (Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben) auf $0,56 \pm 0,05$ (Abb. 48). Das ist bei ansonsten gleichbleibenden Assaybedingungen auf die langsamere Umsetzung der Substrate pro Zeiteinheit bei erniedrigten Ca^{2+} -konzentrationen, wie in Kapitel II.2.5. bereits beschrieben, zurückzuführen (vgl. Abb. 40).

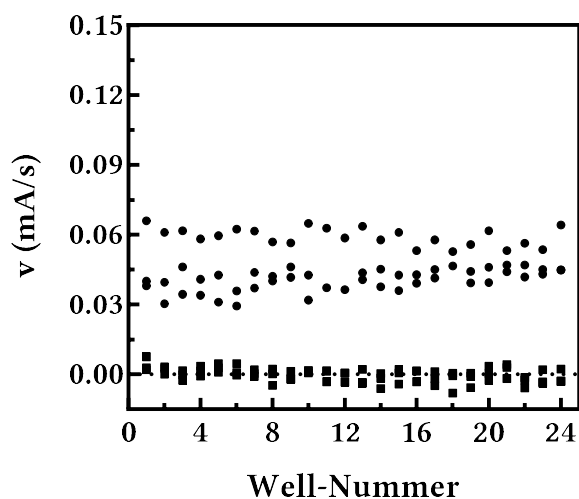


Abb. 48 Bestimmung des Z' -Faktor in Anwesenheit von 0,5 mM CaCl_2 durch Messung der Änderung der Fluoreszenzanisotropie pro Zeiteinheit in Anwesenheit (Quadrate) und Abwesenheit (Punkte) von $10 \mu\text{M}$ **33**.

Die hier verwendeten Daten wurden teilweise von Steffen Honrath, Student der Pharmazie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, im Rahmen eines freiwilligen Praktikums erhoben.

3. Assays zur Quantifizierung der GTP-Bindungsaktivität von TGase 2

Während die katalytische Aktivität von TGase 2 bereits seit den 1960er Jahren bekannt ist, erfolgte die Entdeckung der GTP-Bindung erst in den frühen 1990er Jahren. Sie geht darauf zurück, dass das erstmals 1990 beschriebene $G\alpha_h$ -Protein (228) als mit TGase 2 identisch beschrieben wurde (24). Bereits Ende der 1980er Jahre wurde erstmals eine Hemmung von TGase 2 durch GTP sowie eine Hydrolyse von GTP beschrieben (229, 230). Während für die GTP-Bindung eine Ca^{2+} -Abhängigkeit im Sinne einer negativen Regulierung beobachtet werden konnte (215), wurde für die GTPase-Funktion Mg^{2+} als Cofaktor identifiziert (137, 179). Gegenüber der Transamidasefunktion ist die GTP-Bindungsfunktion nach wie vor verhältnismäßig wenig beforscht, was sich z. T. auch auf fehlende Assaymethoden zurückführen lässt. Die meisten der in der Literatur beschriebenen Studien verwendeten radioaktive Messungen zur Bestimmung von Bindung und/oder Hydrolyse von Guanosin-Nukleotiden. Wie bereits dargelegt, haben radioaktive Assayverfahren zwar eine hohe Sensitivität aber auch praktische Nachteile in Form von Waschschrritten sowie räumlichen und personellen Anforderungen (vgl. Einleitung Kapitel II.2.). Darüber hinaus wurde die GTPase-Aktivität durch das bei der Hydrolyse von GTP freigesetzte Phosphat quantifiziert (231), das bei Zugabe von Malachitgrün und Natriummolybdat zu einer konzentrationsabhängigen Grünfärbung führt.

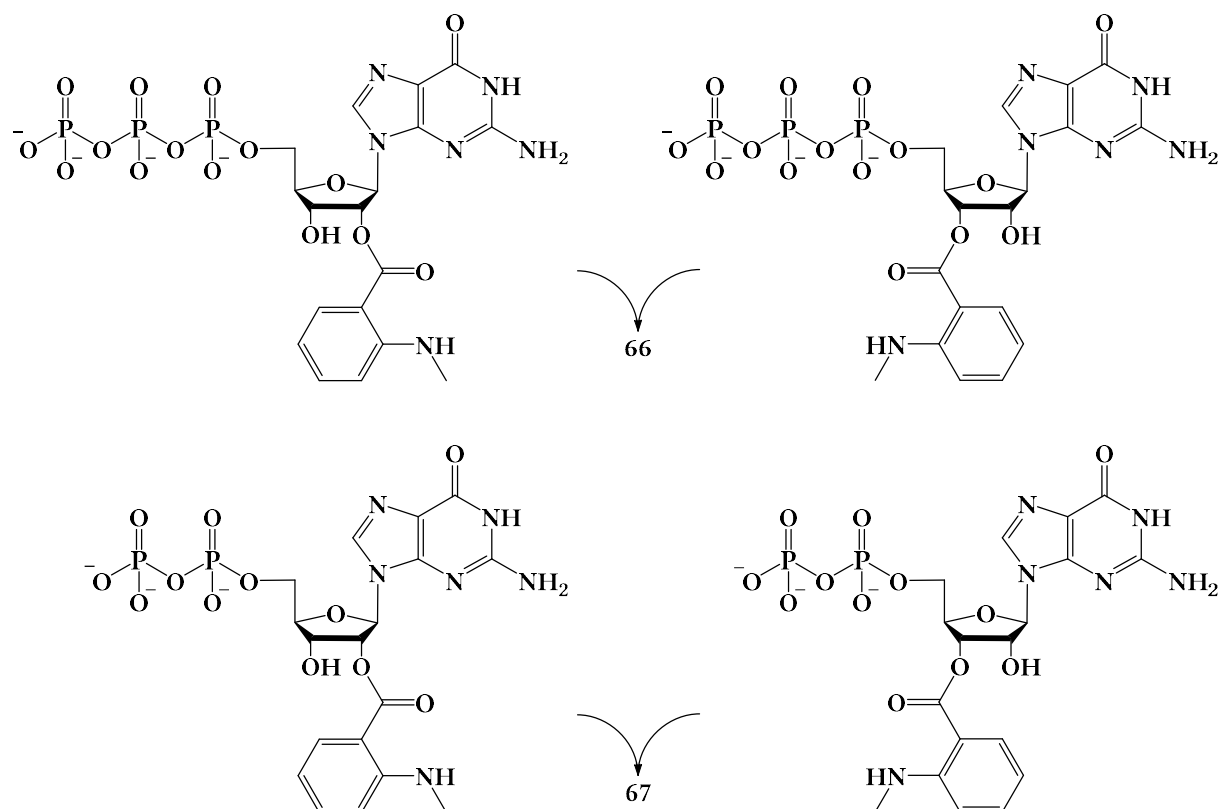


Abb. 49 Die fluoreszierenden TGase2-Liganden mantGTP (66) und mantGDP (67) aus (232).

Im Jahr 2000 wurde erstmals ein spektrophotometrisches Verfahren zur Bindung von GTP und Analogenen an TGase 2 vorgestellt (232). Als fluoreszierender Ligand wurden mantGTP (**66**) und mantGDP (**67**), Mischungen aus 2' und 3'-*O*-(*N*-Methylantraniloyl)-guanosin-5'-triphosphat bzw. -diphosphat (Abb. 49) verwendet. Dabei konnte eine Fluoreszenzverstärkung um den Faktor von etwa 1,23 im Zuge der Bindung an TGase 2 gemessen werden, die bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von 360 nm bzw. 440 nm erreicht wurden. Ein ähnlicher Fluoreszenzverstärkungsfaktor wurde für die Verwendung von mantGTP bei der Bindung an lösliche Guanylatcyclase beschrieben (233). Dieser lag, abhängig von der Enzymkonzentration, zwischen 1,10 und 1,63 und damit für einen Fluoreszenzassay im niedrigen Bereich (234). Darüber hinaus wurde äquimolar zu dem fluoreszierenden Liganden $MgCl_2$ zugegeben. Eine Hydrolyse des Liganden wurde dabei experimentell nicht ausgeschlossen, obwohl TGase 2 in Anwesenheit von Mg^{2+} zur Hydrolyse von GTP fähig ist (137). In einem modifizierten Verfahren wurde die Verdrängung der beiden Liganden mantGTP und mantGDP durch $GTP\gamma S$, GDP und GMP mittels Veränderung der Fluoreszenzanisotropie gemessen, diese jedoch nicht quantifiziert (48).

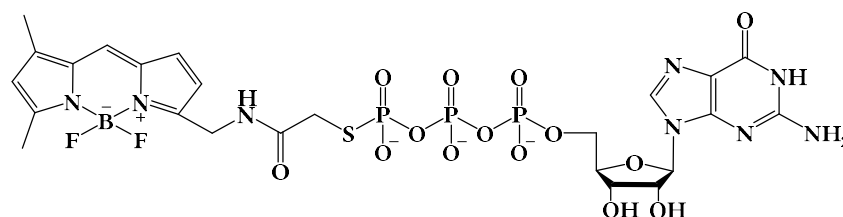


Abb. 50 Der fluoreszierende TGase2-Ligand BODIPY[®] FL-GTP γ S (**68**) aus (58).

Einen weiteren Fluoreszenz-Assay stellten Datta und Kollegen 2006 vor, in dem sie die Bindung von BODIPY[®] FL-GTP γ S (**68**, Abb. 50) an TGase 2 bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von 504 nm bzw. 520 nm verfolgten (58). Zur Quantifizierung der GTPase-Aktivität kam ein radioaktiver Assay mit dem Substrat [$\gamma^{32}P$]GTP zum Einsatz. Der Ligand **68** wurde später von Schaertl *et al.* verwendet, um die Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die GTP-Bindung an TGase 2 zu untersuchen (138).

BODIPY[®] FL-GTP γ S kann als eine Weiterentwicklung des Liganden mantGTP in Hinblick auf Hydrolysebeständigkeit und Emissionsspektrum angesehen werden, da es ein Derivat des nichthydrolysierbaren GTP γ S ist und die höhere Emissionswellenlänge die Anfälligkeit für optische Interferenzen verringert (199, 235). Die Fluoreszenzverstärkung von BODIPY[®] FL-GTP γ S beruht auf einem internen Quenching, das sich durch π -Stacking des Guanosin- und BODIPY-Restes ergibt (236) und das durch die Proteinbindung aufgehoben wird. Das macht BODIPY[®] FL-GTP γ S zu einem geeigneten Liganden für Fluoreszenz-Assays, ermöglicht aber

durch den gewählten Wellenlängenbereich auch eine Beeinflussung durch aromatische Verbindungen in einem eventuellen Inhibitor-Screening (199).

3.1. Etablierung eines neuen Fluoreszenzanisotropie-basierten GTP-Bindungsassays

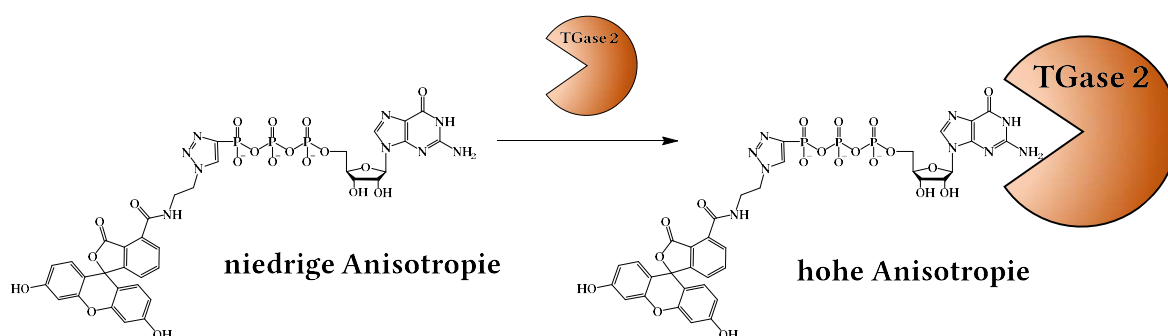


Abb. 51 Reaktionsschema des GTP-Bindungsassays. Die Bindung der fluoreszenzmarkierten Sonde **71** an die GTP-Bindungsstelle von hTGase 2 führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzanisotropie (vgl. Abb. 15)

Der hier neuentwickelte Assay verfolgt den Anstieg der Fluoreszenzanisotropie im Verlauf der Bindung eines fluoreszierenden Liganden an hTGase2. Dazu wurde die Sonde **68**, da kommerziell verfügbar, als fluoreszierender Ligand in einer Proof-of-Concept-Studie verwendet. Nach Etablierung des Assays wurde eine Reihe von Fluorescein-markierten GDP- und GTP-Analoga (Sonden **69-78**, Tabelle 14) in Hinblick auf ihre Bindungsaffinität an TGase 2 hin charakterisiert. Diese Sonden wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jacek Jemielity (Center of New Technologies, Universität Warschau) zur Verfügung gestellt. Ein schematischer Reaktionsmechanismus mit der später verwendeten Sonde **71** ist in Abb. 51 dargestellt. Da die Technik der Fluoreszenzanisotropie auf dem Grundsatz fußt, dass sich die Fluoreszenzintensität im Verlauf der Reaktion nicht ändert, wurde nach Sonden gesucht, die einen geringeren Fluoreszenzverstärkungsfaktor als **68** (idealerweise 1) (237, 238) sowie eine höhere Bindungsaffinität zu hTGase2 aufweisen.

3.2. Charakterisierung der fluoreszierenden GDP- und GTP-Analoga

Um optimale Assaybedingungen für Sondencharakterisierung und spätere Verdrängungsexperimente mit nicht-fluoreszierenden Liganden zu erreichen, sollten folgende zwei Bedingungen erfüllt sein: eingesetzte Proteinkonzentration/erwarteter K_D -Wert der Sonde ≥ 1 und Konzentration der Sonde/erwarteter K_D -Wert der Sonde $\leq 0,1$. Unter diesen Bedingungen wird mindestens 50% des maximalen Anisotropieanstieges erreicht und einer Depletion von zur Bindung zur Verfügung stehenden Proteins vorgebeugt. (199, 239). Anhand des Literaturwertes von 400 nM für **68** (240) sollte die TGase 2-Konzentration demnach mindestens 400 nM und die Ligandkonzentration höchstens 40 nM betragen. Um den Proteinverbrauch gering zu halten und in der Erwartung im Vergleich zu **68** affinere Sonden zu entwickeln, wurden die fluoreszierenden Sonden bei einer Konzentration von 50 nM an 0,1-1000 nM hTGase 2 charakterisiert. Dabei wurden, in Anlehnung an die in der Literatur verwendeten Präinkubationszeiten von 0 Minuten bei Datta *et al.* (58) und 60 Minuten bei Schaertl *et al.* (138), Datenpunkte zu den Zeitpunkten 0, 30 und 60 Minuten nach Reaktionsbeginn erfasst, jedoch nur für 60 Minuten diskutiert, da die anschließenden Verdrängungsexperimente analog zu Schaertl *et al.* ebenfalls mit 60 Minuten Präinkubation durchgeführt wurden. Darüber hinaus wurden vergleichbare Zeiträume zur Gleichgewichtseinstellung von **68** an verschiedenen $G\alpha$ -Proteinen beschrieben (236).

Die Verwendung dieser Zeitpunkte ist auf den konservativen Ansatz zurückzuführen, der Equilibrierung ausreichend Zeit einzuräumen. Eine nachträgliche Auswertung der Sondencharakterisierung nach 0 und 30 Minuten sowie der Befund von Murthy *et al.*, dass TGase 2 einen schnellen Austausch von GDP zu GTP aufweist (232), lassen vermuten, dass das Bindungsgleichgewicht doch schon früher eingestellt sein könnte, die Werte nach 0 Minuten eher zutreffen könnten und die Veränderungen zu den 60-Minuten-Werten auf Stabilitätsprobleme von TGase 2 oder den untersuchten Sonden zurückzuführen sein könnten.

Die erhaltenen FA-Werte wurden gegen die Enzymkonzentration, E, aufgetragen und einer nichtlinearen Regression gemäß Gl. 9 unterworfen, um die Dissoziationskonstante, K_D , sowie die FA-Werte für vollständig gebundenen, A_b , und vollständig freien, A_f , Liganden zu erhalten.

$$A = A_f + (A_b - A_f) * \frac{(E + LT + K_D) - \sqrt{(E + LT + K_D)^2 - (4 * E * LT)}}{2 * LT} \quad (9)$$

$LT = \text{Konzentration des eingesetzten Liganden}$

Diese Gleichung berücksichtigt die Konzentration des eingesetzten Liganden, da der beobachtete Anisotropieanstieg im Vergleich zum maximal möglichen Anisotropieanstieg von der Ligandkonzentration abhängig ist (199).

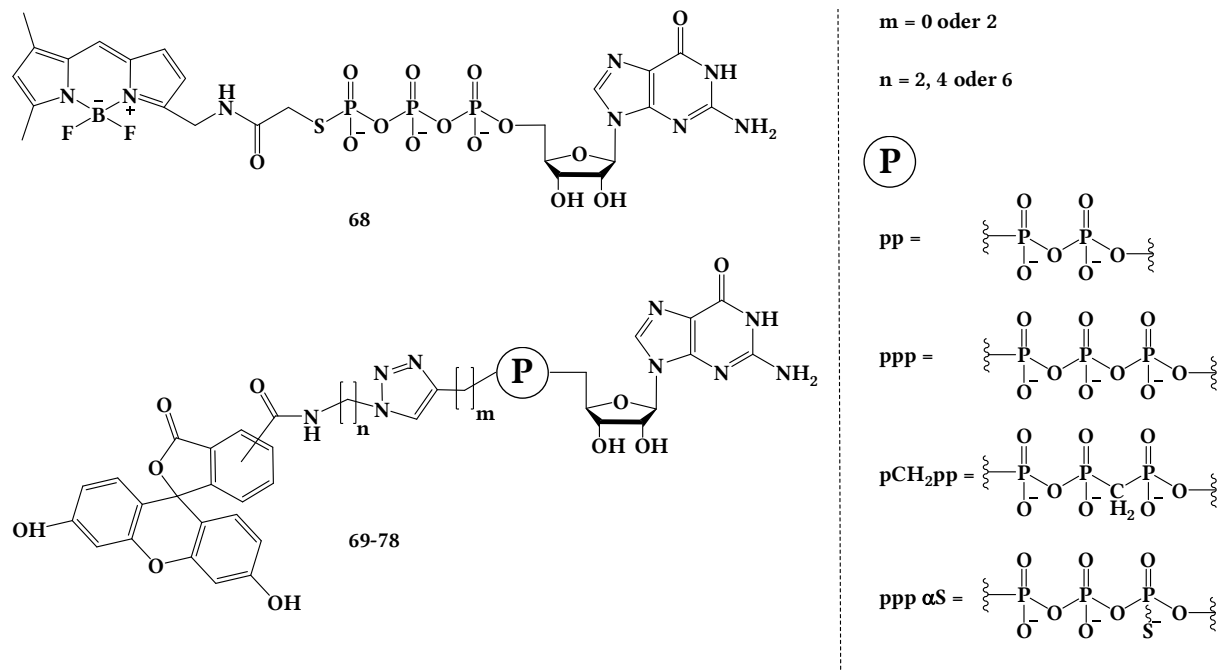
Darüber hinaus setzt die Methode der Fluoreszenzanisotropie voraus, dass sich die Fluoreszenzintensität der Sonde im freien und gebundenen Zustand nicht signifikant voneinander unterscheiden (199, 238). Bei der Charakterisierung der Sonden fiel jedoch auf, dass bei Bindung an TGase 2 in einigen Fällen ein solcher Unterschied, d.h. eine Fluoreszenzverstärkung oder -verminderung, auftrat. Diese Veränderungen sind möglicherweise auf ein Quenching in Folge einer Interaktion mit Tryptophanresten des Proteins oder aufgrund der hydrophoberen und viskoserer Umgebung der Proteinoberfläche zurückzuführen (241). In diesen Fällen wurde die Anisotropie gemäß Gl. 10 korrigiert (237). Dafür wurde analog zu den Parametern A_f und A_b die Parameter Q_f (Fluoreszenz des vollständig freien Liganden) und Q_b (Fluoreszenz des vollständig gebundenen Liganden) gemäß Gl. 9 ermittelt.

$$A_{corr} = \frac{\left(\frac{A - A_f}{A_b - A} * \frac{Q_b}{Q_f} * A_b\right) + A_f}{1 + \frac{A - A_f}{(A_b - A) * \frac{Q_b}{Q_f}}} \quad (10)$$

Die erhaltene korrigierte Anisotropie, A_{corr} , wurde gegen die Enzymkonzentration aufgetragen und ebenfalls einer nichtlinearen Regression gemäß Gl. 9 unterworfen, um den K_D -Wert zu ermitteln.

Die erhaltenen Werte für A_f , A_b sowie der g-Faktor, der sich durch $g = Q_b/Q_f$ berechnet, der einzelnen Messungen zur Sondencharakterisierung wurden gemittelt und bei den folgenden Verdrängungsversuchen zur Korrektur der Anisotropie gemäß Gl. 10 verwendet. Diese Ermittlung erfolgte für jede Sonde und für jeden der drei untersuchten Zeitpunkte.

Tabelle 14 Übersicht der Strukturen (m und n = Anzahl der Methylengruppen in den beiden Linkern, CF = Carboxyfluorescein in 5- oder 6-Position) der fluoreszenzmarkierten Sonden **68-78**, die als Liganden für die GTP-Bindung an hTGase 2 untersucht wurden.



	(P)	m	n	5-/6-CF
68	-	-	-	-
69	pp	0	2	5
70	pp	2	2	5
71	ppp	0	2	5
72	ppp	2	2	5
73	pCH ₂ pp	0	2	5
74	ppp	0	4	5
75	ppp	0	6	5
76	ppp	0	6	6
77	ppp αS D1	0	2	5
78	ppp αS D2	0	2	5

Für die Probe **68** wurde ein Fluoreszenzverstärkungsfaktor, g , von 4,69 bestimmt, was die Eignung für Fluoreszenz-basierte Assays, wie jenen von Datta *et al.* (58), erklärt. Eine Sonde für einen FA-basierten Assay sollte jedoch idealerweise einen g -Faktor von 1 aufweisen, um die zuvor beschriebene Korrektur der experimentell ermittelten Anisotropiewerte zu umgehen (237). Die Dissoziationskonstante von **68** (ca. 1000 nM) ist um den Faktor 2,5 größer (Einstichproben- t -Test, $P = 0,0394$) als der von Datta *et al.* erhaltenen K_D -Wert von 400 nM (240). Eine solche Bindungsaffinität würde allerdings den Einsatz von ca. 2000 bis 3000 nM hTGase 2 bei Inhibitionsstudien erfordern. Die maßgeblichen Verbesserungen sind also in einer Verkleinerung des g -Faktors und des K_D -Wertes der Sonde zu suchen. Die ermittelten kinetischen Parameter sind in Tabelle 15 dargestellt. Die Auswirkung der Präinkubationsdauer auf das Bindungsverhalten ist für **71** exemplarisch in Abb. 52 abgebildet.

Tabelle 15 Übersicht der Bindungsparameter (K_D = Dissoziationskonstante, g = Fluoreszenzverstärkungsfaktor) der untersuchten fluoreszenzmarkierten Sonden. Alle Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM und Anzahl der Experimente, n

	K_D (nM)			g			n
	0 min	30 min	60 min	0 min	30 min	60 min	
68	157 \pm 43	906 \pm 316	999 \pm 216	4,08 \pm 0,33	3,87 \pm 0,21	4,69 \pm 0,41	6
69	259 \pm 61	2263 \pm 330	7618 \pm 4668	1	1	1	3
70	475 \pm 88	488 \pm 204	1474 \pm 1769	0,80 \pm 0,03	0,76 \pm 0,02	0,77 \pm 0,02	3
71	99 \pm 18	188 \pm 46	182 \pm 73	1,75 \pm 0,22	1,58 \pm 0,19	1,46 \pm 0,18	9
72	193 \pm 99	342 \pm 86	551 \pm 166	1	1	1	4
73	184 \pm 196	422 \pm 38	509 \pm 42	1	1	1	3
74	108 \pm 2	369 \pm 28	522 \pm 110	1	1	1	3
75	153 \pm 43	261 \pm 27	473 \pm 76	1	1	1	3
76	220 \pm 58	238 \pm 48	471 \pm 85	1	1	1	3
77	168 \pm 33	249 \pm 34	365 \pm 54	2,35 \pm 0,20	2,13 \pm 0,22	2,22 \pm 0,35	3
78	207 \pm 57	429 \pm 147	255 \pm 113	1,95 \pm 0,23	1,69 \pm 0,19	1,09 \pm 0,72	3

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten wurden teilweise von Frau Renata Kasprzyk, Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jacek Jemielity an der Universität Warschau, Polen, im Rahmen eines zweimonatigen Forschungsaufenthaltes während ihrer Promotion erhoben.

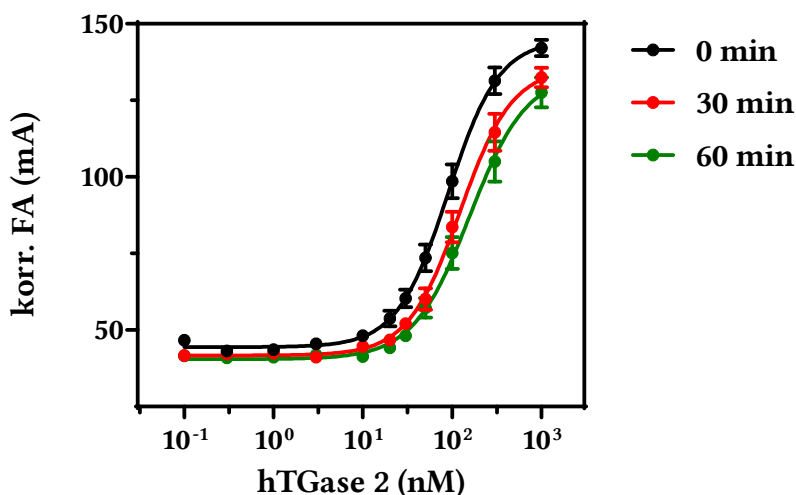


Abb. 52 Bestimmung der Dissoziationskonstanten, K_D , von **71** an hTGase 2 nach 0, 30 und 60 min Präinkubation. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus 9 unabhängigen Experimenten.

Innerhalb der Serie der neusynthetisierten Sonden lassen sich einige Struktur-Wirkungs-Beziehungen ausmachen: GTP-Analoga (**71** und **72**) haben eine höhere Bindungsaffinität zu TGase 2 als ihre korrespondierenden GDP-Analoga (**69** und **70**). So bindet die Sonde **71** um den Faktor 42 besser an TGase 2 als Sonde **69**, Sonde **72** um den Faktor 3 besser als Sonde **70**. Diese Ergebnisse werden dadurch gestützt, dass in der Literatur für GTP niedrigere K_D - bzw. IC_{50} -Werte als für GDP angegeben werden (58, 138).

Wird ein Ethylen-Linker zwischen die Phosphat-Gruppen und den Triazolring eingeführt (**70** und **72**), hat dies einen negativen Einfluss auf die Bindungsaffinität. So bindet **71** um den Faktor 3 stärker als **72**. Bei den Verbindungen **69** und **70** findet sich dieser Zusammenhang wegen eines großen Standardfehlers für **69** so nicht wieder.

Wird der Alkyl-Linker zwischen dem Triazolring und dem Fluorescein von 2 CH_2 -Gruppen (**71**) auf 4 bzw. 6 CH_2 -Gruppen verlängert (**74** bzw. **75**), verringert sich die Bindungsaffinität beider Verbindungen um den Faktor 3 gegenüber **71**. Wird das Sauerstoff-Atom zwischen dem α und dem β Phosphor-Atom gegen eine Methylen-Gruppe ersetzt (**73**), verringert dies die Bindungsaffinität um den Faktor 3 (**73** vs. **71**). Wird ein Sauerstoffatom in der α Phosphat-

Gruppe durch ein Schwefelatom ersetzt (77-78), senkt das die Bindungsaffinität etwa um den Faktor 2 gegenüber 71.

Für den Fluoreszenzverstärkungsfaktor lassen sich keine klaren Struktur-Wirkungs-Beziehungen bestimmen. Alle neu entwickelten Sonden zeigen jedoch einen deutlich niedrigeren g -Faktor als die Sonde 68. Ein möglicher Zusammenhang zeigt sich bei der Verlängerung des Alkyl-Linkers (71 vs. 74 und 75), welche zu einer Abnahme des g -Faktors von 1,46 auf 1 führt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Fluoreszenzverstärkung durch eine Annäherung an die Proteinoberfläche zustande kommt und diese Annäherung durch den verlängerten Linker zwischen Triazolring und Fluorescein verhindert wird (232). Insbesondere eine Annäherung des Farbstoffs an das Indolringsystem von Tryptophanresten im Protein kann zu einer Beeinflussung von Extinktion und Emission beitragen (242).

Aufgrund dieser Erkenntnisse, und dem großen Einfluss eines niedrigeren K_D -Wertes auf die verwendete Proteinmenge wurden alle weiteren Untersuchungen mit der Sonde 71 durchgeführt. Die mathematische Korrektur der erhaltenen Anisotropiewerte erfolgte wie bereits beschrieben gemäß Gl. 10.

3.3. Einfluss von $MgCl_2$ auf das Bindungsverhalten ausgewählter Sonden an hTGase 2

Den meisten literaturbekanntesten GTP-Bindungsassays wird $MgCl_2$ zugesetzt, da es essentiell für eine agonistische Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist (243, 244) und einen positiven Einfluss auf einfache Bindungsereignisse zeigt (245). Daher wurde die Bindungsaffinität der Sonden 68 und 71 zusätzlich in Anwesenheit von 10 mM $MgCl_2$ untersucht (Abb. 53). Dabei fällt auf, dass bei Verwendung der Sonde 68 die Bindungsstärke unter Magnesiumeinfluss eher, wenn auch nicht signifikant, zunimmt, während sie bei Verwendung der Sonde 71 signifikant abnimmt. Dieser Einfluss wird bei 71 in erster Linie bei längeren Inkubationszeiten deutlich, was darauf schließen lässt, dass die Sonde 71 möglicherweise in Anwesenheit von $MgCl_2$ hydrolysiert wird (230, 240). Alle nachfolgenden Experimente wurden daher ohne den Zusatz von $MgCl_2$ durchgeführt.

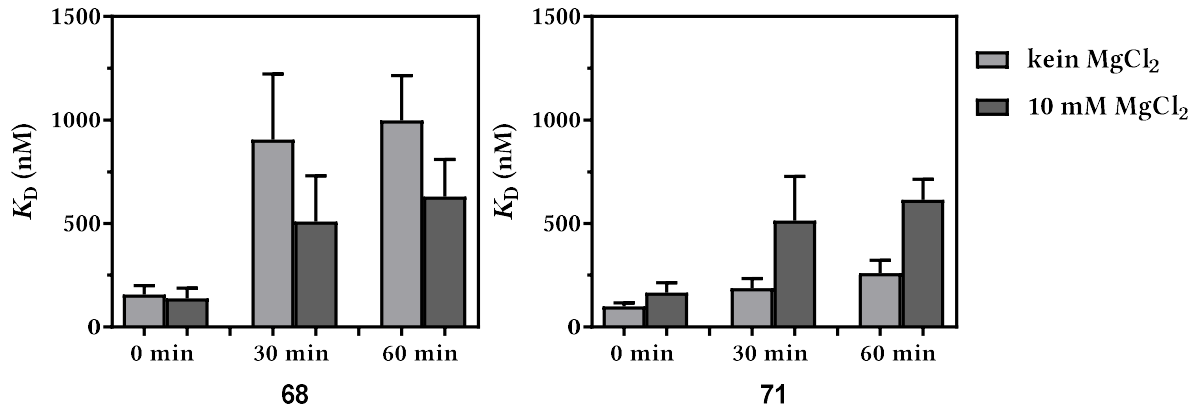


Abb. 53 Bindung der fluoreszierenden Sonden **68** (links) und **71** (rechts) an hTGase 2 in Ab- und Anwesenheit von 10 mM MgCl₂. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten im Triplikate.

3.4. Einfluss von CaCl₂ auf die GTP-Bindungsaktivität von hTGase 2

Analog zur Quantifizierung der Calciumabhängigkeit der Transamidaseaktivität wurde auch die GTP-Bindung in Anwesenheit verschiedener Ca²⁺-Konzentrationen mit Sonde **71** untersucht (Abb. 54). Der Anteil an gebundener Sonde wurde gegen die Ca²⁺-Konzentration aufgetragen, gemäß Gl. 6 ausgewertet und derart normalisiert, dass die oberen und unteren Plateaus der erhaltenen sigmoidalen Kurve Werte von 1 bzw. 0 aufwiesen

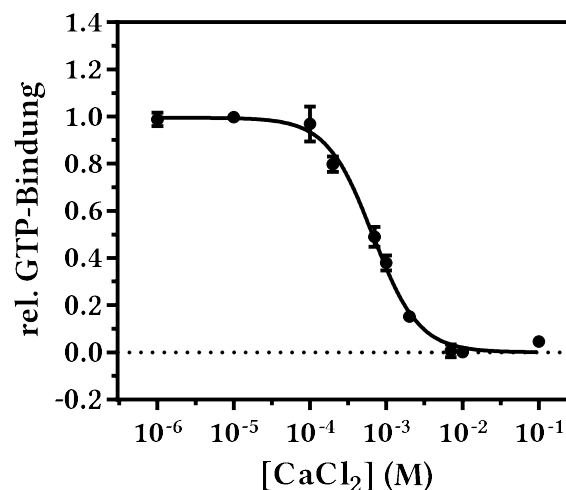


Abb. 54 Einfluss der Ca²⁺-Konzentration auf die Bindung von Sonde **71** an hTGase 2. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten im Triplikate

Eine maximale Bindung der Sonde zeigte sich bei Ca²⁺-Konzentrationen kleiner als 10⁻⁴ M, während die hTGase 2 bei Ca²⁺-Konzentrationen größer als 10⁻² M die Sonde **71** nicht bindet.

Im zwischenliegenden Konzentrationsbereich der Ca^{2+} -Ionen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der GTP-Bindung mit einem IC_{50} -Wert von 0,67 mM nach einer Messzeit von 30 min. Diese Zeitspanne wurde gewählt, um das Binden der Sonde mit der Transamidaseaktivität vergleichen zu können, die ebenfalls eine 30-minütige Präinkubation beinhaltet (vgl. Kapitel II.2.4. und Abb. 39).

Die physiologische Calciumkonzentration im Zellplasma von etwa $1 \cdot 10^{-7}$ M (219) ermöglicht somit eine ungehemmte GTP-Bindungsfunktion.

3.5. Validierung des neuen FA-Bindungsassays mittels literaturbekannter Liganden

Zur Validierung des neuen FA-Bindungsassays wurden die literaturbekannten Liganden GTP, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ und GDP sowie ATP (Daten nicht gezeigt) verwendet (Abb. 55). In diesen Experimenten wurden fixe Konzentrationen der Sonde 71 (50 nM) und der hTGase 2 (300 nM) eingesetzt und die Sonde anschließend durch steigende Konzentrationen der zu untersuchenden Liganden verdrängt. Die erhaltene Fluoreszenzanisotropie wurde unter Verwendung der für die Sonde ermittelten Werte für Fluoreszenz und Anisotropie gemäß Gl. 10 korrigiert und die so errechneten Werte anschließend gegen die Ligandkonzentration aufgetragen und einer nichtlinearen Regression gemäß Gl. 6 unterworfen, um IC_{50} -Werte zu ermitteln.

Tabelle 16 Übersicht über die IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten als Mittelwerte \pm SEM und Anzahl der Experimente, n

	IC_{50} (nM)	n_{H}	n
GTP	$64,8 \pm 5,3$	$1,43 \pm 0,36$	3
GTPγS	115 ± 5	$2,13 \pm 0,53$	3
GDP	419 ± 116	$1,36 \pm 0,17$	3
ATP	$\approx 1 \times 10^6$	-	2

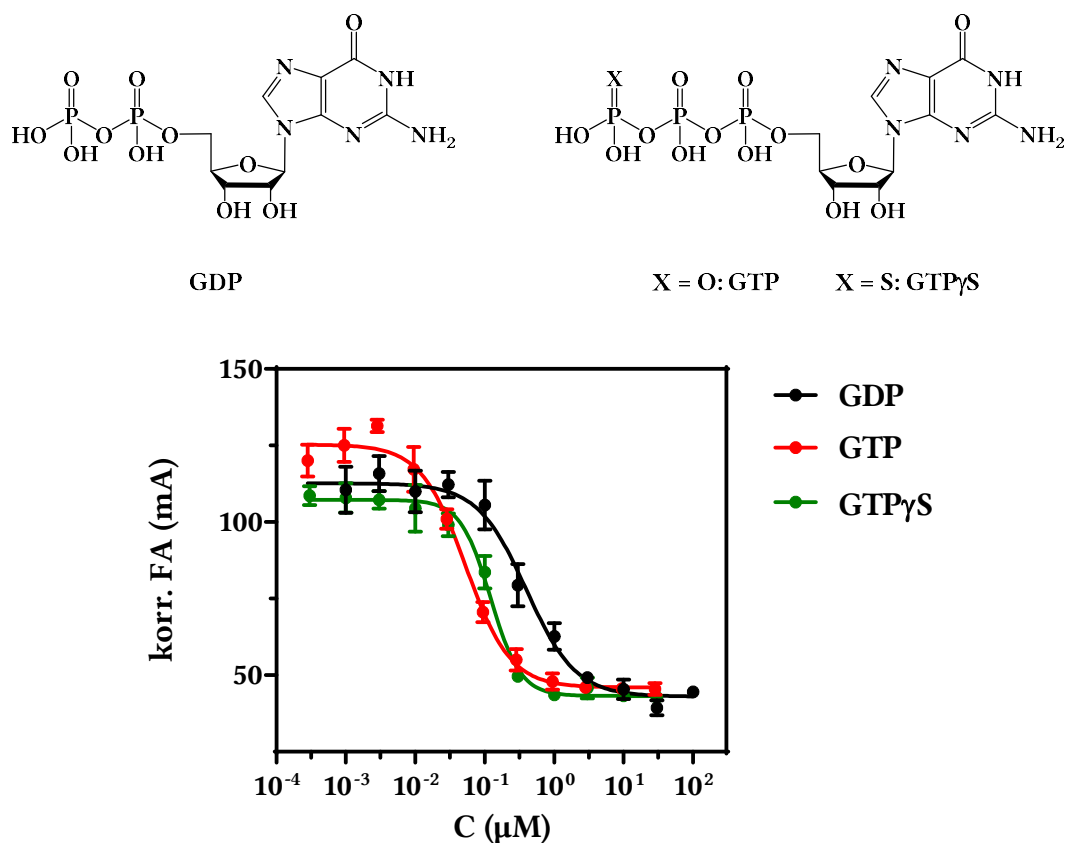


Abb. 55 Hemmung der Bindung der fluoreszierenden Sonde 71 an hTGase 2 durch GTP, GTPγS und GDP. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten im Triplikate.

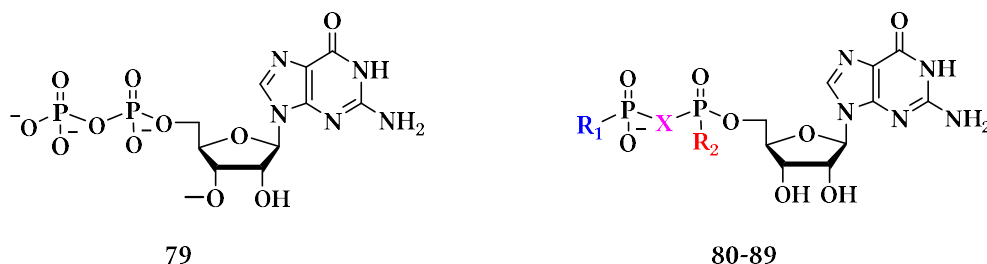
In Abb. 55 ist die konzentrationsabhängige Verdrängung der Sonde 71 durch die eingesetzten Liganden dargestellt. Dabei wird die Bindung der Sonde durch den physiologischen Liganden GTP am stärksten gehemmt, gefolgt von GTPγS, einem nicht hydrolysierbaren GTP-Analogon. Die Hemmung durch GDP ist um den Faktor 6 gegenüber jener durch GTP geringer ausgeprägt. ATP wirkt an hTGase 2 als sehr schwacher Inhibitor mit einer im Vergleich zu GTP um 3,5 Größenordnungen verringerten Hemmwirkung (Tabelle 16). Die ermittelten Werte und vor allem die Rangfolge der Hemmstärke der Liganden ist im Einklang mit Literaturdaten, wobei für ATP meist keine Hemmung ermittelt werden konnte (27, 28, 137, 229, 246). Dabei gilt jedoch zu beachten, dass in den aufgeführten Assays entweder die ATP-Konzentration zu niedrig für eine Hemmung gewählt wurde oder eine (höhere) Ca²⁺-Konzentration eingesetzt wurde, welche die Bindung an die GTP-Bindungsstelle zusätzlich erschwert.

3.6. Charakterisierung neuer Hemmstoffe mit Guanin-nukleotidstruktur an der GTP-Bindungsstelle von hTGase 2

Um ein genaueres Verständnis der Bindung von Liganden an die GTP-Bindungsstelle von hTGase 2 zu entwickeln, wurde eine Substanzbibliothek von 21 GDP- und GTP-Analoga im Hinblick auf ihre Hemmung der Interaktion von Sonde **71** mit hTGase 2 untersucht. Dabei wurden die Substanzen in einem Konzentrationsbereich von 1 nM bis 100 μ M und in einem Fall (Substanz **89**) bis 300 μ M eingesetzt

Die untersuchten Substanzen **79-99** wurden freundlicherweise von Prof. Jacek Jemielity (Center of New Technologies, Universität Warschau) zur Verfügung gestellt. Sie lassen sich in GDP-analoga (**79-89**), GTP-analoga (**90-96**) und sonstige Verbindungen (**97-99**) einteilen. Die Strukturen der untersuchten Substanzen und die Stärke ihrer Hemmung der GTP-Bindung an hTGase 2 sind in den Tabellen 17-19 dargestellt.

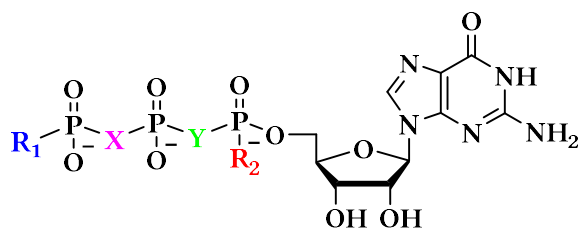
Tabelle 17 Übersicht über die Strukturen, IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten der untersuchten GDP-Analoga **79** (links) und **80-89** (rechts) als Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Werte für GDP sind Tabelle 16 entnommen.



	R ₁	X	R ₂	IC ₅₀ (nM)	n
GDP				419 \pm 116	1,36 \pm 0,17
79	-	-	-	454 \pm 32	1,00 \pm 0,16
80	O ⁻	CH2	O ⁻	3910 \pm 450	1,24 \pm 0,17
81	O ⁻	NH	O ⁻	906 \pm 237	1,17 \pm 0,18
82	O ⁻	O	S ⁻ D1	435 \pm 46	1,32 \pm 0,31
83	O ⁻	O	S ⁻ D2	524 \pm 65	1,33 \pm 0,19
84	F	O	O ⁻	4300 \pm 830	1,71 \pm 0,18
85	F	CH2	O ⁻	14700 \pm 2900	1,34 \pm 0,06
86	F	NH	O ⁻	8540 \pm 600	1,11 \pm 0,13
87	F	O	S ⁻ D1	14200 \pm 700	0,92 \pm 0,09
88	F	O	S ⁻ D2	12000 \pm 1260	1,25 \pm 0,07
89	F	O	BH ₃ D2	45400 \pm 9100	1,28 \pm 0,10

Für die GDP-analogen Verbindungen (Tabelle 17) lassen sich einige Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten. So wird deutlich, dass sich 3'-O-Methyl-GDP (**79**) nicht signifikant unterschiedlich zu GDP verhält und diese Seite der Ribose vermutlich nicht an der Bindung an hTGase 2 beteiligt ist. Bekräftigt wird diese Annahme durch Untersuchungen an Desoxy-GTP und Didesoxy-GTP durch Schaertl *et al.*, die keine Unterschiede zu GTP hinsichtlich ihrer Hemmstärke ergaben (138). Wird das die beiden Phosphatgruppen verbindende Sauerstoffatom durch eine NH-Gruppe (**81**) oder eine Methylengruppe (**80**) ersetzt, steigt der IC₅₀-Wert um den Faktor 2 bzw. den Faktor 9. Dies lässt darauf schließen, dass bei der Interaktion mit der GTP-Bindungsstelle hier eine polare Bindung oder eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Wasserstoffbrückendonator ausgebildet wird. Substituiert man ein Sauerstoffatom der α -Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom (**82** und **83**), lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Die negative Ladung am Sauerstoffatom der endständigen Phosphatgruppe scheint für die Interaktion mit dem Protein von größerer Bedeutung zu sein, da eine Substitution durch ein Fluoratom (**84**) die Hemmstärke um den Faktor 10 sinken lässt (**84** vs. GDP). Ähnliches ist für die Verbindungen **85** und **86** festzustellen, bei denen sich die Hemmstärke durch die Fluorsubstitution um den Faktor 4-10 verringert (**85** vs. **80**, **86** vs. **81**). Für die Schwefelverbindungen **87** und **88** verringert sich das inhibitorische Potential durch die Fluorsubstitution um die Faktoren 32 (**87** vs. **82**) bzw. 23 (**88** vs. **83**). Die Kombination aus beiden Veränderungen gegenüber GDP als Referenzsubstanz scheint synergistische Effekte zu haben. Weitaus weniger wird darüber hinaus die Substitution eines Sauerstoffatoms der α -Phosphatgruppe durch eine BH₃-Gruppe (**89**) toleriert. Gegenüber dem fluorierten GDP (**84**) sinkt die Hemmstärke um den Faktor 10. Eine negative Ladung scheint auch an dieser Stelle wichtig für die Interaktion mit der GDP-Bindungsstelle zu sein.

Tabelle 18 Übersicht über die Strukturen, IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten der untersuchten GTP-Analoga **90-96** als Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Werte für GTP sind Tabelle 16 entnommen.

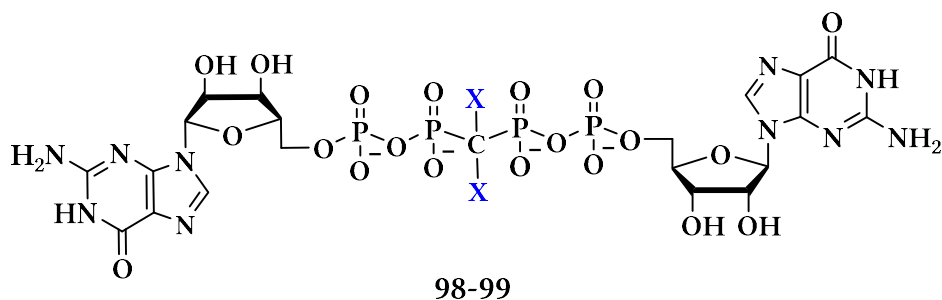
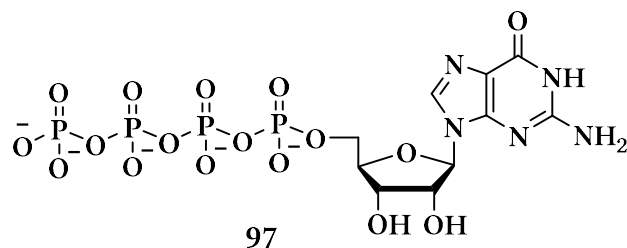


90-96

	R ₁	X	Y	R ₂	IC ₅₀ (nM)	n
GTP	-	-	-	-	64,8 ± 5,3	1,43 ± 0,36
90	O ⁻	O ⁻	CH ₂	O ⁻	959 ± 154	1,26 ± 0,15
91	O ⁻	CH ₂	O ⁻	O ⁻	299 ± 34	1,36 ± 0,15
92	O ⁻	CCl ₂	O ⁻	O ⁻	348 ± 41	1,06 ± 0,09
93	F	O ⁻	O ⁻	O ⁻	551 ± 83	1,00 ± 0,10
94	F	O ⁻	CH ₂	O ⁻	1560 ± 240	1,03 ± 0,11
95	F	O ⁻	NH	O ⁻	410 ± 85	1,16 ± 0,22
96	F	O ⁻	O ⁻	BH ₃	1900 ± 320	1,27 ± 0,24

Für die GTP-analogen Verbindungen (Tabelle 18) zeigt sich ein vergleichbares Bild. Grundsätzlich jedoch hemmen diese Substanzen die GTP-Bindung stärker als die GDP-analogen Verbindungen. Die Substitution des Sauerstoffatoms zwischen α - und β -Phosphatgruppe des GTPs durch eine Methylengruppe (**90**) reduziert die Hemmstärke um den Faktor 14. Substituiert man dagegen das Sauerstoffatom zwischen β - und γ -Phosphatgruppe des GTPs durch eine Methylengruppe (**91**), reduziert sich das inhibitorische Potential lediglich um den Faktor 4. Eine Dichlormethylengruppe an selbiger Stelle (**92**) führt zu vergleichbaren IC₅₀-Werten. Das scheint ein weiterer Hinweis darauf zu sein, dass die fehlende Polarität an dieser Stelle bzw. die fehlende Fähigkeit eine Wasserstoffbrückenbindung auszubilden die Hemmstärke reduziert. Die Fluorierung an der endständigen Phosphatgruppe führt auch hier zu einer deutlichen Abschwächung der Hemmstärke. Die Verbindungen **93** und **94** weisen einen um den Faktor 8 bzw. 2 vergrößerten IC₅₀-Wert gegenüber den nichtfluorierten Verbindungen, i.e. GTP und **90**, auf. Die Einführung einer BH₃-Gruppe (**96**) wirkt sich weiterhin negativ auf die Ligandbindung aus und verringert die Hemmstärke abermals um den Faktor 3 gegenüber Verbindung **93**.

Tabelle 19 Übersicht über die Strukturen, IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten der Substanzen **97** (oben) und **98-99** (unten) als Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten



	X	IC₅₀ (nM)	n
97	-	191 ± 16	1,13 ± 0,07
98	Cl	636 ± 82	1,62 ± 0,07
99	F	246 ± 19	1,09 ± 0,08

Die Gruppe der sonstigen Verbindungen (Tabelle 19) bilden den Versuch ab, eine hohe Hemmstärke zu erhalten und gleichzeitig die zugrundeliegende nukleotidische Struktur zu modifizieren. Als ein solcher Versuch kann Guanosintetraphosphat (**97**) angesehen werden. Dieses weist einen IC₅₀-Wert auf, der um Faktor 3 größer als jener von GTP ist. Die strukturelle Ähnlichkeit zu GTP ist allerdings weiterhin sehr groß. Die Verbindungen **98** und **99** dagegen stellen GDP-Dimere dar, die durch eine Dichlormethylen- (**98**) bzw. eine Difluormethylengruppe (**99**) miteinander verbunden sind. Diese Substanzen zeigen Hemmstärken, die im Bereich jener von GDP liegen. Substanzen mit vergleichbaren Bindungsaffinitäten zur GTP-Bindungsstelle von hTGase 2 mit strukturellen Unterschiedlichkeiten wie die beiden letztgenannten lassen sich möglicherweise zu Verbindungen hin modifizieren, die selektiv an hTGase 2, nicht aber an andere GTP-Bindungsstellen binden.

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten wurden teilweise von Frau Renata Kasprzyk, Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jacek Jemielity an der Universität Warschau, Polen, im Rahmen eines zweimonatigen Forschungsaufenthaltes während ihrer Promotion erhoben.

3.7. Charakterisierung ausgewählter Hemmstoffe an hTGase 2 in Anwesenheit von 0.5 mM CaCl₂

Die Experimente zur Ca²⁺-Abhängigkeit der beiden TGase 2-Funktionen haben gezeigt, dass die größtmögliche Transamidaseaktivität bei sehr hohen, die maximale GTP-Bindung bei sehr niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen auftritt. So lassen sich Substanzen, die an das aktive Zentrum der TGase 2 binden, im Transamidaseassay in Anwesenheit von 3 mM CaCl₂ charakterisieren, GTP-analoge Verbindungen dagegen im GTP-Bindungsassay in Abwesenheit von CaCl₂. Beide Assays zeigen dabei eine Aktivität von etwa 60% bei einer Ca²⁺-Konzentration von 0,5 mM CaCl₂. Dieser Befund wird gestützt durch Ergebnisse von Bergamini et al. sowie von Smethurst und Griffin (55, 229). So lässt sich vermuten, dass Verbindungen, die das aktive Zentrum oder die GTP-Bindungsstelle von TGase 2 adressieren, in einem der beiden Assays bei dieser mittleren Ca²⁺-Konzentrationen als Hemmstoffe identifiziert werden könnten.

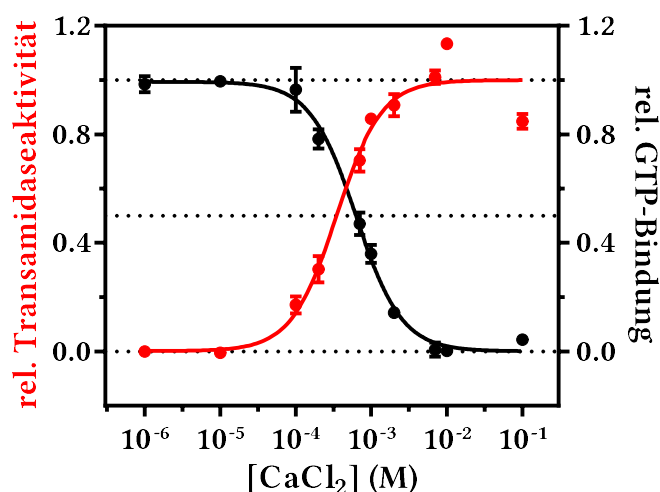


Abb. 56 Einfluss der Calciumkonzentration auf Transamidase- und der GTP-Bindungsfunktion von hTGase 2. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei (GTP-Bindung) oder vier (Transamidase) unabhängigen Experimenten im Triplikate und den Abb. 40 und 54 entnommen. Der IC₅₀-Wert von Calciumionen für die GTP-Bindung beträgt $0,669 \pm 0,127$ mM und der EC₅₀-Wert von Calciumionen für die Transamidaseaktivität beträgt $0,439 \pm 0,029$ mM.

Dazu wurden drei Vertreter der N^ε-Acryloyl-lysinepiperazide (37, 52 und 56) sowie GTPγS als Vertreter der GTP-Analoga in beiden Assays in Anwesenheit von 0,5 mM CaCl₂ vermessen. Diese Untersuchungen ergaben, dass die N^ε-Acryloyl-lysinepiperazide die beiden Funktionen der hTGase 2 mit relativ ähnlichen IC₅₀-Werten beeinflussen; die IC₅₀-Werte für GTPγS differierten dagegen um den Faktor 20 (Tabelle 20). Da beide Assays mit unterschiedlichen Enzymmengen betrieben werden, ist der IC₅₀-Wert zumindest für die irreversiblem

Hemmstoffe kein optimaler Vergleichspunkt. Der GTP-Bindungsassay scheint jedoch aufgrund kleinerer Fehler der geeigneterer der beiden Assays zu sein, Hemmstoffe unterschiedlicher Bindungsstellen zu identifizieren, benötigt hierfür jedoch die 5-fache Menge an hTGase 2.

Eine Anwendung des GTP-Bindungsassay mit 0,5 mM CaCl_2 in einem Hochdurchsatzverfahren könnte die Identifizierung von Hemmstoffen des aktiven Zentrums und der GTP-Bindungsstelle ermöglichen. Im Anschluss daran könnte durch die Variation der Calciumionenkonzentration durch eine einzelne Messung festgestellt werden, ob der untersuchte Inhibitor mit der Transamidaseaktivität oder der GTP-Bindung interagiert. So sollte sich also bei Zugabe höherer Calciumionenkonzentrationen nach abgeschlossenem Test eine Auslöschung der GTP-Bindung nachweisen lassen. Wie nachfolgend beschrieben, zeigt der Assay in Anwesenheit von 0,5 mM CaCl_2 , zumindest in einem Vorversuch ohne Inkubationszeit, einen Z' -Wert von $> 0,5$ (Abb. 58) während er bei längeren Inkubationszeiten drastisch abfällt.

Tabelle 20 Übersicht über die IC_{50} -Werte der *N*-Acryloyl-lysinpiperazide **37**, **52** und **56** sowie des GTP-Analogons $\text{GTP}\gamma\text{S}$. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von zwei bis fünf unabhängigen Experimenten im Triplikat.

	GTP-Bindung			Transamidaseaktivität		
	IC_{50} (nM)	<i>n</i>	n	IC_{50} (nM)	<i>n</i>	n
37	179 ± 13	$1,26 \pm 0,29$	2	147 ± 5	$2,32 \pm 0,11$	3
52	81 ± 7	$1,41 \pm 0,02$	2	135 ± 6	$1,78 \pm 0,14$	3
56	82 ± 28	$1,33 \pm 0,10$	4	61 ± 19	$1,26 \pm 0,19$	4
GTPγS	96 ± 27	$1,04 \pm 0,28$	2	1883 ± 616	$1,98 \pm 0,40$	5

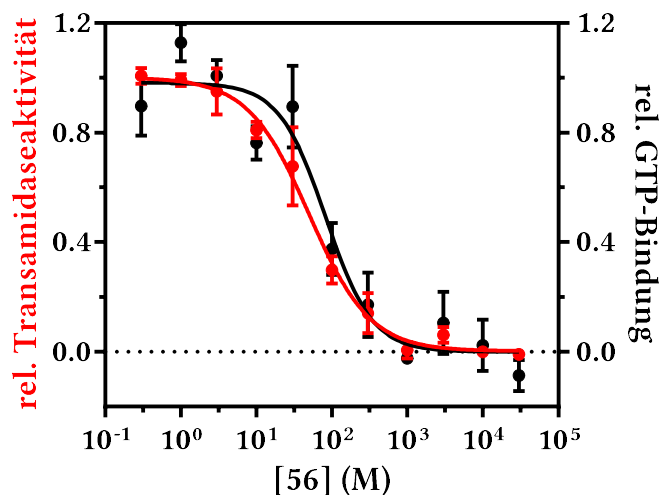


Abb. 57 Hemmung der Transamidaseaktivität sowie der GTP-Bindung von hTGase 2 durch das *N*^ε-Acryloyl-lysinepiperazid **56** in Anwesenheit von 0,5 mM CaCl₂. Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM von vier unabhängigen Experimenten.

3.8. Eignung des Assays zur Verwendung in einem Hochdurchsatzverfahren

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Eignung des Assays im Hochdurchsatzscreening wurde analog zum Transamidaseassay der *Z'*-Wert ermittelt. Die Bindung von Sonde **71** an hTGase 2 wurde ohne Präinkubation bzw. nach 30- oder 60-minütiger Präinkubation gemessen. Eine vollständige Hemmung der Bindung von **71** wurde durch die Zugabe von 30 mM GTPγS erreicht. Die Ca²⁺-freie Variante des Assays wurde hierbei in drei separaten Experimenten untersucht, der Ca²⁺-haltige Assay (0,5 mM CaCl₂) dagegen nur in einem Vorversuch.

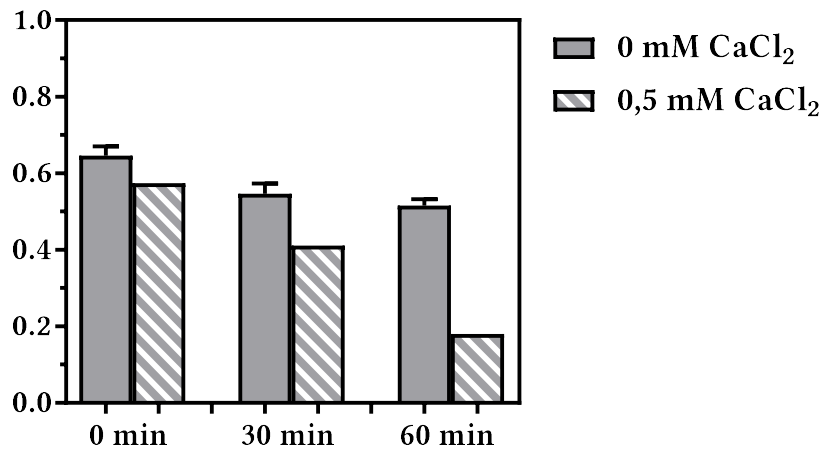


Abb. 58 Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Assays mittels Z' -Faktor für die Bindung der Sonde 71 an hTGase 2 in Abwesenheit von Calcium oder in Anwesenheit von 0,5 mM CaCl₂ und in An- oder Abwesenheit von 30 mM GTP γ S nach 0, 30 und 60 Minuten Präinkubation. Die Werte im Ca²⁺-freien Ansatzes sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten, die Werte des Ca²⁺-haltigen Ansatzes entstammen einem einzelnen Vorversuch und sind daher ohne Fehlerbalken dargestellt

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten wurden teilweise von Frau Renata Kasprzyk, Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jacek Jemielity an der Universität Warschau, Polen, im Rahmen eines zweimonatigen Forschungsaufenthaltes während ihrer Promotion erhoben.

Zusammenfassung & Ausblick

1. Zusammenfassung

Die Zielsetzung dieses Projekts war die Entwicklung von neuartigen Assayverfahren zur Quantifizierung der Transamidaseaktivität und der GTP-Bindungsfunktion von humaner Transglutaminase 2 unter Zuhilfenahme von Meerschweinchen-TGase 2 für den Transamidaseassay. Mit diesen neu entwickelten Assays sollten daraufhin zwei Substanzbibliotheken von Michael-Akzeptoren und GTP-analogen Substanzen als Hemmstoffe der beiden Enzymfunktionen charakterisiert werden. Die hierfür benötigte humane TGase 2 sollte rekombinant in einem prokaryotisches Expressionssystem (*Escherichia coli*) synthetisiert und durch eine Affinitätschromatographie unter Verwendung eines Strep-tag/Streptactin-Systems gereinigt werden.

Die Entwicklung des Transamidaseassays erfolgte unter Verwendung von kommerziell erhältlicher TGase 2, die aus Meerschweinchenleber isoliert wurde, und von *N,N*-Dimethylcasein (Acyl donorsubstrat) sowie den fluoreszierenden Acylakzeptorsubstraten Fluorescein-5-isothiocyanatcadaverin (F-Cad), Rhodamin B-Sarcosylcadaverin (R-S-Cad) und Rhodamin B-Isonipecotylcadaverin (R-I-Cad). Zunächst wurde der Konzentrationsbereich bestimmt, in dem die Fluoreszenz proportional zur Fluorophorkonzentration ist. Darauf folgte die Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration durch Ermittlung des Konzentrationsbereiches, in dem die TGase 2-Konzentration und die Enzymaktivität proportional sind. Weiterhin wurden die Substrat-Enzym-Interaktionen durch Bestimmung der Parameter K_m und v_{max} charakterisiert. Eine Validierung des Assays für Inhibitionsstudien erfolgte mit den literaturbekannten TGase 2-Inhibitoren Iodacetamid (**33**), dem *N*^ε-Acryloyl-lysinpiperazid **34** und GTP. Dabei konnte ein identisches Verhalten der drei Substrate festgestellt werden. Schließlich wurde die Eignung des Assays für Hochdurchsatz-Screeningverfahren durch die Bestimmung des Z' -Wertes ($0,81 \pm 0,01$) sowie für die Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration einer Proteinprobe ermittelt. Die Übertragung der Ergebnisse auf humane TGase 2 wurde durch Studien zur Linearität von Enzymaktivität und -menge, durch Untersuchung der Substrat-Enzym-Interaktion und der Wirkung von Inhibitoren erreicht. Ebenso wurde der Assay auf vier weitere Vertreter der Transglutaminase-Enzymfamilie, i.e. die humanen TGasen 1, 3 und 6 sowie den humanen

Faktor XIIIa (247), erfolgreich angewendet und ermöglichte so Selektivitätsuntersuchungen von zwei *N*^ε-Acryloyl-lysinpiperaziden aus der untersuchten Bibliothek. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Ca²⁺-Konzentration auf die Transamidaseaktivität der humanen TGase 2 quantifiziert.

Für die Leitsubstanz **34** konnte ein irreversibler Wirkmechanismus bestätigt werden. Die untersuchten Substanzen der ersten Substanzbibliothek waren allesamt Derivate von **34**, wobei die aktivitätsbestimmende *N*^ε-Acryloyl-lysin-Gruppe konserviert blieb. Daher waren alle getesteten Substanzen in der Lage TGase 2 zu hemmen und lieferten IC₅₀-Werte im Bereich 71 bis 1851 nM, womit sich ihre Hemmstärke über einen Bereich von knapp 1,5 Größenordnungen erstreckte. Die in den Hemmstudien demonstrierten Struktur-Wirkungs-Beziehungen konnten unter Verwendung des Assays von Wodtke *et al.* reproduziert werden (214).

Zur Entwicklung eines GTP-Bindungsassays auf Basis der Fluoreszenzanisotropie wurde zunächst der literaturbekannte Ligand BODIPY-FL-GTPγS (240) als fluoreszierende Sonde verwendet und die Interaktion mit humaner TGase 2 charakterisiert. In einem nächsten Schritt wurden zehn neu entwickelte Fluorescein-tragende Sonden (**69-78**) auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber TGase 2 hin untersucht, wobei die resultierenden Dissoziationskonstanten, *K*_D, und Fluoreszenzverstärkungsfaktoren, *g*, ermittelt wurden. Die Sonde mit dem niedrigsten *K*_D-Wert, **71**, wurde anschließend in Verdrängungsexperimenten zur Untersuchung der Bindung der literaturbekannten TGase 2-Liganden GTP, GTPγS, GDP und ATP zur Validierung des neuentwickelten Assays verwendet. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Konzentrationen von Mg²⁺ und Ca²⁺ untersucht und die Abhängigkeit der GTP-Bindung von der Ca²⁺-Konzentration analog zum Transamidaseassays auch quantifiziert. Eine eingeschränkte Eignung des GTP-Bindungsassays zur Verwendung in einem Hochdurchsatzverfahren wurde durch die Bestimmung des *Z'*-Wertes demonstriert.

Auf Basis der Verdrängungsexperimente wurde eine zweite Bibliothek von GTP-analogen Substanzen auf ihre TGase 2-Bindung hin untersucht und IC₅₀-Werte in einem Bereich von 191 bis 45400 nM, sich also über knapp 2,5 Größenordnungen erstreckend, ermittelt. Diese im Vergleich zur ersten Substanzbibliothek größere Spannweite ist in Teilen sicher darauf zurückzuführen, dass Bibliothek 1 aus irreversiblen, Bibliothek 2 dagegen aus reversiblen Hemmstoffen besteht.

Die Etablierung eines prokaryotischen Expressionssystems für hTGase 2 wurde durch die Verwendung des *E. coli*-Stamms BL21 (DE3) und des Expressionsvektors pT7-7, in den eine Gensequenz zur Translation eines Fusionsproteins aus humaner TGase 2, einer Thrombinschnittstelle und eines N-terminalen Twin-Strep-tags insertiert wurde, erreicht. Dieses Verfahren ermöglichte die Gewinnung von niedrigen, aber konstanten Mengen hochreiner Transamidase-aktiver und GTP-bindender hTGase 2.

2. Ausblick

Verwendung der Assays

Die entwickelten Assays stellen sensitive und durch ihre ratiometrische Natur leicht zugängliche Methoden dar, die beiden wesentlichen Funktionen der TGase 2 zu quantifizieren. Dabei überzeugen beide Assays durch ihr homogenes und kontinuierliches Design, minimale Hintergrundsignale und die Möglichkeit, sie in Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung von Hemmstoffen in Substanzbibliotheken zu verwenden. Durch die Abhängigkeit beider Funktionen von der Calciumkonzentration ist es darüber hinaus leicht möglich, die gefundenen Hits als Liganden am katalytischen Zentrum oder an der GTP-Bindungsstelle zu identifizieren.

Die gewählten Substratpaare des Transamidaseassays zeigen keine TGase 2-Spezifität, weshalb der Assay auch für die TGasen 1, 3 und 6 sowie Faktor XIIIa geeignet ist. So liegt die Vermutung nahe, dass zwar Inhibitoridentifizierung in isolierten Systemen auch für die genannten TGase-Isoformen möglich ist, die Untersuchung von TGase 2 in komplexeren Medien jedoch beeinträchtigt sein könnte. Um dieser Problematik zu begegnen, ist es allerdings möglich, Isoform-spezifische Inhibitoren, wie z.B. Substanz **34** zu verwenden, um erhaltene Signale den Aktivitäten der einzelnen Isoformen zuzuordnen (210).

Der beschriebene GTP-Bindungsassay ist die erste Fluoreszenzanisotropie-basierte Methode, die zur Charakterisierung von Hemmstoffen an der GTP-Bindungsstelle der TGase 2 verwendet wird und könnte eine Alternative zu den sonst vorherrschenden radioaktiven Assays unter Verwendung von [³⁵S]-GTP γ S darstellen. Zwar ist das GTP-Bindungsmotiv von TGase 2 einzigartig (28), die Tatsache, dass selektive Inhibitoren für diverse G-Proteine entwickelt werden konnten (248–250), lässt es aber denkbar erscheinen, dass Assays wie dieser auch für andere G-Proteine verwendet werden könnten.

Als weitere Optimisierungsschritte sind folgende Modifikationen denkbar: ein Austausch des Fluorophors Fluorescein gegen Fluoreszenzfarbstoffe mit rotverschobenem

Emissionsspektrum wie Rhodamin B oder 5-Carboxytetramethylrhodamin könnte Interferenzen von Testsubstanzen vermindern (199, 235); eine höhere Enzym- oder niedrigere Sondenkonzentration, ein Ligand mit niedrigerer Dissoziationskonstante oder eine Erhöhung der Wiederholungen pro Konzentration könnten das Signal-Rausch-Verhältnis verbessern und dadurch den Z'-Faktor vergrößern; ein Ligand, der keine Fluoreszenzänderung durch Bindung an TGase 2 erfährt, könnte nachträgliche mathematische Korrekturen erübrigen (199).

Verwendung der Inhibitoren als PET-Tracer

Die Beteiligung an vielfältigen Erkrankungen macht TGase 2 zu einem interessanten Ziel für Therapie und Diagnostik. Insbesondere die offenen Fragen zu Wirkung und Kausalität im Krebsgeschehen aber auch in den neurodegenerativen Erkrankungen verlangen nach Substanzen, die als molekulare Sonden in funktionellen Bildgebungsverfahren zum Einsatz kommen können. Während fluoreszierende Inhibitoren und Substrate in Zellkulturen und Konformationsstudien verwendet werden konnten (18), Bedarf es im klinischen Kontext Substanzen, die für Positronen-Emissionstomographie (PET) bzw. Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT, *engl.* single photon emission computed tomography) verwendbar sind (251). Die Entwicklung solcher Substanzen ist in jüngster Vergangenheit in den Fokus der Forschung gerückt (252, 253). PET ist zwar im Vergleich zu SPECT mit einem höheren apparativen Aufwand verbunden, wird jedoch aufgrund einer größeren Sensitivität als überlegen angesehen ((254, 255). Die derzeit an häufigsten verwendete Substanz zur PET-Bildgebung ist die ^{18}F -2-Fluor-2-deoxy-D-glucose ($[^{18}\text{F}]$ -FDG), die insbesondere zur Visualisierung von Krebserkrankungen eingesetzt wird (256). Dabei wird ausgenutzt, dass Tumore einen deutlich gesteigerten Glucoseumsatz gegenüber anderen Zellen und Geweben aufweisen und dadurch besonders prominent durch $[^{18}\text{F}]$ -FDG dargestellt werden können. Die $[^{18}\text{F}]$ -FDG wird nach Aufnahme in die Zelle durch Hexokinasen phosphoryliert, wodurch ein Wiederausschleusen aus der Zelle verhindert und so eine weitere Anreicherung erzielt wird. Mit einer Halbwertszeit, $t_{1/2}$, von etwa 110 min (gegenüber ^{11}C mit $t_{1/2} = 20$ min und ^{68}Ga mit $t_{1/2} = 68$ min), eignen sich Verbindungen mit ^{18}F -Isotopen besonders für PET-Scans, da sie Produktion und Transport ebenso gewährleisten, wie ein relativ schnelles Abklingen der Radioaktivität (257, 258). Die Verwendung von PET-Scans als Therapieverlaufskontrolle gilt insbesondere mit $[^{18}\text{F}]$ -FDG als klinisch etabliert (258, 259). Es bedarf darüber hinaus jedoch weiterer Alternativen, da die Verwendung von $[^{18}\text{F}]$ -FDG hinsichtlich Patienten mit Diabetes mellitus und weiterer

Glucosestoffwechselerkrankungen eingeschränkt ist und zielgerichtetere Substanzen höhere Sensitivitäten und Spezifitäten versprechen (260, 261).

Auf der Suche nach innovativen PET-Substanzen, geraten irreversible Hemmstoffe zunehmen in den Fokus. So konnten beispielsweise ^{11}C -tragende Substanzen zur Markierung von Monoaminoxidase B, Fettsäureamidhydrolase und Cathepsinen entwickelt werden (262–264). Die hier vorgestellten Assays könnten somit einen Beitrag zur Entwicklung von solchen irreversiblen Hemmstoffen leisten, die selektiv für TGase 2 sind und somit zur Bildgebung von TGase 2-assozierte Krebs- und neurodegenerativen Erkrankungen verwendet werden.

Material & Methoden

1. Bakterienstämme

Stamm	Anwendung
<i>E. coli</i> TopTen	Chemisch kompetente <i>E. coli</i> zur Plasmidamplifikation
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Chemisch kompetente <i>E. coli</i> zur rekombinanten Proteinexpression

2. Expressionsvektoren

Vektor	Beschreibung	Anwendung
pCMV-XL4/hTGase 2	Kommerziell erworbene cDNS (OriGene Technologies, Herford, Deutschland)	PCR-Template zur Klonierung in pCEP-Pu/BM40SP-NTST
pCEP-Pu/BM40SP-NTST-hTGase 2#	Modifizierte Version des pCEP4 Vectors (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland), die Sequenzen eines Puromycin-resistenzgens, des Signalpeptids BM40, einen N-terminalen Twin-Strep-tag (NTST), einer Thrombinschnittstelle und von hTGase 2 trägt	Hergestellt zur eukaryotischen episomalen Expression in HEK293-EBNA (nicht erfolgreich), PRC-Template zur Klonierung in pT7-7
pT7-7/NTST-hTGase 2‡	Konstrukt, das Sequenzen für einen NTST, eine Thrombinschnittstelle und hTGase 2 trägt	Prokaryotische Expression von hTGase 2 als Fusionsprotein mit einem NTST

Leervektor dankenswerterweise erhalten von Prof. Dr. Frank Zaucke, Institut für Biochemie II, Universität zu Köln.

‡ Leervektor dankenswerterweise erhalten von Prof. Dr. Karsten Niefind, Institut für Biochemie, Universität zu Köln.

3. Primer

Alle Oligonucleide wurden bei Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erworben.

Name	Primer	Sequenz 5' → 3' *
hTGase 2	P1 forward	AAAGCTAGCGCCGAGGAGCTGGTCTTAGA G
	P2 reverse	AAACTCGAGTTAGGCGGGGCCAATGATGA
hTGase 2 NTST	P3 forward	AAACATATGAGCTGGAGCCACCCTCAGTT
	P4 reverse	TATAAGCTTTTAGGCGGGGCCAATGATG

* Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

4. Enzyme

Alle TGasen, d. h. gpTGase 2 (T006 und T039), hTGase 2 (T022), hTGase 1 (T009), hTGase 3 (T013), hTGase 6 (T021) und hFXIIIa (T070), wurden erworben von Zedira (Darmstadt, Deutschland).

4.1. DNS-Polymerase	Hersteller
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNS-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
4.2. Restriktionsendonukleasen	Hersteller
NheI FastDigest	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
XhoI FastDigest	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
PstI	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
NdeI	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
HindIII	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

4.3. Weitere Enzyme	Hersteller
Alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm	Promega, Mannheim, Deutschland
T4 DNS-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

5. Kits und Reagenzien

Name	Anwendung	Hersteller
GeneJET gel extraction kit	DNS-Aufreinigung aus Agarosegelen und PCR	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
NucleoSpin Plasmid	Isolation plasmidischer DNS aus Bakterien	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoBond XTra Midi	Isolation plasmidischer DNS aus Bakterien	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
6x DNA loading dye	Probenpuffer für Agarose-Gelelektrophorese	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
GeneRuler 1 kb DNS Ladder 250-10.000 bp	Komigrationsstandard bei der Agarose-Gelelektrophorese	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Komigrationsstandard bei der SDS-PAGE	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Substrat zur Chemilumineszenz-Detektion von Signalen in Western-Blots	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
peqGREEN DNS dye	DNS-Farbstoff bei der Agarose-Gelelektrophorese	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Amersham Hybond P 0.45 PVDF membrane	Blotting-Membran	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland

6. Primärantikörper

	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
StrepMAB-Classic (Primärantikörper)	1:500	2-1507-001	IBA Lifesciences, Göttingen, Deutschland
TGase 2, monoklonal (CUB 7402) (Primärantikörper)	1:1000	MA5-12739	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

7. Sekundärantikörper

	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
Hase Anti-Maus IgG HRP-konjugiert, polyklonal (Sekundärantikörper)	1:1000	P0260	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark

8. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden erworben von Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) in p.A.-Qualität, wenn nicht anders in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Name	Hersteller
IPTG	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Lysozym	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DNSse I	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PMSF	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DTT	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 25%	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Name (Fortsetzung)	Hersteller
Phosphorsäure 85%	VWR, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Th.Geyer, Renningen, Deutschland
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin	Serva, Heidelberg, Deutschland
BODIPY-FL-GTP γ S	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
GTP γ S	Jena Bioscience

9. Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem, doppelt destilliertem Wasser hergestellt. Nach Adjustierung des pH-Wertes wurden alle Lösungen und Puffer mittels einer 0,22 μ M-Membran (Merck, Darmstadt, Deutschland) steril filtriert.

Name	Zusammensetzung
Waschpuffer	100 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,4
Elutionspuffer	100 mM TRIS-HCl, 1 M NaCl, 2.5 mM D-Desthiobiotin, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% (v/v) Glycerol, pH 7,4
Regenerationspuffer	100 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM HABA, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,4
Enzympuffer 1 (EP1)	100 mM MOPS, 3 mM CaCl ₂ , 10 mM DTT, 20% (v/v) Glycerol, pH 8,0
Enzympuffer 2 (EP2)	200 mM MOPS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM DTT, 20% (v/v) Glycerol, pH 8,0
Enzympuffer 3 (EP3)	200 mM MOPS, 10 mM DTT, 20% (v/v) Glycerol, pH 8,0
Assaypuffer 1 (AP1)	100 mM MOPS, 3 mM CaCl ₂ , 50 μ M EDTA, pH 8,0
Assaypuffer 2 (AP2)	200 mM MOPS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,4
Assaypuffer 3 (AP3)	200 mM MOPS, pH 7,4

Name (Fortsetzung)	Zusammensetzung
SDS Laufpuffer	50 mM TRIS, 400 mM Glycin, 3,5 M SDS, pH 7,5
3x SDS Probenpuffer	187,5 mM TRIS-HCl, 6% (m/v) SDS, 30% (v/v) Glycerol, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,03% (m/v) Bromphenolblau, pH 6,8
Transferpuffer	50 mM Borsäure, 10% (v/v) Methanol, pH 8,5
TAE-Puffer	40 mM TRIS, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,5
LB-Medium (zur Klonierung)	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, pH 7,0
LB-Medium (zur Expression)	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, pH 7,0
LB-Agar	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 15 g/L Agar, pH 7,0
TBS	50 mM TRIS, 1,5 M NaCl, pH 7,4
TBS-T	50 mM TRIS, 1,5 M NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, pH 7,4

10. Zubehör

Name	Artikelnummer	Hersteller
Superloop, 50 mL	18-1113-82	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
Strep-Tactin Superflow Säule	2-1238-001	IBA Lifesciences, Göttingen, Deutschland
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, 30000 MWCO	UFC903024	Merck, Darmstadt, Deutschland
BRANDplates pureGrade 96-Well Platten, F-Bottom (schwarz)	4000260	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Express Plus Membran 0,22 µm	GPWP04700	Merck, Darmstadt, Deutschland

11. Geräte

Name	Hersteller
Mastercycler Personal	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
NanoDrop 2000c Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Odyssey Fc	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
Minitron	Infors HT, Einsbach, Deutschland
ÄKTApurifier	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
BIO-RAD Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Synergy 2 Multimode Microplate Reader	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Sorvall HC5B-Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge 5415	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
Mini Star Silverline	VWR, Darmstadt, Deutschland
membraPure, distillery	membraPure, Bodenheim, Deutschland
Metrohm 827 pH lab-pH-Meter	Metrohm, Herisau, Schweiz
Wasserbad MP	Julabo, Seelbach, Deutschland
Vakuumpumpe MW6374	KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland
Magnetrührer RCTbasic	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland

12. Online-Anwendungen und Software

Online-Anwendungen	Anwendung
BLAST http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	blastn: Vergleich von DNS-Sequenzen anhand einer Nukleotid-Vorlage
ExPASy translate tool http://web.expasy.org/translate/	Übersetzung von DNS- in Aminosäuresequenzen
ExPASy ProtParam tool https://web.expasy.org/protparam/	Berechnung physikochemischer Parameter, wie Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient, von Proteinen anhand ihrer Aminosäuresequenz
Ligation calculator http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html	Berechnung benötigter Mengen von Insert-DNS/-PCR Produkt zur Ligation mit dem entsprechenden Vektor
Tm Calculator http://tmcalculator.neb.com	Berechnung von Schmelzpunkten der verwendeten Primer
Software	Anwendung
ImageStudie, Version 5.2	Bedienungssoftware des Odyssey Fc
Unicorn, Version 5.31	Bedienungssoftware der ÄKTApurifier
GraphPad Prism, Version 7.05	Statistische Auswertung, Analyse und graphische Präsentation von Datensets
Gen5, Version 1.11.5	Bedienungssoftware des Synergy 2 Multimode Plate Readers
SeqScanner, Version 2.0	Ansicht und Analyse von DNS-Sequenzen

13. Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Schritte wurden mit deionisiertem, doppelt destilliertem und autoklaviertem Wasser durchgeführt.

13.1. Polymerase-Kettenreaktion

Präparative PCR wurde verwendet, um die cDNS von hTGase 2 zu amplifizieren. Als DNS-Template diente der kommerziell erworbene Vektor pCMV-XL4/hTGase 2, der von Herrn Dr. Reik Löser (Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung) bereitgestellt wurde. Durch die Verwendung der Primer P1 forward und P2 reverse wurden Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen NheI und XhoI eingeführt, durch die eine passgenaue Insertion der hTGase 2-cDNS in eindeutiger Orientierung in den Vektor pCEP-Pu/BM40SP-NTST möglich war. Diese Erkennungssequenzen wurden gewählt, da sie in der multiple cloning site des aufnehmenden Vektors enthalten sind, nicht jedoch an anderen Stellen des Vektors bzw. in der Sequenz der hTGase 2-cDNS. Das Einfügen der Restriktionsschnittstelle für NheI bewirkte im exprimierten Protein die Insertion der beiden Aminosäuren Alanin und Serin zwischen der Thrombinschnittstelle und hTGase 2. Da keine dieser Aminosäuren raumgreifende oder bei physiologischem pH-Wert geladene Reste enthält, dürfte ihr Einfluss auf Struktur und Aktivität minimal sein (182).

Als Polymerase wurde die Phusion Hot Start II High-Fidelity DNS Polymerase von Thermo Fisher Scientific verwendet, die sich durch eine signifikant niedrigere Fehlerrate als die üblicherweise verwendete *Taq* DNS-Polymerase auszeichnet (265). Diese höhere Genauigkeit wird durch eine Fehlererkennung und -behebung (*engl.* proofreading activity) erreicht, die durch eine Exonuklease-Aktivität in 3' → 5' Leserichtung gegeben ist (265). Tabelle 21 zeigt den gewählten Reaktionsansatz für die Amplifikation des hTGase 2-Inserts zur Klonierung in den Vektor pCEP-Pu/BM40SP-NTST.

Tabelle 21 Pipettierschema für die präparative PCR zur Generierung von pCEP-Pu/BM40SP-NTST-hTGase 2

Komponente	Volumen	finale Konzentration
5x Phusion HF-Puffer	10 µL	1x
dNTP Mix in Wasser (je 10 mM)	1 µL	200 µM
P1 forward (25 µM) in Wasser	1 µL	0,5 µM
P2 reverse (25 µM) in Wasser	1 µL	0,5 µM
Template-DNS (pCMV- XL4/hTGase 2)	1 µL (10 ng)	(0,5 ng/µL)
Phusion Hot Start II-DNS Polymerase (2 U/µL) in Wasser	0,5 µL	0,02 U/µL
Wasser	ad 50 µL	

Tabelle 22 zeigt den Reaktionszyklus zur Amplifikation der hTGase 2-cDNA mit pCMV-XL4/hTGase 2 als Template-DNS im Mastercycler Personal.

Tabelle 22 PCR-Zyklus zur Generierung von pCEP-Pu/BM40SP-NTST-hTGase 2

Schritt	Dauer	Temperatur
initiale Denaturierung	120 s	98 °C
Denaturierung	30 s	98 °C
Primerhybridisierung & Elongation	60 s	72 °C
finale Elongation	600 s	72 °C
Halten		4 °C

30 Zyklen

Das resultierende Konstrukt pCEP-Pu/BM40SP-NTST-hTGase 2 wurde für eine geplante rekombinante episomal-eukaryotische Expression in HEK293-EBNA-Zellen generiert, die jedoch nicht erfolgreich war. Das Konstrukt diente jedoch im Folgenden als Template-DNS zur Klonierung in den prokaryotischen Expressionsvektor pT7-7, da dieser keinen N-

terminalen Twin-Strep-tag enthält und das Einführen desselben durch einen entsprechenden PCR-Primer aufgrund seiner Größe von mindestens 84 bp nicht praktikabel ist.

Das Konstrukt pCEP-Pu/BM40SP-NTST-hTGase 2 enthält Sequenzen für das BM40-Signalpeptid, für einen Twin-Strep-tag sowie für eine Thrombinschnittstelle gefolgt von der hTGase 2-cDNS (siehe Anhang). Um den Strep-tag, die Thrombinschnittstelle und die hTGase 2-cDNS in den prokaryotischen Expressionsvektor pT7-7 zu klonieren, wurden die Primer P3 forward und P4 reverse verwendet, die darüber hinaus Erkennungssequenzen für die Endonukleasen NdeI und HindIII einführen. Das Einfügen der Restriktionsschnittstelle für NheI bewirkte dabei die Insertion der Basentriplets für die beiden Aminosäuren Histidin und Methionin, wobei das letztere Basentriplet für Methionin als Start der DNS-Polymerase fungiert und so keine weiteren Aminosäuren im Protein eingefügt werden.

Der Reaktionsansatz war identisch mit dem der zuvor beschriebenen PCR-Reaktion, nun jedoch mit pCEP-Pu/BM40SP-NTST-hTGase 2 anstatt von pCMV-XL4/hTGase 2 als Template-DNS. Tabelle 23 zeigt den Reaktionszyklus für diese PCR.

Tabelle 23 PCR-Zyklus zur Generierung von pT7-7/NTST-hTGase 2

Schritt	Dauer	Temperatur	
initiale Denaturierung	120 s	98 °C	
Denaturierung	30 s	98 °C	5 Zyklen
Primerhybridisierung	20 s	65,5 °C	
Elongation	30 s	72 °C	
Denaturierung	30 s	98 °C	30 Zyklen
Primerhybridisierung & Elongation	60 s	72 °C	
finale Elongation	600 s	72 °C	
Halten		4 °C	

Der Primer P3 forward setzt am Beginn der Sequenz für den Twin-Strep-tag an, während der Primer P4 reverse am Stopcodon der hTGase 2-cDNS ansetzt. So resultiert die Sequenz für ein Fusionsprotein aus NTST, Thrombinschnittstelle und hTGase 2. Das erhaltene Konstrukt pT7-7/NTST-hTGase 2 wurde erfolgreich zur rekombinanten prokaryotischen Expression in *E. coli* verwendet.

13.2. Agarose-Gelelektrophorese

Für analytische und präparative Zwecke wurden DNS-Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese separiert. Agarose-Gele wurden mit 0,7% Agarose in TAE-Puffer hergestellt und die Elektrophorese in TAE-Puffer für 40-60 min bei 90-120 V durchgeführt. Als Komigrationsmarker wurde GeneRuler 1kb DNA Ladder verwendet; als Probenpuffer kam 6x DNA loading dye zum Einsatz. Nach erfolgter Separierung der DNS-Bestandteile wurden diese mit 0,01%-iger peqGREEN-Lösung in TAE-Puffer für 30 min bei RT angefärbt und mit Hilfe eines LI-COR Odyssey Fc visualisiert.

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurden die DNS-Banden entsprechender Größe mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des GeneJET Gelextraktions Kits gemäß Herstellerprotokoll isoliert. Die isolierte DNS wurde dabei mit dem kleinstmöglichen Volumen an Elutionspuffer eluiert, um höchstmögliche DNS-Konzentrationen zu erreichen. Der Gehalt von DNS-Proben wurde mittels eines NanoDrop 2000c Spektrophotometers quantifiziert. Auf diese Weise aufgereinigte DNS wurde entweder unverzüglich verwendet oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

13.3. Restriktionsverdau von DNS

Die durch PCR erhaltenen und wie in Kapitel IV.13.2. beschrieben aufgereinigten DNS-Inserts wurden ebenso wie die entsprechend aufnehmenden Expressionsvektoren durch je zwei Restriktionsendonukleasen *NheI* und *XhoI* bzw. *NdeI* und *HindIII* verdaut (s. u.), um passende klebrige Enden (*engl.* sticky ends) für die nachfolgende Ligation zu erhalten.

Tabelle 24 Reaktionsansatz zum Restriktionsverdau im Zuge der Generierung von pCEP-Pu/BM40SP-NTST-hTGase 2

10x FastDigest-Puffer	5 µL
FastDigest <i>NheI</i>	3 µL
FastDigest <i>XhoI</i>	3 µL
DNS (PCR Produkt oder Vektor)	1 µg
Wasser	ad 50 µL

Tabelle 25 Reaktionsansatz zum Restriktionsverdau im Zuge der Generierung von pT7-7/hTGase 2

10x Tango Puffer	5 µL
<i>NdeI</i>	2 µL
<i>HindIII</i>	2 µL
DNS (PCR Produkt oder Vektor)	1 µg
Wasser	ad 50 µL

Der DNS-Verdau wurde mit den jeweils beiden Restriktionsendonukleasen im gleichen Reaktionsgefäß für 20 min (im Fall der FastDigest Enzyme) oder 60 min bei 37 °C durchgeführt und durch anschließende Hitzeinaktivierung für 5 min (im Fall der FastDigest Enzyme) oder 20 min bei 80 °C terminiert.

13.4. Ligation

Die verdauten DNS-Inserts sowie die verdauten und dadurch linearisierten Expressionsvektoren wurden unter Verwendung von T4-DNS-Ligase nach Angaben des Herstellers ligiert. Ein molares Vektor-zu-Insert-Verhältnis von 1:3 wurde gewählt und die benötigten DNS-Mengen wurden mithilfe des Ligation Calculator Tools berechnet. Die Reaktionsansätze waren wie folgt:

10x T4 DNS Ligase Puffer	2 μ L
PCR-Produkt, verdaut	3x Vektormenge (molares Verhältnis)
Vektor, verdaut	10-30 ng
T4-DNS-Ligase (5 U/ μ L)	2 μ L
Wasser	ad 20 μ L

Die verwendeten Reagenzien wurden gründlich gemischt und für 60 min bei RT inkubiert, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65 °C. Die erhaltene DNS wurde entweder unverzüglich verwendet oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

13.5. Generierung von chemisch kompetenten *E. coli*

Die Generierung chemisch kompetenter Zellen erfolgte über einen Zeitraum von drei Tagen. Zunächst wurden 25 μ L *E. coli* TopTen auf einer Agarplatte ohne Antibiotikum verteilt und über Nacht bei 37 °C im Infors Minitron inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine einzelne Kolonie gepickt und in 5 mL LB-Medium ohne Antibiotikum transferiert und wieder über Nacht bei 37 °C im Infors Minitron inkubiert. Zu Beginn des dritten Tages wurde 1 mL dieser Übernachtskultur verwendet um 100 mL LB-Medium ohne Antibiotikum anzupflanzen, die dann für 3 h bei 37 °C im Infors Minitron inkubiert wurden. Die Kultur wurde anschließend auf zwei 50 mL Falcongefäße aufgeteilt, für 10 min auf Eis gestellt und anschließend in der vorher auf 4 °C vorgekühlten Eppendorf 5415 Zentrifuge für 3 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die beiden Pellets vorsichtig in je 10 mL kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Suspensionen wurden vereinigt und für 20 min auf Eis inkubiert, bevor sie erneut wie oben beschrieben zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 5 mL kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 15% Glycerol

resuspendiert, zu je 100 μL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

13.6. Transformation in *E. coli*

Das finale DNS-Produkt nach Ligation bzw. die später aufgereinigte DNS wurden zu analytischen Zwecken und zur DNS-Amplifikation in *E. coli* TopTen oder zur Proteinexpression in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Dazu wurden chemisch kompetente Bakterien, die in 100 μL -Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden, auf Eis aufgetaut, anschließend 10 μL des Ligationsansatzes bzw. 100 ng aufgereinigte DNS hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Eppendorf Thermomixer Comfort erfolgte anschließend ein Hitzeschock von $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30-60 s, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 2 min auf Eis. Danach wurden 250 μL antibiotikafreies LB-Medium zugegeben und das Gemisch für 50-60 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 1400 rpm im Eppendorf Thermomixer Comfort inkubiert. In dieser Zeit erfolgte eine Proliferation der Bakterien und eine Translation des Ampicillin-Resistenzgens in denjenigen Bakterien, die das jeweilige Plasmid aufgenommen hatten. Zur Selektion der Plasmid-tragenden Bakterien wurde die Bakterienkultur auf LB-Agarplatten, die 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin enthielten, aufgetragen und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

13.7. Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien

Um die erfolgreiche Klonierung der Plasmid-DNS zu überprüfen, wurden einzelne Bakterienkolonien von der Agarplatte gepickt, in je 5 mL LB-Amp-Medium transferiert und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm im Infors Minitron inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 2 mL der Bakterienkulturen entnommen und mit dem NucleoSpin Plasmid DNS extraction kit gemäß Herstellerprotokoll behandelt. Um eine größtmögliche Konzentration zu erreichen, wurden kleinstmögliche Volumina an Elutionspuffer verwendet. Der Gehalt der so erhaltenen Plasmid-DNS wurde am Nanodrop 200c quantifiziert und entweder unverzüglich verwendet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Plasmid-DNS der getesteten Klone wurde via Agarose-Gelelektrophorese auf Reinheit getestet und ihr Molekulargewicht anhand des Komigrationsstandards abgeschätzt. Klone, die Plasmid-DNS von passender Größe enthielten, wurden – um präparative Mengen an DNS zu erhalten – in je 250 mL LB-Amp-Medium gegeben und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm im Infors

Minitron inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNS erfolgte am nächsten Tag mittels NucleoBond Midi DNS extraction kit gemäß Herstellerprotokoll. So erhaltene Plasmid-DNS wurde unter Verwendung eines T7-Primers bei GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) via Kettenabbruch-Synthese nach Sanger sequenziert (186). Die Analyseergebnisse wurden mithilfe der Freeware SeqScanner visualisiert und die Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz mittels des blastn Online Tools überprüft.

13.8. Expression von hTGase 2 in *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) wurden wie in Kapitel IV.13.6. beschrieben mit pT7-7/hTGase 2 transformiert und die auf der Agarplatte gewachsene Klone maximal 7 Tage für die Inokulation der Kulturen verwendet, um die Wachstumsgeschwindigkeit und die Proteinausbeute zu maximieren. Einzelne Klone wurden hierzu von der Agarplatte gepickt und in 250 mL LB-Amp-Medium über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Infors Minitron inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine OD₆₀₀ dieser Vorkultur am Nanodrop gemessen; die Vorkultur wurde nachfolgend verwendet, um 4x1 L LB-Amp-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 einzustellen. Diese Hauptkultur wurde bei 37 °C und 200 rpm solange inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreicht wurde. Danach erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 0,05 mM IPTG. Nach 3 h wurden die Bakterien in einer Sorvall HC5B-Zentrifuge und einem SLA-3000 Rotor für 10 min bei 4 °C und 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die resultierenden Bakterien-Pellets wurden in 15-20 mL Waschpuffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

14. Proteinbiochemische Methoden

Alle proteinbiochemischen Experimente wurden mit deionisiertem, doppelt destilliertem und autoklaviertem Wasser durchgeführt. Alle Puffer, die Anwendung bei der ÄKTApurifizierung fanden, wurden vor Verwendung unter Verwendung einer Vakuumpumpe und einer Membran mit 0,22 µm Porengröße sterilfiltriert und entgast. Zur Entgasung wurde der jeweilige Puffer mit einem Magnetrührfisch versehen und unter Vakuum für mindestens 30 min bei etwa 100 bis 200 rpm gerührt, um gelöste Luft aus dem Puffer zu entfernen.

14.1. Zellaufschluss von Bakterien

Die Bakteriensuspension aus Kapitel IV.13.8. wurde in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, mit 1 mg/mL Lysozym und 0,5 mM PMSF versetzt und für 30 min bei 37 °C und 200 rpm im Infors Minitron inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei -80 °C eingefroren und im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Um die Viskosität der erhaltenen Probe zu verringern, wurden 0,5 mg/mL DNase I und 1 M MgSO₄ zugegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 30 min bei 37 °C und 200 rpm. Zur Abscheidung von Zellwandbestandteilen wurde die Probe in einer Sorvall HC5B-Zentrifuge mit einem SS-34- Rotor für 20 min bei 4 °C und 20000 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde umgehend weiterverarbeitet, das Pellet wurde verworfen.

14.2. Aufreinigung der rekombinanten hTGase 2

Die Aufreinigung der rekombinanten hTGase 2 wurde mit einer GE Healthcare ÄKTApurifier UPC-10 FPLC-Anlage unter Zuhilfenahme der Bedienungssoftware Unicorn durchgeführt. Der maximale Druck, der an der Säule anlag, wurde auf 0,50 MPa und die maximale Fließgeschwindigkeit auf 3 mL/min eingestellt. Zur Überwachung wurden durchgehend die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm und die Leitfähigkeit überprüft.

In einem ersten Schritt wurde das durch Zellaufschluss erhaltene Lysat in einen 50 mL Superloop gefüllt und auf eine 5 mL Strep-Tactin Superflow-Säule geladen. Anschließend wurde ungebundenes Protein mit 20-30 mL Waschpuffer von der Säule gewaschen. Nach Erreichen einer stabilen niedrigen UV-Absorption über ein Volumen von mindestens 5 mL wurde das NTST-hTGase 2-Fusionsprotein mit 15-20 mL Elutionspuffer von der Säule eluiert und das Eluat in Fraktionen von 0,5 mL gesammelt. Abschließend wurde die Säule mit jeweils 30 mL Regenerationspuffer und Waschpuffer regeneriert und für die nächste Anwendung reäquilibriert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und mittels AMICON® Ultra-Zentrifugalfilter (15 mL) mit einer 30 kDa Untergrenze aufkonzentriert. Das Aufkonzentrieren erfolgte in 10 min-Schritten bei 5000 rcf in einer Eppendorf 5415 Zentrifuge bei 4 °C bis ein Volumen $\leq 1,5$ mL erreicht war. Anschließend erfolgte ein Umpuffern der Proteinlösung mit EP1, EP2 oder EP3, je nach geplanter Verwendung der Enzymcharge. Dazu wurde die konzentrierte Proteinlösung mit dem entsprechenden Puffer auf 15 mL aufgefüllt und wieder in 10 min-Schritten bei 5000 rcf zentrifugiert bis ein Volumen $\leq 1,5$ mL erreicht war. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, um einen

Pufferaustausch von 99 % zu gewährleisten. Die erhaltene Proteinlösung wurde entweder unverzüglich verwendet oder in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

14.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration der rekombinanten hTGase 2 wurde ein Protein-Assay nach Bradford durchgeführt (187). Dabei wird Coomassie Brilliantblau G250 verwendet, das nach unspezifischer Bindung an Proteine eine Farbänderung von orange nach blau bewirkt. Die Absorption der Analysenlösung wurde bei 595 nm im Synergy 2 bestimmt und mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von BSA als Vergleichsprotein quantifiziert. Je 20 µL einer hTGase 2 Lösung, die 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 in entsprechendem Enzympuffer verdünnt war, sowie einer Lösung von BSA (0-200 µg/mL) in Wasser mit 0,1 % (m/v) Natriumazid wurden in jeder Messung im Triplikat vermessen. Die Gehaltsberechnung erfolgte als Mittelwert aller gemessenen Verdünnungen.

14.4. Bestimmung der Proteinreinheit

Um den Grad der Proteinreinheit bzw. die Menge der Verunreinigungen abschätzen zu können, wurde jede Charge aufgereinigter hTGase 2 in einer SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (266) untersucht. Dafür wurden zweiphasige Gele aus einem etwa 1,5 cm breiten Sammelgel und einem etwa 6 cm breiten Trenngel hergestellt, die 4% (m/v) bzw. 10% (m/v) Acrylamid (enthält Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 29:1) enthielten. Das Trenngel wurde auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt, das Sammelgel auf einen pH-Wert von 8,8. Zur Gelbildung wurden 0,1% (m/v) APS als Initiator einer radikalischen Polymerisation sowie 0,1% (v/v) TEMED als Polymerisationskatalysator und zusammen mit dem enthaltenen Bisacrylamid zur Bildung von Quervernetzungen verwendet (266).

Die konzentrierten Proteinproben wurden in dem entsprechenden Enzympuffer verdünnt, um Konzentrationen zwischen 5 und 50 ng/µL zu erhalten. Je 18 µL dieser verdünnten Proben wurden mit je 6 µL des 3x SDS-Probenpuffers versetzt und zur vollständigen Denaturierung der enthaltenen Proteine im Thermomixer Comfort für 10 min auf 95 °C erhitzt. Je 10 µL dieser aufbereiteten Proben wurden neben 6 µL Komigrationsstandard auf das SDS-Gel geladen und für 40-60 min einem elektrischen Feld mit einer Spannung von 120-160 V ausgesetzt. Anschließend wurde das Sammelgel entfernt, das Trenngel für 3x10 min in

Wasser gewaschen bevor es für 30-60 min mit kolloidalem Coomassie Brilliantblau G-250 angefärbt wurde (267).

Das gefärbte Gel wurde wiederum für 3x10 min mit Wasser gewaschen und die angefärbten Proteinbanden mit dem LI-COR Odyssey Fc dokumentiert.

14.5. Bestimmung der Proteinidentität

Zur Absicherung der Proteinidentität wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Proteinproben in einem Konzentrationsbereich von 10-100 ng/lane via SDS-PAGE (40-60 min bei 120-160 V) nach ihrer Größe aufgetrennt (siehe Kapitel IV.14.4.) und anschließend von dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen.

Dazu wurde ein Sandwich-Verfahren im Tank genutzt. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 10 s in Methanol, 5 min in Wasser und 10 min in Transferpuffer (20% Methanol, Boratpuffer) behandelt. Anschließend wurde das Sandwich für den Transfer wie folgt aufgebaut:

Kathode
Schwamm
Whatman-Filterpapier
SDS-Gel
Membran
Whatman-Filterpapier
Schwamm
Anode

Die Elektrophoresekammer wurde auf einem Magnetrührer platziert und mit einem Magnetrührfisch sowie einem Kühlakku versehen. Anschließend wurde die Blotting-Kammer eingesetzt und die Elektrophoresekammer bis zur Markierung mit Transferpuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur bei 300 mA. Die Membran wurde anschließend mit 5% (m/v) Magermilchpulver in TBS (1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C) behandelt, um die gesamte Oberfläche der Membran mit Protein zu besetzen und so unspezifische Signale in den nachfolgenden Schritten zu minimieren. Zur Detektion des hTGase 2-Proteins mit N-terminalem Twin-Strep-tag wurden spezifische, monoklonale Primärantikörper verwendet, die entweder gegen hTGase 2 oder gegen den Twin-Strep-tag gerichtet waren. Diese Primärantikörper wurden wiederum mit einem Sekundärantikörper-HRP-Konjugat detektiert. Alle Antikörper wurden in einer Suspension aus 5% (m/v)

Magermilchpulver in TBS verdünnt und für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Zwischen sämtlichen Schritten erfolgten jeweils 3 Waschschriffe von je 10 min in TBS-T. Zur Visualisierung mittels Chemilumineszenz im LI-COR Odyssey Fc wurde Pierce ECL-Western-Blotting-Substrat verwendet.

15. Transamidaseassay

Der Transamidase verfolgt den Anstieg der Fluoreszenzanisotropie im Verlauf der Reaktion von DMC mit den fluoreszierenden Substraten F-Cad, R-S-Cad und R-I-Cad bei $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$ (F-Cad) oder bei $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$ (R-S-Cad und R-I-Cad). Alle Messungen wurden in schwarzen 96-Well-Platten (F-Bottom) bei einer Temperatur von 30 °C im Synergy 2 durchgeführt. Der jeweilige Assaypuffer (AP1 bei allen Anwendungen zum Transamidaseassay, AP2 bei allen calciumfreien Anwendungen des GTP-Bindungsassays oder AP3 bei allen Anwendungen, bei denen die Calciumionenkonzentration variiert oder auf 0,5 mM eingestellt wurde) wurde vor jedem Experiment in einem Wasserbad auf 30 °C erwärmt. Die Enzympuffer wurden DTT-frei hergestellt und bei 4 °C gelagert; etwa einmal wöchentlich wurde Enzympuffer mit einer entsprechenden Menge DTT versetzt, um die gewünschte DTT-Konzentration zu erreichen. Alle Enzympuffer wurden eiskalt verwendet. Stammlösungen aller verwendeten Transglutaminase (gpTGase 2, hTGase 1, hTGase 2, hTGase 3, hTGase 6 und hfXIIIa) wurden in dem zum Experiment passenden Enzympuffer (EP1, EP2 oder EP3 analog den Assaypuffern AP1-AP3) hergestellt und mit ebendiesem vor jedem Experiment auf die jeweils angegebene Konzentration verdünnt. Die DMC-Stammlösung wurde, das durch SDS-Page ermittelte Molekulargewicht von 30000 g/mol vorausgesetzt, im jeweiligen Assaypuffer (AP1, AP2 oder AP3) in einer Konzentration von 2,5 mM hergestellt. Stammlösungen der Cadaverin-Derivate, F-Cad, R-S-Cad und R-I-Cad, wurden in wasserfreiem DMSO ($\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich, Artikelnummer 276855) in einer Konzentration von 1,62 mM hergestellt. Die Stammlösungen des Iodacetamids und *N*^ε-Acryloyl-lysinpiperazide wurden ebenfalls in wasserfreiem DMSO zu 50 mM bzw. zu 20 mM hergestellt. GTP wurde in Wasser zu 10 mM gelöst. Alle Verdünnungen erfolgten mit dem gleichen Puffer oder Lösungsmittel, in dem die Stammlösungen hergestellt wurden. Dabei wurden AP1-AP3 mit einer Temperatur von 30 °C, DMSO und Wasser bei RT und EP1-EP3 eiskalt verwendet.

Alle Experimente wurden in einem Assayvolumen von 200 μL in Anwesenheit von 5% (v/v) DMSO und einer Vorinkubationszeit von 30 min durchgeführt. Abweichungen von diesen Bedingungen sind nachfolgend entsprechend aufgeführt. Das Assaygemisch setzte sich aus 130 μL des verwendeten Assaypuffers, 50 μL DMC, 5 μL des verwendeten Cadaverin-Derivats, 5 μL Inhibitor oder DMSO und 10 μL TGase oder entsprechendem Enzympuffer zusammen. Die Hemmung der gpTGase 2 durch GTP wurde wie von Case et al. beschrieben in 50 mM HEPES pH 7,4, 500 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 durchgeführt (198). Hierbei setzte sich das Assaygemisch aus 125 μL Assaypuffer, 50 μL DMC, 5 μL des entsprechenden Cadaverin-Derivats, 5 μL DMSO, 5 μL GTP oder Wasser und 10 μL TGase oder entsprechendem Enzympuffer zusammen.

Die Reaktionen wurden nach der Vorinkubation gestartet und die FA für einen Zeitraum von 15 min gemessen. Alle Experimente wurden im Duplikat oder Triplikat in je drei separaten Experimenten durchgeführt; Ausnahmen sind entsprechend gekennzeichnet.

15.1. Bestimmung der Fluoreszenzintensität der Cadaverin-Derivate

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der eingesetzten Konzentration des jeweiligen Cadaverinderivats wurde in Abwesenheit von TGase und DMC untersucht indem 5 μL Cadaverinderivat (finale Konzentration 0,406-4,06 μM) zu 180 μL AP1, 10 μL EP1 und 5 μL DMSO gegeben wurden. Die Fluoreszenz wurde bei $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$ für F-Cad und $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$ für R-S-Cad und R-I-Cad über eine Zeit von 20 min gemessen und der letzte gemessene Wert gegen die Konzentration der Cadaverinderivate aufgetragen, um den Bereich zu bestimmen, in dem sich die Fluoreszenz proportional zur Konzentration des fluoreszierenden Substrates verhält. Alle Ansätze wurden in drei separaten Experimenten im Triplikat durchgeführt.

15.2. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Enzymkonzentration

Um den Bereich der linearen Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Enzymkonzentration zu bestimmen, wurden 10 μM (für F-Cad und R-S-Cad) oder 30 μM (für R-I-Cad) DMC, 0,81 μM des jeweiligen Cadaverinderivats und 0-5 $\mu\text{g/mL}$ TGase 2 eingesetzt. Die Reaktion wurde nach Vorinkubation durch die Zugabe von DMC gestartet und die FA über einen Zeitraum von 15 min verfolgt. Die erhaltenen FA-Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen

und mittels linearer Regression ausgewertet; die Anstiege der Geraden wurden gegen die eingesetzten Enzymkonzentrationen aufgetragen. Die Vorinkubationszeit betrug für alle eingesetzten Enzyme (hTGase 1, gpTGase 2, hTGase 2, hTGase 3, hTGase 6, hFXIIIa) 30 min. Alle Ansätze wurden in drei separaten Experimenten im Triplikate durchgeführt.

15.3. Charakterisierung der Enzym-Substrat-Interaktion

Um die Interaktion der TGasen 1, 2, 3, 6 und FXIIIa mit ihren Substraten zu charakterisieren, wurden die Michaelis-Konstante, K_m , die Dissoziations-Konstante, K_i , und die maximale Umsatzgeschwindigkeit, V_{max} , für DMC in Abhängigkeit vom verwendeten Cadaverinderivat bestimmt. Dazu wurden 0,3-300 μM DMC, 0,81 μM Cadaverin-Derivat und 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hTGase 2 bzw. 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gpTGase 2, hTGase 2, hTGase 3, hTGase 6 oder hFXIIIa eingesetzt und die Reaktion nach 30-minütiger Vorinkubation durch Zugabe von Enzym gestartet und für 15 min verfolgt. Die Steigung, die sich aus der Auftragung der FA-Werte gegen die Zeit ergab, wurde gegen die eingesetzte DMC-Konzentration aufgetragen und anschließend einer nicht-linearen Regression nach der Michaelis-Menten-Gleichung (für F-Cad, Gl. 3) oder nach der Gleichung für Substrathemmung (211) (für R-S-Cad und R-I-Cad, Gl. 4) unterworfen, um die Parameter K_m , K_i und V_{max} zu erhalten. Zur vergleichenden Darstellung der unterschiedlichen humanen TGasen wurden die erhaltenen Aktivitätswerte vor der Auftragung durch die eingesetzte Enzymkonzentration dividiert. Zusätzlich wurden Kontrollexperimente ohne Zugabe von TGase 2 und stattdessen EP1 durchgeführt. Alle Ansätze wurden in drei separaten Experimenten im Triplikate durchgeführt.

Der Einfluss variierender Konzentrationen der Cadaverin-Derivate auf die Enzymaktivität wurde untersucht, indem 10 μM (F-Cad und R-S-Cad) oder 30 μM DMC (R-I-Cad), 0,000162-4,06 μM Cadaverin-Derivat und 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gpTGase 2 oder hTGase 2 verwendet wurden. Die Auswertung erfolgte wie für die Experimente mit variierender DMC-Konzentration beschrieben. Zusätzlich wurden Kontrollexperimente ohne Zugabe von TGase 2 und stattdessen EP1 durchgeführt. Alle Ansätze wurden in drei separaten Experimenten im Triplikate durchgeführt.

15.4. Hemmung von TGase 2 – Validierung des Transamidaseassays

Zur Validierung des TGase 2-Transamidaseassays wurde die Hemmung des Enzyms mit literaturbekannten Inhibitoren untersucht (138, 161). Hierfür wurden 10 μM DMC (F-Cad und R-S-Cad) oder 30 μM DMC (R-I-Cad), 0,81 μM Cadaverin-Derivat, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gpTGase 2 oder hTGase 2 und 0,0001-10 μM Iodacetamid, 0,001-30 μM **34** oder 0,1-3000 μM GTP verwendet. Die Reaktion wurde hier nach 30-minütiger Vorinkubation durch Zugabe von DMC gestartet und über einen Zeitraum von 15 min verfolgt. Die den Primärkurven entnommenen Steigungen wurden gegen die eingesetzten Inhibitor-Konzentrationen aufgetragen und durch nicht-lineare Regression nach Gl. 6 ausgewertet, um die Konzentration halbmaximaler Hemmung, IC_{50} , sowie den Hill-Koeffizienten, n_{H} , zu bestimmen. Alle Ansätze wurden in drei separaten Experimenten im Triplikat durchgeführt.

15.5. Eignung des Transamidaseassays für das Hochdurchsatz-Screening

Um die Eignung des Transamidaseassays für das Screening von Substanzbibliotheken zu bestimmen, wurde die Reproduzierbarkeit des Assays untersucht. Dazu wurden in Anwesenheit von 3 mM bzw. 0,5 mM CaCl_2 30 μM DMC, 0,81 μM R-I-Cad, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gpTGase 2 und 10 μM Iodacetamid (Aktivitätswerte für vollständige Hemmung) bzw. DMSO (Aktivitätswerte für volle Aktivität) verwendet. Die Reaktion wurde nach 30-minütiger Vorinkubation durch Zugabe von DMC gestartet und über einen Zeitraum von 15 min verfolgt. Hierbei wurden in 3 separaten Experimenten je 24 Wells, welche entweder vollständig gehemmt oder ungehemmt Enzym enthielten, untersucht. Die Aktivitäten wurden mittels linearer Regression ermittelt und der Z' -Faktor als Maß der Reproduzierbarkeit mit Hilfe von Gl. 8 berechnet.

15.6. Hemmung von TGase 2 – N^{E} -Acryloyl-lysinpiperazide

Die Untersuchung der Hemmstärke der N^{E} -Acryloyl-lysinpiperazide an gpTGase 2 wurde wie in Kapitel IV.15.4. für Substanz **34** beschrieben durchgeführt. Die Hemmung der hTGase 2 wurde dagegen mit 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ statt mit 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durchgeführt. In überwiegender Mehrheit wurde der Konzentrationsbereich 0,001-30 μM verwendet, für Substanzen, die eine geringere Hemmwirkung zeigten, der Bereich 0,003-100 μM . Für gpTGase 2 wurde F-Cad als

Acylakzeptorsubstrat verwendet, für hTGase 2 kam R-I-Cad zum Einsatz. Die Vorinkubationszeit bei gpTGase 2 betrug 30 min, bei hTGase 2 hingegen 5 min. Alle Ansätze wurden in drei separaten Experimenten im Duplikat (hTGase 2) oder Triplikat (gpTGase 2) durchgeführt.

15.7. Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration

Die Bestimmung des Gehalts aktiver TGase 2 an der gesamten Enzymmenge erfolgte in indirekter Weise durch die Hemmung mit Iodacetamid. So wurde zunächst ein reguläres Hemmexperiment, wie in Kapitel IV.15.6. beschrieben, mit 0,3-300 nM Iodacetamid durchgeführt und die resultierenden Aktivitäten mittels linearer Regression ermittelt. Anschließend wurden die Aktivitäten bei Inhibitorkonzentrationen unterhalb (0,3-30 nM) sowie oberhalb (100-300 μ M) der erwarteten aktiven Enzymmenge jeweils separaten linearen Regressionen unterzogen. Im mittels Gl. 7 ermittelten Schnittpunkt beider Geraden wurde ein Lot auf die X-Achse gefällt. Diese Konzentration entspricht der aktiven Enzymkonzentration.

15.8. Untersuchung des Wirkmechanismus der N^{ϵ} -Acryloyl-lysinepiperazide

Der Hemmmechanismus der N^{ϵ} -Acryloyl-lysinepiperazide wurde stellvertretend für Substanz **34** in einem Sprung-Verdünnungs-Experiment untersucht. Dafür wurden wurden 500 μ g/mL gpTGase 2 (100-fache Enzymkonzentration) und 30 μ M **34** (\approx 100-facher IC_{50}) für 30 min bei 30 °C im in einem Eppendorf-Gefäß im Thermomixer comfort vorinkubiert, in eine 96-Well Platte überführt und dann mit Assaypuffer und F-Cad 100-fach verdünnt, um Konzentrationen wie in einem regulären Hemmversuch zu erreichen. Die Reaktion wurde schließlich mit der Zugabe von DMC gestartet und für 15 min verfolgt. Anschließend folgte eine Aktivitätsbestimmung mittels linearer Regression. Als Kontrollexperiment wurde eine Enzymhemmung durch eine Inhibitorkonzentration, die etwa dem IC_{50} entspricht (300 nM), verwendet. Das Assaygemisch enthielt dabei 10 μ M DMC, 0,81 μ M F-Cad, 0,3 μ M **34** und 5 μ g/mL gpTGase 2. Das Experiment wurde in drei separaten Experimenten im Triplikat durchgeführt.

15.9. Bestimmung der Selektivität gegenüber anderen TGasen

Stellvertretend für die *N*^ε-Acryloyl-lysinpiperazide wurden **34** und **56** auf ihre Selektivität hinsichtlich der Hemmung verschiedener TGasen untersucht. Dazu wurde die Hemmung der humanen TGasen 1, 2, 3 und 6 sowie des humanen Faktors XIIIa durch die beiden genannten Inhibitoren analysiert. Das Assaygemisch enthielt hierfür 0,81 μM R-I-Cad, 0-30 μM Inhibitor, 2 μg/mL (hTGase 1) oder 5 μg/mL (hTGasen 2, 3, 6 und hfXIIIa) Enzym und Inhibitor und R-I-Cad wurden 30 min vorinkubiert, bevor die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 30 μM DMC gestartet und für 15 min verfolgt wurde. Zur übersichtlichen Darstellung wurden die ermittelten Aktivitätswerte (v) durch die Aktivität, die in Abwesenheit von Inhibitor ermittelt wurde (v_0), als v/v_0 gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen sowie das untere Plateau auf einen Wert von 0 festgelegt. Das Experiment wurde für alle TGasen in je drei separaten Experimenten im Duplikat durchgeführt.

15.10. Einfluss der Calciumionenkonzentration auf die Transamidaseaktivität von hTGase 2

Die Quantifikation des Einflusses der Calciumkonzentration auf die Enzymaktivität wurde durch Zugabe von CaCl₂ in steigenden Konzentrationen erreicht. Dazu wurde die Enzymaktivität von 5 μg/mL hTGase 2 mit 30 μM DMC und 0,81 μM R-I-Cad, sowie CaCl₂ in Konzentrationen zwischen $1 \cdot 10^{-6}$ und $1 \cdot 10^{-1}$ M bestimmt. Die Auswertung erfolgte analog zur Beschreibung in IV.15.2. durch Auftragung der ermittelten FA-Werte gegen die Zeit und anschließende lineare Regression. Danach wurde von den erhaltenen Werten das durch Gl. 9 ermittelte untere Plateau subtrahiert und das Ergebnis durch (oberes Plateau - unteres Plateau) dividiert, um eine relative Auftragung mit Werten zwischen 0 und 1 zu erreichen. Die so ermittelten Aktivitäten für jede Calciumionenkonzentration wurden gegen ebendiese Konzentration aufgetragen und mittels Gl. 6 zur Bestimmung des IC₅₀- bzw. hier des EC₅₀- Wertes (Konzentration, bei der eine halbmaximale Aktivierung auftritt) ausgewertet. Das Experiment wurde in vier separaten Experimenten im Triplikat durchgeführt.

16. GTP-Bindungsassay

Im GTP-Bindungsassay wird der Anstieg der Fluoreszenzanisotropie infolge der Bindung von fluoreszenzmarkierten Sonden an die GTP-Bindungsstelle der hTGase 2 gemessen. Zunächst wurden die Dissoziationskonstanten für die Bindung verschiedener Sonden an hTGase 2 bestimmt, um anschließend Verdrängungsexperimente mit literaturbekannten Nukleotiden oder neuentwickelten GDP-/GTP-Analoga (nachfolgend Inhibitoren genannt) durchzuführen. Alle Untersuchungen an der GTP-Bindungsstelle von hTGase 2 wurden bei $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$ in schwarzen 96-Well-Platten (F-Bottom) bei einer Temperatur von $30 \text{ }^\circ\text{C}$ im Synergy 2 durchgeführt. Die verwendeten Assay- und Enzympuffer waren AP2 und EP2 oder im Fall der Experimente mit variabler Calciumkonzentration AP3 und EP3. Dabei wurden die verwendeten Assaypuffer vor jedem Experiment auf $30 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert, die Enzympuffer eiskalt verwendet. Die Stammlösungen der hTGase 2 wurden nach Expression und Aufreinigung des Enzyms durch Umpufferung in die gewünschten EP2 oder EP3 in unterschiedlichen Konzentrationen erhalten, die fluoreszierenden Sonden sowie die Inhibitoren wurden zu 5 mM in Wasser gelöst. Alle beschriebenen Stammlösungen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Sämtliche Verdünnungen wurden mit dem gleichen Puffer bzw. Lösungsmittel, wie für die entsprechende Stammlösung verwendet, hergestellt.

Alle Experimente wurden in einem Assayvolumen von $100 \text{ }\mu\text{L}$ in Anwesenheit von 5% (v/v) DMSO durchgeführt. Das Assaygemisch setzte sich aus $75 \text{ }\mu\text{L}$ Assaypuffer, $5 \text{ }\mu\text{L}$ fluoreszierender Sonde, $5 \text{ }\mu\text{L}$ DMSO, $5 \text{ }\mu\text{L}$ Inhibitor oder Wasser und $10 \text{ }\mu\text{L}$ hTGase 2 oder Enzympuffer zusammen. Zur Untersuchung des Einflusses von Magnesium auf die Bindung wurden $5 \text{ }\mu\text{L}$ Assaypuffer durch $5 \text{ }\mu\text{L}$ MgCl_2 (finale Konzentration 10 mM) oder Wasser ersetzt.

Sofern fluoreszierende Sonden verwendet wurden, die bei steigender Konzentration von hTGase 2 eine Änderung der Fluoreszenzintensität zeigten, wurden die FA-Werte wie folgt korrigiert: über einen Zeitraum von 60 Minuten mit Messpunkten nach $0, 30$ und 60 Minuten wurden sowohl Fluoreszenzintensität als auch FA-Werte gemessen und beide separat gegen die eingesetzte hTGase 2-Konzentration aufgetragen. Diese Werte wurden mittels nicht-linearer Regression nach Gl. 9 ausgewertet, um die Werte für die Fluoreszenz des freien Liganden, Q_f , die Fluoreszenz des vollständig gebundenen Liganden, Q_b , sowie die FA-Werte des freien, A_f , und des vollständig gebundenen Liganden, A_b , zu ermitteln. Diese Werte wurden verwendet um die korrigierten FA-Werte, A_{corr} , gemäß Gl. 10 zu erhalten.

Alle weiteren Experimente wurden unter Verwendung der Sonde **71** durchgeführt, weshalb alle FA-Werte mit Gl. 9 und den Werten Q_f , Q_b , A_f und A_b , die für die Sonde **71** ermittelt wurden, korrigiert wurden. IC_{50} -Werte sowie die dazugehörigen Hill-Koeffizienten wurden unter Verwendung von Gl. 6 bestimmt. Alle Experimente wurden in drei separaten Experimenten im Duplikat oder Triplikat durchgeführt; Ausnahmen sind entsprechend gekennzeichnet.

16.1. Charakterisierung der fluoreszierenden Sonden.

Um die Dissoziationskonstanten, K_D , der fluoreszierenden Sonden an hTGase 2 zu ermitteln, wurden 50 nM der entsprechenden Sonde und 0,1-1000 nM hTGase 2 verwendet. Fluoreszenzintensität und FA wurden nach 0, 30 und 60 min gemessen. Die ermittelten FA-Werte wurden gemäß Gl. 10 korrigiert und durch nicht-lineare Regression nach Gl. 9 ausgewertet, um Dissoziationskonstante, K_D , und Verstärkungsfaktor, g , zu erhalten.

16.2. Verdrängungsexperimente – Validierung des GTP-Bindungsassays

Der GTP-Bindungsassay wurde durch Verdrängungsexperimente mit den literaturbekannten Nukleotiden GTP, GDP, ATP und dem Nukleotidanalogen GTP γ S validiert. Dazu wurden 300 nM hTGase 2, 50 nM der Sonde **71**, 0,0003-30 μ M GTP oder GTP γ S, 0,001-100 μ M GDP bzw. 0,3-30000 μ M ATP verwendet. Die Verdrängung der Sonden **68** und **71** wurden zudem in Anwesenheit von 10 mM MgCl₂ durchgeführt. Die nach 0, 30 und 60 min entnommenen FA-Werte wurden gemäß Gl. 10 korrigiert, gegen die eingesetzten Inhibitor-Konzentrationen aufgetragen und durch nicht-lineare Regression nach Gl. 6 ausgewertet, um den IC_{50} -Wert sowie den Hill-Koeffizienten, n_H , zu bestimmen.

16.3. Verdrängung durch GDP-/GTP-Analoga

Eine Substanzbibliothek neuer GDP-/GTP-Analoga aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jacek Jemielity (Center of New Technologies, Universität Warschau) wurde an der GTP-Bindungsstelle von hTGase 2 untersucht. Dazu wurden in Verdrängungsexperimenten 300 nM hTGase 2, 50 nM der Sonde 72 und 1 nM – 100 μ M der GDP-/GTP-Analoga verwendet, um IC_{50} -Werte zu ermitteln. Bei Substanzen mit geringer inhibitorischer Wirkung, d. h. höheren IC_{50} -Werten, wurde der untersuchte Konzentrationsbereich auf 3 nM – 300 μ M verschoben. Die Auswertung fand, wie in Kapitel IV.16.2. beschrieben, statt.

16.4. Einfluss der Calciumkonzentration auf die GTP-Bindungsfunktion von hTGase 2

Die Quantifizierung des Einflusses der Ca^{2+} -Konzentration auf die GTP-Bindung an hTGase 2 wurde durch Zugabe von $CaCl_2$ in steigenden Konzentrationen erreicht. Dazu wurden 300 nM hTGase 2, 50 nM der Sonde 71 sowie $CaCl_2$ in Konzentrationen zwischen $1 \cdot 10^{-6}$ und $1 \cdot 10^{-1}$ M eingesetzt und FA-Werte nach 60 min verwendet. Die Korrektur der Werte erfolgte wie in Kapitel IV.16. und Kapitel IV.16.1. beschrieben. Zur Auftragung wurden von den korrigierten FA-Werten, das durch Gl. 9 ermittelte untere Plateau subtrahiert und das Ergebnis durch (oberes Plateau - unteres Plateau) dividiert, um eine relative Auftragung mit Werten zwischen 0 und 1 zu erreichen.

16.5. Hemmung der GTP-Bindungsfunktion durch N^{ϵ} -Acryloyl-lysinpiperazide

Um zu bestimmen, ob und in welchem Ausmaß Hemmstoffe, die gegen das aktive Zentrum der hTGase 2 gerichtet sind, die GTP-Bindung beeinflussen, wurde die Bindung der Fluoreszenzsonde 71 an hTGase 2 in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der N^{ϵ} -Acryloyl-lysinpiperazide 34, 52 und 56 bestimmt. Dazu wurden 300 nM hTGase 2, 50 nM der Sonde 71 sowie 0,0003-30 μ M Inhibitor bei einer Calciumkonzentration von 0,5 mM verwendet.

16.6. Eignung zum Hochdurchsatz-Screening

Zur Demonstration der Eignung des GTP-Bindungsassays für Hochdurchsatzverfahren wurde der Z' -Faktor als Maß der Reproduzierbarkeit bestimmt. Dafür wurden in Ab- oder in Anwesenheit von 0,5 mM CaCl_2 300 nM hTGase 2, 50 nM der Sonde **71** und 30 μM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (GTP-Bindung bei vollständig blockierter Bindungsstelle) oder Wasser (GTP-Bindung bei vollkommen zugänglicher Bindungsstelle) verwendet. Für die Ca^{2+} -freie Variante wurden in 3 separaten Experimenten je 24 Wells mit dem Inhibitor $\text{GTP}\gamma\text{S}$ oder ohne Inhibitor (Zugabe von Wasser) vermessen. Die Untersuchungen in Anwesenheit von 0,5 mM CaCl_2 fanden in Form eines Experimentes statt. Der Z' -Faktor wurde anschließend, wie in Kapitel IV.15.5. beschrieben, berechnet.

Literaturverzeichnis

1. Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(2):140–56. 10.1038/nrm1014.
2. Grenard P, Bates MK, Aeschlimann D. Evolution of Transglutaminase Genes: Identification of a Transglutaminase Gene Cluster on Human Chromosome 15q15. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(35):33066–78. 10.1074/jbc.M102553200.
3. Walther DJ, Stahlberg S, Vowinckel J. Novel roles for biogenic monoamines: from monoamines in transglutaminase-mediated post-translational protein modification to monoaminylation deregulation diseases. *The FEBS Journal* 2011; 278(24):4740–55. 10.1111/j.1742-4658.2011.08347.x.
4. Ahvazi B, Boeshans KM, Idler W, Baxa U, Steinert PM, Rastinejad F. Structural Basis for the Coordinated Regulation of Transglutaminase 3 by Guanine Nucleotides and Calcium/Magnesium. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(8):7180–92. 10.1074/jbc.M312310200.
5. Candi E, Paradisi A, Terrinoni A, Pietroni V, Oddi S, Cadot B et al. Transglutaminase 5 is regulated by guanine–adenine nucleotides. *Biochem J* 2004; 381(1):313–9. 10.1042/BJ20031474.
6. Collighan RJ, Griffin M. Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications. *Amino Acids* 2009; 36(4):659–70. 10.1007/s00726-008-0190-y.
7. Del Duca S, Serafini-Fracassini D. Transglutaminases of higher, lower plants and fungi. *Progress in experimental tumor research* 2005; 38:223–47. 10.1159/000084243.
8. Serafini-Fracassini D, Del Duca S. Transglutaminases: Widespread Cross-linking Enzymes in Plants. *Ann Bot* 2008; 102(2):145–52. 10.1093/aob/mcn075.
9. Shibata T, Kawabata S-i. Transglutaminase in Invertebrates. In: Hitomi K, Kojima S, Fesus L, editors. *Transglutaminases: Multiple functional modifiers and targets for new drug discovery*. Tokyo: Springer; 2016. p. 117–27 .
10. Kanchan K, Fuxreiter M, Fésüs L. Physiological, pathological, and structural implications of non-enzymatic protein–protein interactions of the multifunctional human

- transglutaminase 2. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2015; 72(16):3009–35.
10.1007/s00018-015-1909-z.
11. Lorand L, Dailey JE, Turner PM. Fibronectin as a carrier for the transglutaminase from human erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85(4):1057–9. 10.1073/pnas.85.4.1057.
12. Akimov SS, Krylov D, Fleischman LF, Belkin AM. Tissue Transglutaminase Is an Integrin-Binding Adhesion Coreceptor for Fibronectin. *J Cell Biol* 2000; 148(4):825–38. 10.1083/jcb.148.4.825.
13. Zemskov EA, Janiak A, Hang J, Waghray A, Belkin AM. The role of tissue transglutaminase in cell-matrix interactions. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2006; 11:1057–76. 10.2741/1863.
14. Leiss M, Beckmann K, Girós A, Costell M, Fässler R. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Current Opinion in Cell Biology* 2008; 20(5):502–7. 10.1016/j.ceb.2008.06.001.
15. Verderio EAM, Scarpellini A, Johnson TS. Novel interactions of TG2 with heparan sulfate proteoglycans: reflection on physiological implications. *Amino Acids* 2008; 36(4):671. 10.1007/s00726-008-0134-6.
16. Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1991; 5(15):3071–7. 10.1096/fasebj.5.15.1683845.
17. Király R, Demény MA, Fésüs L. Protein transamidation by transglutaminase 2 in cells: a disputed Ca²⁺-dependent action of a multifunctional protein. *The FEBS Journal* 2011; 278(24):4717–39. 10.1111/j.1742-4658.2011.08345.x@10.1002/(ISSN)1742-4658(CAT)FreeReviewContent(VI)Reviews1011.
18. Pietsch M, Wodtke R, Pietzsch J, Löser R. Tissue transglutaminase: An emerging target for therapy and imaging. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2013; 23(24):6528–43. 10.1016/j.bmcl.2013.09.060.
19. Keillor JW, Clouthier CM, Apperley KYP, Akbar A, Mulani A. Acyl transfer mechanisms of tissue transglutaminase. *Bioorganic Chemistry* 2014; 57:186–97. 10.1016/j.bioorg.2014.06.003.

20. Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochemical Journal* 2002; 368(2):377. 10.1042/bj20021234.
21. Kumar S, Mehta K. Tissue Transglutaminase Constitutively Activates HIF-1 α Promoter and Nuclear Factor- κ B via a Non-Canonical Pathway. *PLOS ONE* 2012; 7(11):e49321. 10.1371/journal.pone.0049321.
22. Verderio E, Gaudry C, Gross S, Smith C, Downes S, Griffin M. Regulation of cell surface tissue transglutaminase: effects on matrix storage of latent transforming growth factor-beta binding protein-1. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1999; 47(11):1417–32. 10.1177/002215549904701108.
23. Pinkas DM, Strop P, Brunger AT, Khosla C. Transglutaminase 2 Undergoes a Large Conformational Change upon Activation. *PLOS Biology* 2007; 5(12):e327. 10.1371/journal.pbio.0050327.
24. Nakaoka H, Perez DM, Baek KJ, Das T, Husain A, Misono K et al. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science* 1994; 264(5165):1593–6. 10.1126/science.7911253.
25. Feng J-F, Rhee SG, Im M-J. Evidence That Phospholipase δ 1 Is the Effector in the Gh (Transglutaminase II)-mediated Signaling. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(28):16451–4. 10.1074/jbc.271.28.16451.
26. Im M-J, Russell MA, Feng J-F. Transglutaminase II: A New Class of GTP-Binding Protein with New Biological Functions. *Cellular Signalling* 1997; 9(7):477–82. 10.1016/S0898-6568(97)00049-1.
27. Fraij BM. GTP Hydrolysis by Human Tissue Transglutaminase Homologue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996; 218(1):45–9. 10.1006/bbrc.1996.0009.
28. Iismaa SE, Wu M-J, Nanda N, Church WB, Graham RM. GTP Binding and Signaling by Gh/Transglutaminase II Involves Distinct Residues in a Unique GTP-binding Pocket. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(24):18259–65. 10.1074/jbc.M000583200.
29. Vezza R, Habib A, FitzGerald GA. Differential signaling by the thromboxane receptor isoforms via the novel GTP-binding protein, Gh. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274(18):12774–9. 10.1074/jbc.274.18.12774.

30. Park ES, Won JH, Han KJ, Suh PG, Ryu SH, Lee HS et al. Phospholipase C-delta1 and oxytocin receptor signalling: evidence of its role as an effector. *Biochem J* 1998; 331 (Pt 1):283–9. 10.1042/bj3310283.
31. Hasegawa G, Suwa M, Ichikawa Y, Ohtsuka T, Kumagai S, Kikuchi M et al. A novel function of tissue-type transglutaminase: protein disulphide isomerase. *Biochemical Journal* 2003; 373(3):793. 10.1042/bj20021084.
32. Mishra S, Murphy LJ. Tissue Transglutaminase Has Intrinsic Kinase Activity. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(23):23863–8. 10.1074/jbc.M311919200.
33. Mishra S, Melino G, Murphy LJ. Transglutaminase 2 Kinase Activity Facilitates Protein Kinase A-induced Phosphorylation of Retinoblastoma Protein. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(25):18108–15. 10.1074/jbc.M607413200.
34. Mehta K. Mammalian transglutaminases: a family portrait. *Progress in experimental tumor research* 2005; 38:1–18. 10.1159/000084229.
35. Kim SY, Chung SI, Yoneda K, Steinert PM. Expression of Transglutaminase 1 in Human Epidermis. *The Journal of investigative dermatology* 1995; 104(2). 10.1111/1523-1747.ep12612769.
36. Sárdy M, Kárpáti S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *The Journal of experimental medicine* 2002; 195(6):747–57. 10.1084/jem.20011299.
37. Thomas H, Beck K, Adamczyk M, Aeschlimann P, Langley M, Oita RC et al. Transglutaminase 6: a protein associated with central nervous system development and motor function. *Amino Acids* 2013; 44(1):161–77. 10.1007/s00726-011-1091-z.
38. Iismaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM. Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiological reviews* 2009; 89(3):991–1023. 10.1152/physrev.00044.2008.
39. Park D, Choi SS, Ha K-S. Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments. *Amino Acids* 2010; 39(3):619–31. 10.1007/s00726-010-0500-z.
40. Belkin AM. Extracellular TG2: emerging functions and regulation. *The FEBS Journal* 2011; 278(24):4704–16. 10.1111/j.1742-4658.2011.08346.x.

41. Siegel M, Strnad P, Watts RE, Choi K, Jabri B, Omary MB et al. Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury. *PloS one* 2008; 3(3):e1861. 10.1371/journal.pone.0001861.
42. Jin X, Stammaes J, Klöck C, DiRaimondo TR, Sollid LM, Khosla C. Activation of extracellular transglutaminase 2 by thioredoxin. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286(43):37866–73. 10.1074/jbc.M111.287490.
43. Wang Z, Griffin M. TG2, a novel extracellular protein with multiple functions. *Amino Acids* 2012; 42(2):939–49. 10.1007/s00726-011-1008-x.
44. Lai T-S, Greenberg CS. TGM2 and implications for human disease: role of alternative splicing. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 2013; 18:504–19.
45. Piacentini M, Amendola A, Ciccocanti F, Falasca L, Farrace MG, Mastroberardino PG et al. Type 2 transglutaminase and cell death. *Progress in experimental tumor research* 2005; 38:58–74. 10.1159/000084233.
46. Knight CRL, Rees RC, Griffin M. Apoptosis: a potential role for cytosolic transglutaminase and its importance in tumour progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1991; 1096(4):312–8. 10.1016/0925-4439(91)90067-J.
47. Odii BO, Coussons P. Biological Functionalities of Transglutaminase 2 and the Possibility of Its Compensation by Other Members of the Transglutaminase Family. *The Scientific World Journal* 2014; 2014. 10.1155/2014/714561.
48. Murthy SN, Lomasney JW, Mak EC, Lorand L. Interactions of G(h)/transglutaminase with phospholipase Cdelta1 and with GTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96(21):11815–9. 10.1073/pnas.96.21.11815.
49. Akbar A, McNeil NMR, Albert MR, Ta V, Adhikary G, Bourgeois K et al. Structure-Activity Relationships of Potent, Targeted Covalent Inhibitors That Abolish Both the Transamidation and GTP Binding Activities of Human Tissue Transglutaminase. *Journal of medicinal chemistry* 2017; 60(18):7910–27. 10.1021/acs.jmedchem.7b01070.
50. Kerr C, Szmazinski H, Fisher ML, Nance B, Lakowicz JR, Akbar A et al. Transamidase site-targeted agents alter the conformation of the transglutaminase cancer stem cell survival protein to reduce GTP binding activity and cancer stem cell survival. *Oncogene* 2017; 36(21):2981. 10.1038/onc.2016.452.

51. Kuo T-F, Tatsukawa H, Kojima S. New insights into the functions and localization of nuclear transglutaminase 2. *The FEBS Journal* 2011; 278(24):4756–67. 10.1111/j.1742-4658.2011.08409.x.
52. Ballestar E, Abad C, Franco L. Core Histones Are Glutaminyl Substrates for Tissue Transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(31):18817–24. 10.1074/jbc.271.31.18817.
53. Verderio EAM, Johnson TS, Griffin M. Transglutaminases in wound healing and inflammation. *Progress in experimental tumor research* 2005; 38:89–114. 10.1159/000084235.
54. Beninati S, Piacentini M, Bergamini CM. Transglutaminase 2, a double face enzyme. *Amino Acids* 2017; 49(3):415–23. 10.1007/s00726-017-2394-5.
55. Smethurst PA, Griffin M. Measurement of tissue transglutaminase activity in a permeabilized cell system: its regulation by Ca²⁺ and nucleotides. *The Biochemical journal* 1996; 313 (Pt 3):803–8.
56. Bergamini CM, Dondi A, Lanzara V, Squerzanti M, Cervellati C, Montin K et al. Thermodynamics of binding of regulatory ligands to tissue transglutaminase. *Amino Acids* 2010; 39(1):297–304. 10.1007/s00726-009-0442-5.
57. Mastroberardino PG, Farrace MG, Viti I, Pavone F, Fimia GM, Melino G et al. “Tissue” transglutaminase contributes to the formation of disulphide bridges in proteins of mitochondrial respiratory complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2006; 1757(9):1357–65. 10.1016/j.bbabi.2006.07.007.
58. Datta S, Antonyak MA, Cerione RA. Importance of Ca(2+)-dependent transamidation activity in the protection afforded by tissue transglutaminase against doxorubicin-induced apoptosis. *Biochemistry* 2006; 45(44):13163–74. 10.1021/bi0606795.
59. Gundemir S, Colak G, Tucholski J, Johnson GVW. Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife. *Biochimica et biophysica acta* 2012; 1823(2):406–19. 10.1016/j.bbamcr.2011.09.012.
60. Stephens P, Grenard P, Aeschlimann P, Langley M, Blain E, Errington R et al. Crosslinking and G-protein functions of transglutaminase 2 contribute differentially to fibroblast wound healing responses. *Journal of cell science* 2004; 117(Pt 15):3389–403. 10.1242/jcs.01188.

61. Fok JY, Mehta K. Tissue transglutaminase induces the release of apoptosis inducing factor and results in apoptotic death of pancreatic cancer cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2007; 12(8):1455–63. 10.1007/s10495-007-0079-3.
62. Autuori F, Farrace MG, Oliverio S, Piredda L, Piacentini M. "Tissue" transglutaminase and apoptosis. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 1998; 62:129–36.
63. Molberg Ø, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nature Medicine* 1998; 4(6):713. 10.1038/nm0698-713.
64. Aleanzi M, Demonte AM, Esper C, Garcilazo S, Waggener M. Celiac Disease: Antibody Recognition against Native and Selectively Deamidated Gliadin Peptides. *Clinical Chemistry* 2001; 47(11):2023–8.
65. Fleckenstein B, Molberg Ø, Qiao S-W, Schmid DG, Mülbe Fvd, Elgstøen K et al. Gliadin T Cell Epitope Selection by Tissue Transglutaminase in Celiac Disease. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(37):34109–16. 10.1074/jbc.M204521200.
66. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3(7):797–801. 10.1038/nm0797-797.
67. Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annual review of immunology* 2000; 18:53–81. 10.1146/annurev.immunol.18.1.53.
68. Piper JL, Gray GM, Khosla C. High selectivity of human tissue transglutaminase for immunoactive gliadin peptides: implications for celiac sprue. *Biochemistry* 2002; 41(1):386–93. 10.1021/bi011715x.
69. Keller K-M. Klinische Symptomatik: "Zöliakie, ein Eisberg". *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2003; 151(7):706–14. 10.1007/s00112-003-0751-9.
70. Giersiepen K, Lelgemann M, Stuhldreher N, Ronfani L, Husby S, Koletzko S et al. Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: summary of an evidence report. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2012; 54(2):229–41. 10.1097/MPG.0b013e318216f2e5.
71. Barker JM, Liu E. Celiac Disease: Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Associated Autoimmune Conditions. *Advances in Pediatrics* 2008; 55(1):349–65. 10.1016/j.yapd.2008.07.001.

72. Rauhavirta T, Oittinen M, Kivistö R, Männistö PT, Garcia-Horsman JA, Wang Z et al. Are Transglutaminase 2 Inhibitors Able to Reduce Gliadin-Induced Toxicity Related to Celiac Disease? A Proof-of-Concept Study. *Journal of Clinical Immunology* 2013; 33(1):134–42. 10.1007/s10875-012-9745-5.
73. EU Clinical Trials Register. A phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled, dose-finding study on the efficacy and tolerability of a 6-week treatment with ZED1227 capsules vs. placebo in subjects with well-controlled celiac disease undergoing gluten challenge; 2018 [cited 2019 Nov 19]. Available from:
URL:<https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2017-002241-30/LT#P>.
74. Lorand L, Hsu LK, Siefring GE, Rafferty NS. Lens transglutaminase and cataract formation. *PNAS* 1981; 78(3):1356–60. 10.1073/pnas.78.3.1356.
75. Shridas P, Sharma Y, Balasubramanian D. Transglutaminase-mediated cross-linking of α -crystallin: structural and functional consequences. *FEBS Letters* 2001; 499(3):245–50. 10.1016/S0014-5793(01)02565-0.
76. Lee S-M, Jeong EM, Jeong J, Shin D-M, Lee H-J, Kim H-J et al. Cysteamine prevents the development of lens opacity in a rat model of selenite-induced cataract. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012; 53(3):1452–9. 10.1167/iovs.11-8636.
77. Kim DS, Collard HR, King Jr TE. Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2006; 3(4):285–92.
78. Olsen KC, Sapinoro RE, Kottmann RM, Kulkarni AA, Iismaa SE, Johnson GVW et al. Transglutaminase 2 and its role in pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011; 184(6):699–707. 10.1164/rccm.201101-0013OC.
79. Olsen KC, Epa AP, Kulkarni AA, Kottmann RM, McCarthy CE, Johnson GV et al. Inhibition of transglutaminase 2, a novel target for pulmonary fibrosis, by two small electrophilic molecules. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2014; 50(4):737–47. 10.1165/rcmb.2013-0092OC.
80. Johnson TS, El-Koraie AF, Skill NJ, Baddour NM, Nahas AME, Njlonma M et al. Tissue Transglutaminase and the Progression of Human Renal Scarring. *JASN* 2003; 14(8):2052–62. 10.1097/01.ASN.0000079614.63463.DD.

81. Schelling JR. Tissue transglutaminase inhibition as treatment for diabetic glomerular scarring: it's good to be glueless. *Kidney International* 2009; 76(4):363–5. 10.1038/ki.2009.179.
82. Johnson TS, Fisher M, Haylor JL, Hau Z, Skill NJ, Jones R et al. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2007; 18(12):3078–88. 10.1681/ASN.2006070690.
83. Huang L, Haylor JL, Hau Z, Jones RA, Vickers ME, Wagner B et al. Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy. *Kidney International* 2009; 76(4):383–94. 10.1038/ki.2009.230.
84. Wilhelmus MMM, Jager M de, Bakker ENTP, Drukarch B. Tissue Transglutaminase in Alzheimer's Disease: Involvement in Pathogenesis and its Potential as a Therapeutic Target. *Journal of Alzheimer's Disease* 2014; 42(s3):S289-S303. 10.3233/JAD-132492.
85. Ientile R, Currò M, Caccamo D. Transglutaminase 2 and neuroinflammation. *Amino Acids* 2015; 47(1):19–26. 10.1007/s00726-014-1864-2.
86. Johnson GVW, Cox TM, Lockhart JP, Zinnerman MD, Miller ML, Powers RE. Transglutaminase activity is increased in Alzheimer's disease brain. *Brain Research* 1997; 751(2):323–9. 10.1016/S0006-8993(96)01431-X.
87. Nemes Z, Fésüs L, Égerházi A, Keszthelyi A, Degrell IM. Nε(γ-glutamyl)lysine in cerebrospinal fluid marks Alzheimer type and vascular dementia. *Neurobiology of Aging* 2001; 22(3):403–6. 10.1016/S0197-4580(01)00224-X.
88. Wang D-S, Dickson DW, Malter JS. Tissue Transglutaminase, Protein Cross-linking and Alzheimer's Disease: Review and Views. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2008; 1(1):5–18.
89. Selkoe DJ. Introducing transglutaminase into the study of Alzheimer's disease. A personal look back. *Neurochemistry International* 2002; 40(1):13–6. 10.1016/S0197-0186(01)00057-2.
90. Muma NA. Transglutaminase Is Linked to Neurodegenerative Diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66(4):258–63. 10.1097/nen.0b013e31803d3b02.

91. Kumar A, Kumar Singh S, Kumar V, Kumar D, Agarwal S, Rana MK. Huntington's disease: An update of therapeutic strategies. *Gene* 2015; 556(2):91–7. 10.1016/j.gene.2014.11.022.
92. Walker FO. Huntington's disease. *The Lancet* 2007; 369(9557):218–28. 10.1016/S0140-6736(07)60111-1.
93. Walling HW, Baldassare JJ, Westfall TC. Molecular aspects of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience Research* 1998; 54(3):301–8. 10.1002/(SICI)1097-4547(19981101)54:3<301::AID-JNR1>3.0.CO;2-W.
94. Karpuj MV, Becher MW, Steinman L. Evidence for a role for transglutaminase in Huntington's disease and the potential therapeutic implications. *Neurochemistry International* 2002; 40(1):31–6. 10.1016/S0197-0186(01)00060-2.
95. Kahlem P, Green H, Djian P. Transglutaminase Action Imitates Huntington's Disease: Selective Polymerization of Huntingtin Containing Expanded Polyglutamine. *Molecular Cell* 1998; 1(4):595–601. 10.1016/S1097-2765(00)80059-3.
96. Igarashi S, Koide R, Shimohata T, Yamada M, Hayashi Y, Takano H et al. Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nat Genet* 1998; 18(2):111–7. 10.1038/ng0298-111.
97. Dedeoglu A, Kubilus JK, Jeitner TM, Matson SA, Bogdanov M, Kowall NW et al. Therapeutic Effects of Cystamine in a Murine Model of Huntington's Disease. *J. Neurosci.* 2002; 22(20):8942–50. 10.1523/JNEUROSCI.22-20-08942.2002.
98. Lau LML de, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* 2006; 5(6):525–35. 10.1016/S1474-4422(06)70471-9.
99. Andringa G, Lam KY, Chegary M, Wang X, Chase TN, Bennett MC. Tissue transglutaminase catalyzes the formation of alpha-synuclein crosslinks in Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004; 18(7):932–4. 10.1096/fj.03-0829fje.
100. Jeitner TM, Pinto JT, Krasnikov BF, Horswill M, Cooper AJL. Transglutaminases and neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry* 2009; 109:160–6. 10.1111/j.1471-4159.2009.05843.x.

101. Junn E, Ronchetti RD, Quezado MM, Kim S-Y, Mouradian MM. Tissue transglutaminase-induced aggregation of α -synuclein: Implications for Lewy body formation in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *PNAS* 2003; 100(4):2047–52. 10.1073/pnas.0438021100.
102. Stack EC, Ferro JL, Kim J, Del Signore SJ, Goodrich S, Matson S et al. Therapeutic attenuation of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurotoxin models of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2008; 1782(3):151–62. 10.1016/j.bbadis.2007.12.006.
103. Verhaar R, Jongenelen CAM, Gerard M, Baekelandt V, van Dam A-M, Wilhelmus MMM et al. Blockade of enzyme activity inhibits tissue transglutaminase-mediated transamidation of α -synuclein in a cellular model of Parkinson's disease. *Neurochemistry International* 2011; 58(7):785–93. 10.1016/j.neuint.2011.03.004.
104. Mastroberardino PG, Piacentini M. Type 2 transglutaminase in Huntington's disease: a double-edged sword with clinical potential. *Journal of internal medicine* 2010; 268(5):419–31. 10.1111/j.1365-2796.2010.02275.x.
105. Huang L, Xu A-M, Liu W. Transglutaminase 2 in cancer. *American Journal of Cancer Research* 2015; 5(9):2756–76.
106. Lentini A, Abbruzzese A, Provenzano B, Tabolacci C, Beninati S. Transglutaminases: key regulators of cancer metastasis. *Amino Acids* 2013; 44(1):25–32. 10.1007/s00726-012-1229-7.
107. Chhabra A, Verma A, Mehta K. Tissue Transglutaminase Promotes or Suppresses Tumors Depending on Cell Context. *Anticancer Res* 2009; 29(6):1909–19.
108. Eckert RL, Fisher ML, Grun D, Adhikary G, Xu W, Kerr C. Transglutaminase is a tumor cell and cancer stem cell survival factor. *Molecular Carcinogenesis* 2015; 54(10):947–58. 10.1002/mc.22375.
109. Tabolacci C, Martino A de, Mischiati C, Feriotto G, Beninati S. The Role of Tissue Transglutaminase in Cancer Cell Initiation, Survival and Progression. *Medical sciences (Basel, Switzerland)* 2019; 7(2). 10.3390/medsci7020019.
110. Haroon Z, Lai T, Hettasch J, Lindberg R, Dewhirst D, Greenberg C. Tissue transglutaminase is expressed as a host response to tumor invasion and inhibits tumor growth. *Lab Invest* 1999; 79(12):1679–86.

111. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine* 2010; 49(11):1603–16. 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
112. Kumar S, Mehta K. Tissue transglutaminase, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Amino Acids* 2013; 44(1):81–8. 10.1007/s00726-011-1139-0.
113. Antonyak MA, Jansen JM, Miller AM, Ly TK, Endo M, Cerione RA. Two isoforms of tissue transglutaminase mediate opposing cellular fates. *PNAS* 2006; 103(49):18609–14. 10.1073/pnas.0604844103.
114. Budillon A, Carbone C, Di Gennaro E. Tissue transglutaminase: a new target to reverse cancer drug resistance. *Amino Acids* 2013; 44(1):63–72. 10.1007/s00726-011-1167-9.
115. Agnihotri N, Mehta K. Transglutaminase-2: evolution from pedestrian protein to a promising therapeutic target. *Amino Acids* 2017; 49(3):425–39. 10.1007/s00726-016-2320-2.
116. Kang JH, Lee J-S, Hong D, Lee S-H, Kim N, Lee W-K et al. Renal cell carcinoma escapes death by p53 depletion through transglutaminase 2-chaperoned autophagy. *Cell Death Dis* 2016; 7(3):e2163-e2163. 10.1038/cddis.2016.14.
117. Antonyak MA, Singh US, Lee DA, Boehm JE, Combs C, Zgola MM et al. Effects of Tissue Transglutaminase on Retinoic Acid-induced Cellular Differentiation and Protection against Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(36):33582–7. 10.1074/jbc.M105318200.
118. Kumar S, Donti TR, Agnihotri N, Mehta K. Transglutaminase 2 reprogramming of glucose metabolism in mammary epithelial cells via activation of inflammatory signaling pathways. *International journal of cancer* 2014; 134(12):2798–807. 10.1002/ijc.28623.
119. Rossin F, D'Eletto M, Falasca L, Sepe S, Cocco S, Fimia GM et al. Transglutaminase 2 ablation leads to mitophagy impairment associated with a metabolic shift towards aerobic glycolysis. *Cell Death Differ* 2015; 22(3):408–18. 10.1038/cdd.2014.106.
120. Podberezin M, Wen J, Chang C-CJ. Cancer stem cells: a review of potential clinical applications. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2013; 137(8):1111–6. 10.5858/arpa.2012-0494-RA.
121. López-Lázaro M. The stem cell division theory of cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2018; 123:95–113. 10.1016/j.critrevonc.2018.01.010.

122. Shao M, Cao L, Shen C, Satpathy M, Chelladurai B, Bigsby RM et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Ovarian Tumor Progression Induced by Tissue Transglutaminase. *Cancer Res* 2009; 69(24):9192–201. 10.1158/0008-5472.CAN-09-1257.
123. Kumar A, Xu J, Brady S, Gao H, Yu D, Reuben J et al. Tissue Transglutaminase Promotes Drug Resistance and Invasion by Inducing Mesenchymal Transition in Mammary Epithelial Cells. *PLOS ONE* 2010; 5(10):e13390. 10.1371/journal.pone.0013390.
124. Nandy SB, Lakshmanaswamy R. Chapter Five - Cancer Stem Cells and Metastasis. In: Lakshmanaswamy R, editor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science : Approaches to Understanding Breast Cancer*: Academic Press; 2017. p. 137–76 .
125. Ayinde O, Wang Z, Griffin M. Tissue transglutaminase induces Epithelial-Mesenchymal-Transition and the acquisition of stem cell like characteristics in colorectal cancer cells. *Oncotarget* 2017; 8(12):20025–41. 10.18632/oncotarget.15370.
126. Lee J, Kim Y-S, Choi D-H, Bang MS, Han TR, Joh TH et al. Transglutaminase 2 Induces Nuclear Factor- κ B Activation via a Novel Pathway in BV-2 Microglia. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(51):53725–35. 10.1074/jbc.M407627200.
127. Park S-S, Kim J-M, Kim D-S, Kim I-H, Kim S-Y. Transglutaminase 2 Mediates Polymer Formation of I- κ B α through C-terminal Glutamine Cluster. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(46):34965–72. 10.1074/jbc.M604150200.
128. Yakubov B, Chelladurai B, Schmitt J, Emerson R, Turchi JJ, Matei D. Extracellular Tissue Transglutaminase Activates Noncanonical NF- κ B Signaling and Promotes Metastasis in Ovarian Cancer. *Neoplasia* 2013; 15(6):609-IN8. 10.1593/neo.121878.
129. Park K-S, Han B-G, Lee KH, Kim D-S, Kim J-M, Jeon H et al. Depletion of nucleophosmin via transglutaminase 2 cross-linking increases drug resistance in cancer cells. *Cancer Letters* 2009; 274(2):201–7. 10.1016/j.canlet.2008.09.007.
130. Fok JY, Ekmekcioglu S, Mehta K. Implications of tissue transglutaminase expression in malignant melanoma. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(6):1493–503. 10.1158/1535-7163.MCT-06-0083.
131. Herman JF, Mangala LS, Mehta K. Implications of increased tissue transglutaminase (TG2) expression in drug-resistant breast cancer (MCF-7) cells. *Oncogene* 2006; 25(21):3049. 10.1038/sj.onc.1209324.

132. Akar U, Ozpolat B, Mehta K, Fok J, Kondo Y, Lopez-Berestein G. Tissue Transglutaminase Inhibits Autophagy in Pancreatic Cancer Cells. *Mol Cancer Res* 2007; 5(3):241–9. 10.1158/1541-7786.MCR-06-0229.
133. Han JA, Park SC. Hydrogen peroxide mediates doxorubicin-induced transglutaminase 2 expression in PC-14 human lung cancer cell line. *Exp Mol Med* 1999; 31(2):83–8. 10.1038/emmm.1999.14.
134. Mehta K, Fok J, Miller FR, Koul D, Sahin AA. Prognostic significance of tissue transglutaminase in drug resistant and metastatic breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004; 10(23):8068–76. 10.1158/1078-0432.CCR-04-1107.
135. Verma A, Guha S, Diagaradjane P, Kunnumakkara AB, Sanguino AM, Lopez-Berestein G et al. Therapeutic Significance of Elevated Tissue Transglutaminase Expression in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(8):2476–83. 10.1158/1078-0432.CCR-07-4529.
136. Keillor JW, Apperley KYP, Akbar A. Inhibitors of tissue transglutaminase. *Trends in Pharmacological Sciences* 2015; 36(1):32–40. 10.1016/j.tips.2014.10.014.
137. Lai TS, Slaughter TF, Peoples KA, Hettasch JM, Greenberg CS. Regulation of human tissue transglutaminase function by magnesium-nucleotide complexes. Identification of distinct binding sites for Mg-GTP and Mg-ATP. *The Journal of biological chemistry* 1998; 273(3):1776–81. 10.1074/jbc.273.3.1776.
138. Schaertl S, Prime M, Wityak J, Dominguez C, Munoz-Sanjuan I, Pacifici RE et al. A profiling platform for the characterization of transglutaminase 2 (TG2) inhibitors. *Journal of Biomolecular Screening* 2010; 15(5):478–87. 10.1177/1087057110366035.
139. Duval E, Case A, Stein RL, Cuny GD. Structure–activity relationship study of novel tissue transglutaminase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2005; 15(7):1885–9. 10.1016/j.bmcl.2005.02.005.
140. Case A, Stein RL. Kinetic analysis of the interaction of tissue transglutaminase with a nonpeptidic slow-binding inhibitor. *Biochemistry* 2007; 46(4):1106–15. 10.1021/bi061787u.
141. Pardin C, Pelletier JN, Lubell WD, Keillor JW. Cinnamoyl inhibitors of tissue transglutaminase. *The Journal of organic chemistry* 2008; 73(15):5766–75. 10.1021/jo8004843.

142. Pardin C, Roy I, Lubell WD, Keillor JW. Reversible and Competitive Cinnamoyl Triazole Inhibitors of Tissue Transglutaminase. *Chemical Biology & Drug Design* 2008; 72(3):189–96. 10.1111/j.1747-0285.2008.00696.x.
143. Lai T-S, Liu Y, Tucker T, Daniel KR, Sane DC, Toone E et al. Identification of chemical inhibitors to human tissue transglutaminase by screening existing drug libraries. *Chemistry & biology* 2008; 15(9):969–78. 10.1016/j.chembiol.2008.07.015.
144. Klöck C, Jin X, Choi K, Khosla C, Madrid PB, Spencer A et al. Acylideneoxoindoles: A new class of reversible inhibitors of human transglutaminase 2. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2011; 21(9):2692–6. 10.1016/j.bmcl.2010.12.037.
145. Lee D, Long SA, Murray JH, Adams JL, Nuttall ME, Nadeau DP et al. Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7. *Journal of medicinal chemistry* 2001; 44(12):2015–26. 10.1021/jm0100537.
146. Keillor JW, Apperley KYP. Transglutaminase inhibitors: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* 2016; 26(1):49–63. 10.1517/13543776.2016.1115836.
147. Folk JE, Cole PW. Identification of a functional cysteine essential for the activity of guinea pig liver transglutaminase. *The Journal of biological chemistry* 1966; 241(13):3238–40.
148. de Macédo P, Marrano C, Keillor JW. A direct continuous spectrophotometric assay for transglutaminase activity. *Analytical biochemistry* 2000; 285(1):16–20. 10.1006/abio.2000.4713.
149. Pardin C, Gillet SMFG, Keillor JW. Synthesis and evaluation of peptidic irreversible inhibitors of tissue transglutaminase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006; 14(24):8379–85. 10.1016/j.bmc.2006.09.011.
150. Tso JY, Bower SG, Zalkin H. Mechanism of inactivation of glutamine amidotransferases by the antitumor drug L-(alpha S, 5S)-alpha-amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid (AT-125). *J. Biol. Chem.* 1980; 255(14):6734–8.
151. Choi K, Siegel M, Piper JL, Yuan L, Cho E, Strnad P et al. Chemistry and biology of dihydroisoxazole derivatives: selective inhibitors of human transglutaminase 2. *Chemistry & biology* 2005; 12(4):469–75. 10.1016/j.chembiol.2005.02.007.

152. Watts RE, Siegel M, Khosla C. Structure-activity relationship analysis of the selective inhibition of transglutaminase 2 by dihydroisoxazoles. *Journal of medicinal chemistry* 2006; 49(25):7493–501. 10.1021/jm060839a.
153. Dafik L, Albertelli M, Stammaes J, Sollid LM, Khosla C. Activation and Inhibition of Transglutaminase 2 in Mice. *PLOS ONE* 2012; 7(2):e30642. 10.1371/journal.pone.0030642.
154. Powers JC, Asgian JL, Ekici OD, James KE. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chemical reviews* 2002; 102(12):4639–750. 10.1021/cr010182v.
155. Pliura DH, Bonaventura BJ, Smith RA, Coles PJ, Krantz A. Comparative behaviour of calpain and cathepsin B toward peptidyl acyloxymethyl ketones, sulphonium methyl ketones and other potential inhibitors of cysteine proteinases. *The Biochemical journal* 1992; 288 (Pt 3):759–62. 10.1042/bj2880759.
156. Griffin M, Mongeot A, Collighan R, Saint RE, Jones RA, Coutts IGC et al. Synthesis of potent water-soluble tissue transglutaminase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2008; 18(20):5559–62. 10.1016/j.bmcl.2008.09.006.
157. Oertel K, inventor. Michaelssysteme als Transglutaminaseinhibitoren.
158. Keillor JW, Chica RA, Chabot N, Vinci V, Pardin C, Fortin E et al. The bioorganic chemistry of transglutaminase — from mechanism to inhibition and engineering. *Can. J. Chem.* 2008; 86(4):271–6. 10.1139/v08-024.
159. Prime ME, Andersen OA, Barker JJ, Brooks MA, Cheng RKY, Toogood-Johnson I et al. Discovery and structure-activity relationship of potent and selective covalent inhibitors of transglutaminase 2 for Huntington's disease. *Journal of medicinal chemistry* 2012; 55(3):1021–46. 10.1021/jm201310y.
160. Prime ME, Brookfield FA, Courtney SM, Gaines S, Marston RW, Ichihara O et al. Irreversible 4-Aminopiperidine Transglutaminase 2 Inhibitors for Huntington's Disease. *ACS medicinal chemistry letters* 2012; 3(9):731–5. 10.1021/ml3001352.
161. Wityak J, Prime ME, Brookfield FA, Courtney SM, Erfan S, Johnsen S et al. SAR Development of Lysine-Based Irreversible Inhibitors of Transglutaminase 2 for Huntington's Disease. *ACS medicinal chemistry letters* 2012; 3(12):1024–8. 10.1021/ml300241m.
162. Jeitner TM, Pinto JT, Cooper AJL. Cystamine and cysteamine as inhibitors of transglutaminase activity in vivo. *Bioscience Reports* 2018; 38(5). 10.1042/BSR20180691.

163. Okauchi M, Xi G, Keep RF, Hua Y. Tissue-type transglutaminase and the effects of cystamine on intracerebral hemorrhage-induced brain edema and neurological deficits. *Brain Research* 2009; 1249:229–36. 10.1016/j.brainres.2008.10.035.
164. Siegel M, Khosla C. Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states. *Pharmacology & therapeutics* 2007; 115(2):232–45. 10.1016/j.pharmthera.2007.05.003.
165. Badarau E, Collighan RJ, Griffin M. Recent advances in the development of tissue transglutaminase (TG2) inhibitors. *Amino Acids* 2013; 44(1):119–27. 10.1007/s00726-011-1188-4.
166. Weigert F. Über die spezifische Wirkung der polarisierten Strahlung. *Ann. Phys.* 1920; 368(24):681–725. 10.1002/andp.19203682402.
167. Vavilov SI, Levshin WL. Beiträge zur Frage über polarisiertes Fluoreszenzlicht von Farbstofflösungen. *Z. Physik* 1923; 16:135–54.
168. Perrin F. Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité. *J. Phys. Radium* 1926; 7(12):390–401. 10.1051/jphysrad:01926007012039000.
169. Arkin MR, Glicksman MA, Fu H, Havel JJ, Du Y. Inhibition of Protein-Protein Interactions: Non-Cellular Assay Formats. In: Arkin MR, Glicksman MA, Fu H, Havel JJ, Du Y, editors. *Assay Guidance Manual [Internet]*: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2012 .
170. E. Gaviola, Peter Pringsheim. Über den Einfluß der Konzentration auf die Polarisation der Fluoreszenz von Farbstofflösungen. *Z. Physik* 1924; 24(1):24–36.
171. Weber G. Polarization of the fluorescence of macromolecules. I. Theory and experimental method. *Biochem J* 1952; 51(2):145–55. 10.1042/bj0510145.
172. Jablonski A. On the notion of emission anisotropy. *Bull. Acad. Pol. Sci* 1960; 8:259–64.
173. Azumi T, McGlynn SP. Polarization of the Luminescence of Phenanthrene. *The Journal of Chemical Physics* 1962; 37(10):2413–20. 10.1063/1.1733019.
174. Jameson DM, Ross JA. Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging. *Chemical reviews* 2010; 110(5):2685–708. 10.1021/cr900267p.
175. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research* 2019; 47(D1):D506-D515. 10.1093/nar/gky1049.

176. Liu S, Cerione RA, Clardy J. Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99(5):2743. 10.1073/pnas.042454899.
177. Stammaes J, Pinkas DM, Fleckenstein B, Khosla C, Sollid LM. Redox Regulation of Transglutaminase 2 Activity. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(33):25402–9. 10.1074/jbc.M109.097162.
178. Lai TS, Achyuthan KE, Santiago MA, Greenberg GS. Carboxyl-terminal truncation of recombinant factor XIII A-chains. Characterization of minimum structural requirement for transglutaminase activity. *The Journal of biological chemistry* 1994; 269(40):24596–601.
179. Lai T-S, Slaughter TF, Koropchak CM, Haroon ZA, Greenberg CS. C-terminal Deletion of Human Tissue Transglutaminase Enhances Magnesium-dependent GTP/ATPase Activity. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(49):31191–5. 10.1074/jbc.271.49.31191.
180. Roy I, Smith O, Clouthier CM, Keillor JW. Expression, purification and kinetic characterisation of human tissue transglutaminase. *Protein expression and purification* 2013; 87(1):41–6. 10.1016/j.pep.2012.10.002.
181. Sárdy M, Odenthal U, Kárpáti S, Paulsson M, Smyth N. Recombinant Human Tissue Transglutaminase ELISA for the Diagnosis of Gluten-sensitive Enteropathy. *Clinical Chemistry* 1999; 45(12):2142–9.
182. Schmidt TGM, Skerra A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature protocols* 2007; 2(6):1528–35. 10.1038/nprot.2007.209.
183. Schmidt TGM, Batz L, Bonet L, Carl U, Holzapfel G, Kiem K et al. Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein expression and purification* 2013; 92(1):54–61. 10.1016/j.pep.2013.08.021.
184. van Craenenbroeck K, Vanhoenacker P, Haegeman G. Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. *European journal of biochemistry* 2000; 267(18):5665–78. 10.1046/j.1432-1327.2000.01645.x.
185. Tabor S. Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. *Current protocols in molecular biology* 2001; Chapter 16:Unit16.2. 10.1002/0471142727.mb1602s11.

186. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 1975; 94(3):441–8. 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
187. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976; 72:248–54.
188. Folk JE, Cole PW. Transglutaminase: Mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation* 1966; 122(2):244–64. 10.1016/0926-6593(66)90066-X.
189. Levitzki A, Willingham M, Pastan I. Evidence for participation of transglutaminase in receptor-mediated endocytosis. *PNAS* 1980; 77(5):2706–10. 10.1073/pnas.77.5.2706.
190. J J Gorman, J E Folk. Structural features of glutamine substrates for human plasma factor XIIIa (activated blood coagulation factor XIII). *J. Biol. Chem.* 1980; 255(2):419–27.
191. Meisenhelder J, Bursik S. Radiation Safety and Measurement. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 2018; 16(1). 10.1002/cpet.22.
192. Lilley GR, Griffin M, Bonner PLR. Assays for the measurement of tissue transglutaminase (type II) mediated protein crosslinking via ϵ -(γ -glutamyl) lysine and N',N'-bis (γ -glutamyl) polyamine linkages using biotin labelled casein. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1997; 34(1):31–43. 10.1016/S0165-022X(96)01200-6.
193. Badarau E, Mongeot A, Collighan R, Rathbone D, Griffin M. Imidazolium-based warheads strongly influence activity of water-soluble peptidic transglutaminase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 66:526–30. 10.1016/j.ejmech.2013.05.018.
194. Day N, Keillor JW. A continuous spectrophotometric linked enzyme assay for transglutaminase activity. *Analytical biochemistry* 1999; 274(1):141–4. 10.1006/abio.1999.4255.
195. Folk JE, Cole PW. Structural Requirements of Specific Substrates for Guinea Pig Liver Transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 1965; (240):2951–60.
196. Marrano C, Macédo P de, Keillor JW. Evaluation of novel dipeptide-bound α,β -unsaturated amides and epoxides as irreversible inhibitors of guinea pig liver transglutaminase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2001; 9(7):1923–8. 10.1016/S0968-0896(01)00101-8.

197. Lorand L, Lockridge OM, Campbell LK, Myhrman R, Bruner-Lorand J. Transamidating enzymes. II. A continuous fluorescent method suited for automating measurements of factor XIII in plasma. *Analytical biochemistry* 1971; 44(1):221–31. 10.1016/0003-2697(71)90363-0.
198. Case A, Ni J, Yeh L-A, Stein RL. Development of a mechanism-based assay for tissue transglutaminase—results of a high-throughput screen and discovery of inhibitors. *Analytical biochemistry* 2005; 338(2):237–44. 10.1016/j.ab.2004.09.047.
199. Invitrogen. Technical Resource Guide Fluorescence Polarization; 2006 [cited 2020 Mar 18]. Available from:
URL:https://research.fhcrc.org/content/dam/stripe/hahn/methods/biochem/beacon_fluorescence_guide.pdf.
200. Gillet SMFG, Pelletier JN, Keillor JW. A direct fluorometric assay for tissue transglutaminase. *Analytical biochemistry* 2005; 347(2):221–6. 10.1016/j.ab.2005.09.035.
201. Wodtke R, Schramm G, Pietzsch J, Pietsch M, Löser R. Synthesis and Kinetic Characterisation of Water-Soluble Fluorogenic Acyl Donors for Transglutaminase 2. *ChemBioChem* 2016; 17(13):1263–81. 10.1002/cbic.201600048.
202. Yamada K, Meguro T. A new assay method for factor XIII using a fluorescence polarization analyzer, based on change in the rotary Brownian motion. *Thrombosis Research* 1977; 11(5):557–66. 10.1016/0049-3848(77)90015-9.
203. Kenniston JA, Conley GP, Sexton DJ, Nixon AE. A homogeneous fluorescence anisotropy assay for measuring transglutaminase 2 activity. *Analytical biochemistry* 2013; 436(1):13–5. 10.1016/j.ab.2013.01.016.
204. Kongsbak L, Jörgensen KS, Valbjörn J, Jörgensen CT, Husum TL, Ernst S et al., inventors. A fluorescence polarisation screening method.
205. Ikura K, Nasu T, Yokota H, Tsuchiya Y, Sasaki R, Chiba H. Amino acid sequence of guinea pig liver transglutaminase from its cDNA sequence. *Biochemistry* 1988; 27(8):2898–905. 10.1021/bi00408a035.
206. Pividori MI, Lermo A, Bonanni A, Alegret S, del Valle M. Electrochemical immunosensor for the diagnosis of celiac disease. *Analytical biochemistry* 2009; 388(2):229–34. 10.1016/j.ab.2009.02.026.

207. Algarni AS, Hargreaves AJ, Dickenson JM. Role of transglutaminase 2 in PAC1 receptor mediated protection against hypoxia-induced cell death and neurite outgrowth in differentiating N2a neuroblastoma cells. *Biochemical pharmacology* 2017; 128:55–73. 10.1016/j.bcp.2017.01.001.
208. Pinzón NE, Brevé JJP, Bol JGJM, Drukarch B, Baron W, van Dam A-M. Tissue transglutaminase in astrocytes is enhanced by inflammatory mediators and is involved in the formation of fibronectin fibril-like structures. *J Neuroinflammation* 2017; 14(1):1–13. 10.1186/s12974-017-1031-2.
209. Reindl W, Gräber M, Strebhardt K, Berg T. Development of high-throughput assays based on fluorescence polarization for inhibitors of the polo-box domains of polo-like kinases 2 and 3. *Analytical biochemistry* 2009; 395(2):189–94. 10.1016/j.ab.2009.08.031.
210. Hauser C, Wodtke R, Löser R, Pietsch M. A fluorescence anisotropy-based assay for determining the activity of tissue transglutaminase. *Amino Acids* 2017; 49(3):567–83. 10.1007/s00726-016-2192-5.
211. Copeland RA. *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2. ed. New York [u.a.]: Wiley-VCH; 2000.
212. Case A, Stein RL. Kinetic analysis of the action of tissue transglutaminase on peptide and protein substrates. *Biochemistry* 2003; 42(31):9466–81. 10.1021/bi030084z.
213. Lorand L, Parameswaran KN, Velasco PT, Hsu LK-H, Siefiring GE. New colored and fluorescent amine substrates for activated fibrin stabilizing factor (Factor XIIIa) and for transglutaminase. *Analytical biochemistry* 1983; 131(2):419–25. 10.1016/0003-2697(83)90193-8.
214. Wodtke R, Hauser C, Ruiz-Gómez G, Jäckel E, Bauer D, Lohse M et al. N ϵ -Acryloyllysine Piperazides as Irreversible Inhibitors of Transglutaminase 2: Synthesis, Structure-Activity Relationships, and Pharmacokinetic Profiling. *Journal of medicinal chemistry* 2018; 61(10):4528–60. 10.1021/acs.jmedchem.8b00286.
215. Achyuthan KE, Greenberg CS. Identification of a guanosine triphosphate-binding site on guinea pig liver transglutaminase. Role of GTP and calcium ions in modulating activity. *J. Biol. Chem.* 1987; 262(4):1901–6.
216. Copeland RA. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists*; 2005. (vol 46).

217. Stein RL. Kinetics of enzyme action: Essential principles for drug hunters. Hoboken, N.J: Wiley; 2011.
218. Lorand L, Conrad SM. Transglutaminases. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1984; 58(1):9–35. 10.1007/BF00240602.
219. Schmidt RF. *Physiologie des Menschen*. 31st ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2010.
220. Copeland RA. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: A guide for medicinal chemists and pharmacologists*. 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2013.
221. van der Wildt B, Lammertsma AA, Drukarch B, Windhorst AD. Strategies towards in vivo imaging of active transglutaminase type 2 using positron emission tomography. *Amino Acids* 2017; 49(3):585–95. 10.1007/s00726-016-2288-y.
222. Kim SY, Kim IG, Chung SI, Steinert PM. The structure of the transglutaminase 1 enzyme. Deletion cloning reveals domains that regulate its specific activity and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(45):27979–86.
223. Folk JE, Cole PW. Mechanism of Action of Guinea Pig Liver Transglutaminase:. *Journal of Biological Chemistry* 1966; 241(23):5518–25.
224. Folk JE, Gross M. Mechanism of Action of Guinea Pig Liver Transglutaminase:. *J. Biol. Chem.* 1971; 246(21):6683–91.
225. Folk JE. The trimethylacetyl-transglutaminase complex. In: Purich DL, editor. *Enzymes Kinetics and Mechanism*. New York: Academic Press; 1982. p. 36–42 (Methods in Enzymology; vol. 87).
226. Zhang J-H, Chung TDY, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening* 1999; 4(2):67–73. 10.1177/108705719900400206.
227. Perez Alea M, Kitamura M, Martin G, Thomas V, Hitomi K, El Alaoui S. Development of an isoenzyme-specific colorimetric assay for tissue transglutaminase 2 cross-linking activity. *Analytical biochemistry* 2009; 389(2):150–6. 10.1016/j.ab.2009.03.029.
228. Im MJ, Graham RM. A novel guanine nucleotide-binding protein coupled to the alpha 1-adrenergic receptor. I. Identification by photolabeling or membrane and ternary complex preparation. *J. Biol. Chem.* 1990; 265(31):18944–51.

229. Bergamini CM, Signorini M, Poltronieri L. Inhibition of erythrocyte transglutaminase by GTP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1987; 916(1):149–51. 10.1016/0167-4838(87)90222-6.
230. Lee KN, Birckbichler PJ, Patterson MK. GTP hydrolysis by guinea pig liver transglutaminase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989; 162(3):1370–5. 10.1016/0006-291X(89)90825-5.
231. Jeong EM, Lee KB, Kim GE, Kim CM, Lee J-H, Kim H-J et al. Competitive Binding of Magnesium to Calcium Binding Sites Reciprocally Regulates Transamidase and GTP Hydrolysis Activity of Transglutaminase 2. *International journal of molecular sciences* 2020; 21(3). 10.3390/ijms21030791.
232. Murthy SNP, Lorand L. Nucleotide binding by the erythrocyte transglutaminase/Gh protein, probed with fluorescent analogs of GTP and GDP. *PNAS* 2000; 97(14):7744–7. 10.1073/pnas.140210197.
233. Newton M, Niewczas I, Clark J, Bellamy TC. A real-time fluorescent assay of the purified nitric oxide receptor, guanylyl cyclase. *Analytical biochemistry* 2010; 402(2):129–36. 10.1016/j.ab.2010.03.041.
234. Eccleston JF, Hutchinson JP, Jameson DM. Fluorescence-Based Assays. In: King FD, Lawton G, editors. *Progress in Medicinal Chemistry*; Elsevier; 2005. p. 19–48 .
235. Simeonov A, Jadhav A, Thomas CJ, Wang Y, Huang R, Southall NT et al. Fluorescence Spectroscopic Profiling of Compound Libraries. *Journal of medicinal chemistry* 2008; 51(8). 10.1021/jm701301m.
236. McEwen DP, Gee KR, Kang HC, Neubig RR. Fluorescent BODIPY-GTP Analogs: Real-Time Measurement of Nucleotide Binding to G Proteins. *Analytical biochemistry* 2001; 291(1):109–17. 10.1006/abio.2001.5011.
237. Dandliker WB, Hsu M-L, Levin J, Ramanath Rao B. [1] Equilibrium and kinetic inhibition assays based upon fluorescence polarization. In: Langone JJ, van Vunakis H, editors. *Methods in Enzymology : Immunochemical Techniques - Part C*; Academic Press; 1981. p. 3–28 .
238. Jameson DM, Mocz G. Fluorescence Polarization/Anisotropy Approaches to Study Protein-Ligand Interactions. In: Ulrich Nienhaus G, editor. *Protein-Ligand Interactions*:

- Methods and Applications. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. p. 301–22 (Methods in Molecular Biology™; vol. 305).
239. Pope AJ, Haupts UM, Moore KJ. Homogeneous fluorescence readouts for miniaturized high-throughput screening: theory and practice. *Drug Discovery Today* 1999; 4(8):350–62. 10.1016/S1359-6446(99)01340-9.
240. Datta S, Antonyak MA, Cerione RA. GTP-binding-defective forms of tissue transglutaminase trigger cell death. *Biochemistry* 2007; 46(51):14819–29. 10.1021/bi701422h.
241. Hwang H, Myong S. Protein induced fluorescence enhancement (PIFE) for probing protein-nucleic acid interactions. *Chemical Society Reviews* 2014; 43(4):1221–9. 10.1039/c3cs60201j.
242. Lan KL, Remmers AE, Neubig RR. Roles of G(o)alpha tryptophans in GTP hydrolysis, GDP release, and fluorescence signals. *Biochemistry* 1998; 37(3):837–43. 10.1021/bi972122i.
243. Harrison C, Traynor JR. The 35SGTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life sciences* 2003; 74(4):489–508. 10.1016/j.lfs.2003.07.005.
244. Strange PG. Use of the GTPγS (35SGTPγS and Eu-GTPγS) binding assay for analysis of ligand potency and efficacy at G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology* 2010; 161(6):1238–49. 10.1111/j.1476-5381.2010.00963.x.
245. DeLapp NW, Gough WH, Kahl SD, Porter AC, Wiernicki TR. GTPgammaS Binding Assays. In: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD); 2004 .
246. Lee KN, Birckbichler PJ, Patterson MK. GTP hydrolysis by guinea pig liver transglutaminase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989; 162(3):1370–5.
247. Bäuml CA, George P, Ajay A, Schmitz T, Sommerfeld P, Pietsch M et al. Distinct 3-disulfide-bonded isomers of tridegin differentially inhibit coagulation factor XIIIa: The influence of structural stability on bioactivity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2020:112474. 10.1016/j.ejmech.2020.112474.
248. Hohenegger M, Waldhoer M, Beindl W, Böing B, Kreimeyer A, Nickel P et al. Galpha-selective G protein antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(1):346–51. 10.1073/pnas.95.1.346.

249. Takasaki J, Saito T, Taniguchi M, Kawasaki T, Moritani Y, Hayashi K et al. A novel Galphaq/11-selective inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279(46):47438–45. 10.1074/jbc.M408846200.
250. Charpentier TH, Waldo GL, Lowery-Gionta EG, Krajewski K, Strahl BD, Kash TL et al. Potent and Selective Peptide-based Inhibition of the G Protein $G\alpha_q$. *The Journal of biological chemistry* 2016; 291(49):25608–16. 10.1074/jbc.M116.740407.
251. Ametamey SM, Honer M, Schubiger PA. Molecular imaging with PET. *Chemical reviews* 2008; 108(5):1501–16. 10.1021/cr0782426.
252. van der Wildt B, Wilhelmus MMM, Bijkerk J, Haveman LYF, Kooijman EJM, Schuit RC et al. Development of carbon-11 labeled acryl amides for selective PET imaging of active tissue transglutaminase. *Nuclear medicine and biology* 2016; 43(4):232–42. 10.1016/j.nucmedbio.2016.01.003.
253. van der Wildt B, Wilhelmus MMM, Kooijman EJM, Jongenelen CAM, Schuit RC, Büchold C et al. Development of fluorine-18 labeled peptidic PET tracers for imaging active tissue transglutaminase. *Nuclear medicine and biology* 2017; 44:90–104. 10.1016/j.nucmedbio.2016.10.002.
254. Pysz MA, Gambhir SS, Willmann JK. Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clinical radiology* 2010; 65(7):500–16. 10.1016/j.crad.2010.03.011.
255. James ML, Gambhir SS. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiological reviews* 2012; 92(2):897–965. 10.1152/physrev.00049.2010.
256. Kobe C, Dietlein M, Hellwig D. PET/CT for Lymphoma Post-therapy Response Assessment in Hodgkin Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Seminars in nuclear medicine* 2018; 48(1):28–36. 10.1053/j.semnuclmed.2017.09.003.
257. Langen K-J, Stoffels G, Filss C, Heinzl A, Stegmayr C, Lohmann P et al. Imaging of amino acid transport in brain tumours: Positron emission tomography with O-(2-¹⁸Ffluoroethyl)-L-tyrosine (FET). *Methods (San Diego, Calif.)* 2017; 130:124–34. 10.1016/j.ymeth.2017.05.019.
258. Werner RA, Derlin T, Lapa C, Sheikbahaei S, Higuchi T, Giesel FL et al. ¹⁸F-Labeled, PSMA-Targeted Radiotracers: Leveraging the Advantages of Radiofluorination for Prostate Cancer Molecular Imaging. *Theranostics* 2020; 10(1):1–16. 10.7150/thno.37894.

259. Drzezga A, Altomare D, Festari C, Arbizu J, Orini S, Herholz K et al. Diagnostic utility of 18F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) in asymptomatic subjects at increased risk for Alzheimer's disease. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2018; 45(9):1487–96. 10.1007/s00259-018-4032-1.
260. Jiang L, Tu Y, Shi H, Cheng Z. PET probes beyond 18F-FDG. *Journal of Biomedical Research* 2014; 28(6):435–46. 10.7555/JBR.28.20130196.
261. Jung J-h, Ahn B-C. Current Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography of Brain Tumors. *Brain Tumor Research and Treatment* 2018; 6(2):47–53. 10.14791/btrt.2018.6.e13.
262. Freedman NMT, Mishani E, Krausz Y, Weininger J, Lester H, Blaugrund E et al. In vivo measurement of brain monoamine oxidase B occupancy by rasagiline, using 11C-L-deprenyl and PET. *Journal of nuclear medicine* 2005; 46(10):1618–24.
263. Kumata K, Yui J, Hatori A, Maeda J, Xie L, Ogawa M et al. Development of (11)CMFTC for PET imaging of fatty acid amide hydrolase in rat and monkey brains. *ACS chemical neuroscience* 2015; 6(2):339–46. 10.1021/cn500269g.
264. Laube M, Frizler M, Wodtke R, Neuber C, Belter B, Kniess T et al. Synthesis and preliminary radiopharmacological characterisation of an 11 C-labelled azadipeptide nitrile as potential PET tracer for imaging of cysteine cathepsins. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* 2019; 62(8):448–59. 10.1002/jlcr.3729.
265. User Guide: Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase; 2020.000Z [cited 2020 Jun 24]. Available from: URL:https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2FMAN0012401_Phusion_HotStartII_DNAPolymerase_500U_U G.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUGh1c2lvbiBl3QgU3RhcncQgSUkgSGlnaC1GaWRlbGl0eS BETkEgUG9seW1lcmFzZQ==.
266. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680–5. 10.1038/227680a0.
267. Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 2002; 23(11):1511–2. 10.5012/bkcs.2002.23.11.1511.

268. ThermoFisher Scientific. CEP4 Säugetier-Expressionsvektor; 2020.000Z [cited 2020 Aug 12.972Z]. Available from:

URL:<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V04450#/V04450>.

269. Nova Lifetech. pT7-7.png (727×890); 2018.000Z [cited 2020 Aug 12.121Z].

Anhang

1. Expressionsvektoren

pCEP-Pu/BM40SP/NTST

Zur eukaryotischen Expression humaner TGase 2 wurde der Expressionsvektor pCEP-Pu/BM40SP/NTST verwendet, der im Institut für Biochemie II der Universitätsklinik Köln ausgehend vom Vektor pCEP4 (Invitrogen, Abb. 59) modifiziert wurde. Dabei wurde das Hygromycinresistenzgen durch ein Puromycinresistenzgen ersetzt und eine Gensequenz, die für einen N-terminalen Twin Strep-tag codiert, eingeführt.

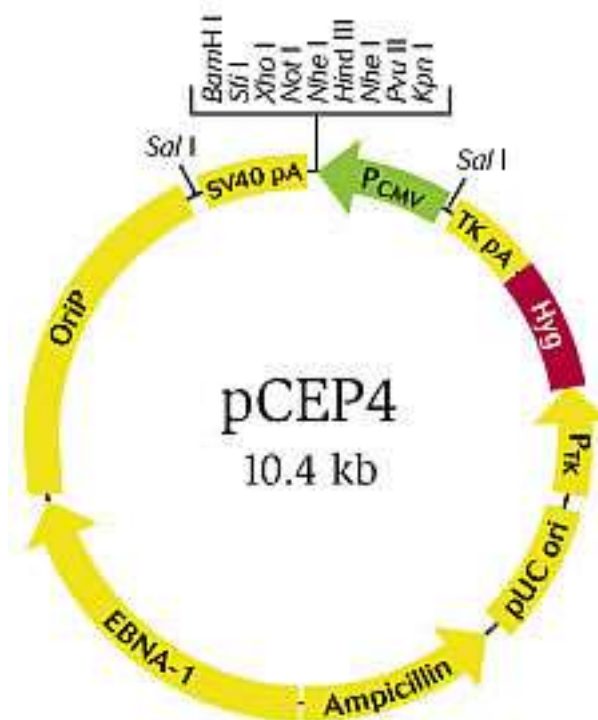


Abb. 59 Vektorkarte des pCEP4 (268)

pT7-7

Zur prokaryotischen Expression humaner TGase 2 wurde der Expressionsvektor pT7-7 verwendet, der einen T7-RNA-Polymerase-Promotor sowie Ampicillinresistenzgen aufweist (Abb. 60)

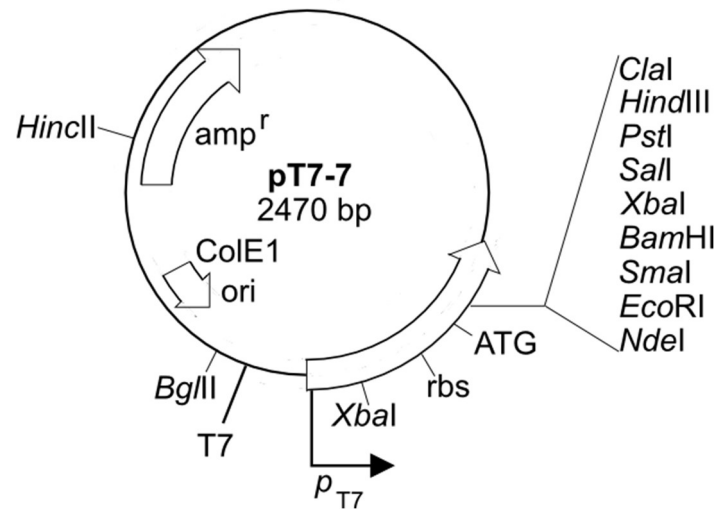


Abb. 60 Aufbau des pT7-7 (vgl. (269))

2. Basensequenzen der verwendeten Konstrukte

pCEP-Pu/BM40SP-NTST-hTGase 2

5' **Start** **BM40** **Signalpeptid** **Twin-Strep-tag** **Thrombinschnittstelle** **NheI**-hTGase 2-**Stop**-
XhoI-3'

atgaggcctggatcttcttctcttggcctggccggagggtctggcagccccgtagaaagctggagccaccctcagttcgag
aaaggtggaggttcggaggtggatctggaggtggtcatggagccaccacagttcgaaaaatccggtctggttcgcgtggctc
cgctagc

GCCGAGGAGCTGGTCTTAGAGAGGTGTGATCTGGAGCTGGAGACCAATGGCCGAGA
CCACCACACGGCCGACCTGTGCCGGGAGAAGCTGGTGGTGCACGGGGCCAGCCCT
TCTGGCTGACCCTGCACTTTGAGGGCCGCAACTACGAGGCCAGTGTAGACAGTCTCA
CCTTCAGTGTTCGTGACCGGCCAGCCCTAGCCAGGAGGCCGGGACCAAGGCCCGTT
TTCCACTAAGAGATGCTGTGGAGGAGGGTACTGGACAGCCACCGTGGTGGACCAG
CAAGACTGCACCCTCTCGCTGCAGCTCACCACCCCGGCCAACGCCCCATCGGCCTG
TATCGCCTCAGCCTGGAGGCCTCCACTGGCTACCAGGGATCCAGCTTTGTGCTGGGC
CACTTCATTTTGTCTTTCAACGCCTGGTGCCAGCGGATGCTGTGTACCTGGACTCGG
AAGAGGAGCGGCAGGAGTATGTCTCACCCAGCAGGGCTTTATCTACCAGGGCTCG
GCCAAGTTCATCAAGAACATACCTTGGAATTTTGGGCAGTTTGAAGATGGGATCCTA
GACATCTGCCTGATCCTTCTAGATGTCAACCCCAAGTTCCTGAAGAACGCCGGCCGT
GACTGCTCCCGCCGCAGCAGCCCCGTCTACGTGGGCCGGGTGGTGGAGTGGCATGGTC
AACTGCAACGATGACCAGGGTGTGCTGCTGGGACGCTGGGACAACAACACTACGGGGA
CGGCGTCAGCCCCATGTCCTGGATCGGCAGCGTGGACATCCTGCGGCGCTGGAAGA
ACCACGGCTGCCAGCGCGTCAAGTATGGCCAGTGTCTGGGTCTTCGCCGCCGTGGCCT
GCACAGTGTGAGGTGCCTGGGCATCCCTACCCGCGTCGTGACCAACTACAACCTCGG
CCCATGACCAGAACAGCAACCTTCTCATCGAGTACTTCGCAATGAGTTTGGGGAGA
TCCAGGGTGACAAGAGCGAGATGATCTGGAACCTTCCACTGCTGGGTGGAGTCGTGG
ATGACCAGGCCGGACCTGCAGCCGGGGTACGAGGGCTGGCAGGCCCTGGACCCAAC
GCCCCAGGAGAAGAGCGAAGGGACGTAAGTGTGGCCAGTTCAGTTCGTGCCA
TCAAGGAGGGCGACCTGAGCACCAAGTACGATGCGCCCTTTGTCTTTGCGGAGGTCA
ATGCCGACGTGGTAGACTGGATCCAGCAGGACGATGGGTCTGTGCACAAATCCATC
AACCGTTCCTGATCGTTGGGCTGAAGATCAGCACTAAGAGCGTGGGCCGAGACGA

GCGGGAGGATATCACCCACACCTACAAATACCCAGAGGGGTCCTCAGAGGAGAGGG
AGGCCTTCACAAGGGCGAACCACCTGAACAAACTGGCCGAGAAGGAGGAGACAGG
GATGGCCATGCGGATCCGTGTGGGCCAGAGCATGAACATGGGCAGTGACTTTGACG
TCTTTGCCACATCACCAACAACACCGCTGAGGAGTACGTCTGCCGCCTCCTGCTCT
GTGCCCCACCGTCAGCTACAATGGGATCTTGGGGCCCGAGTGTGGCACCAAGTACC
TGCTCAACCTCAACCTGGAGCCTTTCTCTGAGAAGAGCGTTCCTCTTTGCATCCTCTA
TGAGAAATACCGTGACTGCCTTACGGAGTCCAACCTCATCAAGGTGCGGGCCCTCCT
CGTGGAGCCAGTTATCAACAGCTACCTGCTGGCTGAGAGGGACCTCTACCTGGAGA
ATCCAGAAATCAAGATCCGGATCCTTGGGGAGCCCAAGCAGAAACGCAAGCTGGTG
GCTGAGGTGTCCCTGCAGAACCCGCTCCCTGTGGCCCTGGAAGGCTGCACCTTCACT
GTGGAGGGGGCCGGCCTGACTGAGGAGCAGAAGACGGTGGAGATCCCAGACCCCGT
GGAGGCAGGGGAGGAAGTTAAGGTGAGAATGGACCTGCTGCCGCTCCACATGGGCC
TCCACAAGCTGGTGGTGAACCTCGAGAGCGACAAGCTGAAGGCTGTGAAGGGCTTC
CGGAATGTCATCATTGGCCCCGCC

TAActcgag

pT7-7/NTST-hTGase 2

5'–**NdeI**–**Start**–**Twin-Strep-tag**–**Thrombinschnittstelle**–**NheI**–hTGase 2–**Stop**–**BamHI**–3'

catatgagctggagccaccctcagttcgagaaaggtggaggttccggaggtggatctggaggtggttcattggagccaccacagtt
cgaaaaatccggtctggttccgctggctccgctagc

GCCGAGGAGCTGGTCTTAGAGAGGTGTGATCTGGAGCTGGAGACCAATGGCCGAGA
 CCACCACACGGCCGACCTGTGCCGGGAGAAGCTGGTGGTGCACGGGGCCAGCCCT
 TCTGGCTGACCCTGCACTTTGAGGGCCGCAACTACGAGGCCAGTGTAGACAGTCTCA
 CCTTCAGTGTTCGTGACCGGCCAGCCCCTAGCCAGGAGGCCGGGACCAAGGCCCGTT
 TTCCACTAAGAGATGCTGTGGAGGAGGGTGACTGGACAGCCACCGTGGTGGACCAG
 CAAGACTGCACCCTCTCGCTGCAGCTCACCACCCCGGCCAACGCCCCCATCGGCCTG
 TATCGCCTCAGCCTGGAGGCCTCCACTGGCTACCAGGGATCCAGCTTTGTGCTGGGC
 CACTTCATTTTGCTCTTCAACGCCTGGTGCCAGCGGATGCTGTGTACCTGGACTCGG
 AAGAGGAGCGGCAGGAGTATGTCTCACCCAGCAGGGCTTTATCTACCAGGGCTCG
 GCCAAGTTCATCAAGAACATACCTTGAATTTTGGGCAGTTTGAAGATGGGATCCTA
 GACATCTGCCTGATCCTTCTAGATGTCAACCCCAAGTTCCTGAAGAACGCCGGCCGT
 GACTGCTCCCGCCGACAGCCCCGTCTACGTGGGCCGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 AACTGCAACGATGACCAGGGTGTGCTGCTGGGACGCTGGGACAACAACACTACGGGGA
 CGGCGTCAGCCCCATGTCCTGGATCGGCAGCGTGGACATCCTGCGGCGCTGGAAGA
 ACCACGGCTGCCAGCGCGTCAAGTATGGCCAGTGTGGGTCTTCGCCGCCGTGGCCT
 GCACAGTGTGAGGTGCCTGGGCATCCCTACCCGCGTTCGTGACCAACTACAACCTCGG
 CCCATGACCAGAACAGCAACCTTCTCATCGAGTACTTCCGCAATGAGTTTGGGGAGA
 TCCAGGGTGACAAGAGCGAGATGATCTGGAACCTTCCACTGCTGGGTGGAGTCGTGG
 ATGACCAGGCCGGACCTGCAGCCGGGGTACGAGGGCTGGCAGGCCCTGGACCCAAC
 GCCCCAGGAGAAGAGCGAAGGGACGTAAGTGTGGCCAGTTCAGTTCGTGCCA
 TCAAGGAGGGCGACCTGAGCACCAAGTACGATGCGCCCTTTGTCTTTGCGGAGGTCA
 ATGCCGACGTGGTAGACTGGATCCAGCAGGACGATGGGTCTGTGCACAAATCCATC
 AACCGTTCCTGATCGTTGGGCTGAAGATCAGCACTAAGAGCGTGGGCGGAGACGA
 GCGGGAGGATATCACCCACACCTACAAATACCCAGAGGGGTCTCAGAGGAGAGGG
 AGGCCTTCACAAGGGCGAACCACCTGAACAAACTGGCCGAGAAGGAGGAGACAGG
 GATGGCCATGCGGATCCGTGTGGGCCAGAGCATGAACATGGGCAGTGAATTTGACG
 TCTTTGCCACATCACCAACAACACCGCTGAGGAGTACGTCTGCCGCCTCCTGCTCT
 GTGCCCGCACCGTCAGCTACAATGGGATCTTGGGGCCCGAGTGTGGCACCAAGTACC

TGCTCAACCTCAACCTGGAGCCTTTCTCTGAGAAGAGCGTTCCTCTTTGCATCCTCTA
TGAGAAATACCGTGACTGCCTTACGGAGTCCAACCTCATCAAGGTGCGGGCCCTCCT
CGTGGAGCCAGTTATCAACAGCTACCTGCTGGCTGAGAGGGACCTCTACCTGGAGA
ATCCAGAAATCAAGATCCGGATCCTTGGGGAGCCCAAGCAGAAACGCAAGCTGGTG
GCTGAGGTGTCCCTGCAGAACCCGCTCCCTGTGGCCCTGGAAGGCTGCACCTTCACT
GTGGAGGGGGCCGGCCTGACTGAGGAGCAGAAGACGGTGGAGATCCCAGACCCCGT
GGAGGCAGGGGAGGAAGTTAAGGTGAGAATGGACCTGCTGCCGCTCCACATGGGCC
TCCACAAGCTGGTGGTGAACCTCGAGAGCGACAAGCTGAAGGCTGTGAAGGGCTTC
CGGAATGTCATCATTGGCCCCGCC

TAAaagctt

Eidesstattliche Erklärung:

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. S. Herzig und Herrn Dr. M. Pietsch betreut worden.

Teilpublikationen:

A fluorescence anisotropy-based assay for determining the activity of tissue transglutaminase

Hauser C., Wodtke R., Löser R., Pietsch M.

Amino Acids **2017**; 49(3):567-583. doi: 10.1007/s00726-016-2192-5

N^ε-Acryloyllysine Piperazides as Irreversible Inhibitors of Transglutaminase 2: Synthesis, Structure-Activity Relationships, and Pharmacokinetic Profiling.

Wodtke R., Hauser C., Ruiz-Gómez G., Jäckel E., Bauer D., Lohse M., Wong A., Pufe J., Ludwig FA., Fischer S., Hauser S., Greif D., Pisabarro MT., Pietzsch J., Pietsch M., Löser R.

J Med Chem. **2018**; 24;61(10):4528-4560. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00286

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffenden Veränderungen, dem Promotionsausschuss unverzüglich mitzuteilen.

Köln, 06.01.2021