

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Peptidische Inhibitoren einer Filarienchitinase:
Selektion und Charakterisierung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Falk Schwendicke

aus Pasewalk

Gutachter: 1. Prof. Dr. W. Höhne
2. Prof. Dr. rer. nat. R. Lucius
3. Prof. Dr. A. Kramer

Datum der Promotion: 30.01.2009

Meiner Familie

The road to wisdom?

Well, it's plain and simple to express:

Err and err and err again

but less and less and less.

zitiert in

Daniel C. Dennett:

Darwin's dangerous idea –

Evolution and the meanings of life

ABSTRACT

Background: Chitinases are widespread enzymes which catalyze the hydrolysis of *N*-acetylglucosamine homopolymers. They are attractive targets for inhibitors with chemotherapeutic potential against bacteria, fungi or parasites. Most known inhibitors act competitively by mimicking substrates or reaction intermediates, usually in a non-specific manner. In this thesis, peptide inhibitors of chitinase from the rodent filaria *Acanthocheilonema viteae* should be selected and analyzed. *A. viteae* can be used as a model for *Onchocerca volvulus*, the cause of river blindness, a widespread infection disease. Actual strategies to eliminate this disease have numerous side effects and are mostly ineffective against adult filariae. Chitinases are important molecules for the development and transmission of parasitic nematodes and thought to be promising targets for new therapeutical approaches. The design of specific chitinase inhibitors could therefore be a further step in drug development against filariasis.

Method: Chitinase from *A. viteae* was overexpressed in *Escherichia coli*, followed by purification and kinetic analysis. Two different M13 phage-display libraries were screened. DNA of selected phages was extracted and sequenced. Peptides were synthesized and tested for inhibition of the hydrolytic activity of *A. viteae* chitinase.

Results: One linear and one constrained peptide which bound to *A. viteae* chitinase competitively inhibited enzyme function with K_i values in the low micromolar range. These peptides showed specific inhibitory behaviour against chitinase from *A. viteae* and closely related filariae. By the help of substitutional analyses using chemical synthesized peptides, characteristic amino acids with importance for the inhibition could be identified. Based on modelling and docking analyses as well as sequence comparisons putative mechanisms of the observed specific inhibition could be disclosed.

Conclusions: Phage-display based selection for ligands was found to be an appropriate method to find specific inhibitors of chitinases. Substitutional analyses are useful to identify inhibition-relevant amino acids within the peptide sequence. Found inhibitors are probably making hydrophobic as well as ionic interactions with predominantly conserved residues of the chitinase. The peptides or derived peptidomimetic molecules should be studied for effects on filarial nematodes *in vivo*. Structural enlightenment of an enzyme-inhibitor complex could give further information about the mode of operation of filarial chitinases.

Keywords: chitinase, inhibitor, filaria, *Acanthocheilonema viteae*, phage-display

Schlagwörter: Chitinase, Inhibitor, Filarien, *Acanthocheilonema viteae*, Phagendisplay

INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRACT	V
ABKÜRZUNGEN	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Chitinasen	1
1.1.1 Chitin	1
1.1.2 Verbreitung und Bedeutung von Chitinasen	2
1.1.3 Einteilung der Chitinasen	3
1.2 Filarien und ihre Chitinasen	7
1.2.1 Filarien, <i>Acanthocheilonema viteae</i>	7
1.2.2 Filariosen	8
1.2.3 Filarienchitinasen	11
1.3 Chitinaseinhibitoren	14
1.4 Molekulare Mimikry, Kreuzreaktivität, Polyspezifität	16
1.4.1 Natürliche Molekularnachahmung	17
1.4.2 Kreureaktivität und Polyspezifität	18
1.4.3 Anwendung	18
1.5 Molekulare Evolution und Displaytechnologien	19
1.5.1 Molekulare <i>in-vitro</i> -Evolution	19
1.5.2 Display-Technologien	19
1.5.3 Phagendisplay	21
1.5.4 Peptid-Arrays	25
1.6 Ziele der Arbeit	27
2 MATERIAL UND METHODEN	28
2.1 Materialien	28
2.1.1 Chemikalien	28
2.1.2 Medien	29
2.1.3 Puffer und Lösungen	29
2.1.4 Bakterienstämme	30
2.1.5 Phagen	31
2.1.6 Enzyme	31
2.1.7 Substrate	31
2.1.8 Peptide	32
2.1.9 Antikörper, Kits, Standards, Säulen, Vektoren	32
2.1.10 Geräte, Zubehör, Software	33
2.2 Methoden	35
2.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren	35

2.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA	35
2.2.1.2	Restriktionsverdau und -analyse	35
2.2.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.2.1.4	Analytische Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.1.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
2.2.1.6	DNA-Sequenzierung	37
2.2.2	Gewinnung enzymatisch aktiven Proteins	37
2.2.2.1	Zellanzucht	37
2.2.2.2	Transformation CaCl ₂ -kompetenter Zellen	37
2.2.2.3	Proteinexpression	38
2.2.2.4	Zellaufschluss und Fraktionierung	38
2.2.2.5	Proteinreinigung	38
2.2.3	Proteinanalytik	39
2.2.3.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	39
2.2.3.2	Coomassie-Färbung von Acrylamid-Gelen	39
2.2.3.3	Immunoblotting (<i>semidry</i> Westernblotting)	40
2.2.3.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Peptiden	40
2.2.4	Phagendisplay	40
2.2.4.1	Phagenselektion (<i>Panning</i>)	41
2.2.4.2	Amplifizierung und Aufreinigung von Phagen	43
2.2.4.3	Bestimmung des Phagentiters	44
2.2.4.4	Phagen-ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	44
2.2.4.5	Sequenzierung von Phagen-DNA	45
2.2.5	Kinetische Charakterisierung von <i>A. viteae</i> Chitinase	45
2.2.5.1	Prinzip der Aktivitätsmessung über Fluoreszenzassays	45
2.2.5.2	Bestimmung der spezifischen enzymatischen Aktivität	45
2.2.5.3	Bestimmung des K _M -Wertes	46
2.2.5.4	Milieuabhängige Aktivitätsbestimmungen	46
2.2.5.5	Aktivitätsmessungen mit hochmolekularem Substrat	46
2.2.6	Inhibitorcharakterisierung und -optimierung	47
2.2.6.1	Enzymkinetik unter Zugabe von Inhibitoren	47
2.2.6.2	Bestimmung des K _i -Wertes	47
2.2.6.3	SH-Gruppenbestimmung mittels Ellmann´s Reagenz (DTNB)	48
2.2.6.4	Bindung an membrangebundene Peptide	48
2.2.6.5	Komplexe Substitutionsanalyse mittels abgespaltener Peptid-SPOTS	49
2.2.7	Statistische Auswertung	49
3	ERGEBNISSE	50
3.1	Expression und Aufreinigung von <i>A. viteae</i> Chitinase	50
3.1.1	Plasmidpräparation, -analyse und Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	50
3.1.2	Expression, Gewinnung und Reinigung enzymatisch aktiver Chitinase	52
3.2	Phagen-Display zum Auffinden von Inhibitorpeptiden	54
3.2.1	Phagen-Display mit zyklisierter Heptapeptid-Bibliothek	56
3.2.2	Phagen-Display mit linearer Heptapeptid-Bibliothek	58
3.2.3	Phagen-Display mit Mischbibliothek	60
3.3	Kinetische Charakterisierung von <i>A. viteae</i> Chitinase	62
3.3.1	Bestimmung des K _M -Wertes	62

3.3.2	Milieuabhängigkeit der Aktivität	63
3.3.3	Bestimmung der Substratspezifität	65
3.4	Charakterisierung und Optimierung von Chitinaseinhibitoren	66
3.4.1	Allosamidin-Inhibition von <i>A. viteae</i> Chitinase	68
3.4.1.1	Spezifität von Allosamidin	68
3.4.1.2	Bestimmung des K_i -Wertes	68
3.4.1.3	Hemmung der Hydrolyse von hochmolekularem Substrat	69
3.4.2	Charakterisierung und Optimierung von Peptid ICAV1	69
3.4.2.1	SH-Gruppenbestimmung mittels Ellmanns'-Reagenz (DTNB)	70
3.4.2.2	Überprüfung der Spezifität	70
3.4.2.3	Einfluss von Salzzusätzen auf die Hemmung von Chitinase durch ICAV1	71
3.4.2.4	Bestimmung des K_i -Wertes mit <i>A. viteae</i> Chitinase	71
3.4.2.5	Substitutionsanalyse mittels Alanin- <i>walk</i>	72
3.4.2.6	Komplexe Substitutionanalyse mittels membrangebundener Peptid-SPOTS	73
3.4.2.7	Peptid- <i>Arrays</i>	73
3.4.2.8	Arginin- <i>walk</i>	74
3.4.2.9	Weitere Substitutionen und Hybrid- <i>Squash</i> -Inhibitor	75
3.4.3	Charakterisierung und Optimierung von Peptid ICAV2	76
3.4.3.1	SH-Gruppenbestimmung mittels Ellmanns'-Reagenz (DTNB)	76
3.4.3.2	Überprüfung der Spezifität	76
3.4.3.3	Bestimmung des K_i -Wertes mit <i>A. viteae</i> Chitinase	77
3.4.3.4	Bestimmung des K_i -Wertes mit <i>B. malayi</i> Chitinase	78
3.4.3.5	Substitutionsanalyse mittels Alanin- <i>walk</i>	78
4	DISKUSSION	80
4.1	Expression und Charakterisierung von <i>A. viteae</i> Chitinase	81
4.2	Auffinden potentieller Chitinaseinhibitoren aus molekularen Bibliotheken	83
4.3	Peptidische Inhibitoren einer Filarien-chitinase	89
4.4	Ausblick	104
5	ZUSAMMENFASSUNG	105
6	LITERATURVERZEICHNIS	106

ABKÜRZUNGEN

Ab	engl. <i>antibody</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AU	engl. <i>Absorption Units</i>
bp	Basenpaar(e)
CBD	Chitinbindungsdomäne
CHT	Chitinase
CLP	engl. <i>Chitinase-like-protein</i>
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ϵ	Extinktionskoeffizient
DTNB	5,5-Dithiobis (2-nitro-benzoesäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EtOH	Ethanol
FPLC	engl. <i>fast protein liquid chromatography</i>
GH	Glycosylhydrolasen
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	engl. <i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
ICAV	<u>I</u> nhibitor der <u>C</u> hitinase aus <u>A</u> <i>canthocheilonema</i> <u>v</u> <i>iteae</i>
ICB	<u>I</u> nhibitor der <u>C</u> hitinase <u>B</u> aus <i>Serratia marcescens</i>
IL	Interleukin
IgG/E usw.	Immunglobulin der Klasse G/E usw.
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
K_i	Gleichgewichtskonstante der Inhibitorbindung
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
L1, L2 usw.	Larvenstadium 1, 2 usw.
LB	Luria Bertani
MW	Molekulargewicht
MWCO	engl. <i>molecular weight cutoff</i> , Größenausschluss
N-Ac	N-Acetyl

NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS(T)	engl. <i>phosphat buffered saline (+Tween)</i>
pdb	Proteinstrukturdatenbank
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pfu	engl. <i>plaque forming unit</i>
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PTFE	Polytetrafluorethylen
R	Referenz
RFU	engl. <i>Relative Fluorescence Units</i>
rpm	engl. <i>rotation per minute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	engl. <i>super optimal broth</i> ; Medium mit Glucose-Zusatz
spp.	Spezies
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFE	Trifluoressigsäure
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris-(HCl)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, z.T. mit HCl titriert
Tween	Polyoxyethylensorbitant
U	engl. <i>Unit</i>
UMB	Umbelliferon
UV	Ultraviolettes Licht
Vol.	Volumen
WHO	engl. <i>World Health Organization</i>
Wt	Wildtyp
X-gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-D-galactopyranosid

Abkürzungen von chitinaseproduzierenden Organismen oder Chitinasen

AMCHT	engl. <i>Acidic Mammalian</i> Chitinase
Av(CHT)	<i>Acanthocheilonema viteae</i> (Chitinase)
Bm(CHT)	<i>Brugia malayi</i> (Chitinase)
Ce(CHT)	<i>Canavalia ensiformis</i> (Chitinase)
Do(CHT)	<i>Dioscorea opposita</i> (Chitinase)
HCHT	Humane Chitotriosidase
Ov(CHT)	<i>Onchocerca volvulus</i> (Chitinase)
Pf(CHT)	<i>Plasmodium falciparum</i> (Chitinase)
Sm(CHT A/B/C)	<i>Serratia marcescens</i> (Chitinase A/B/C)

Abkürzungen der Aminosäuren im 1- und 3-Buchstaben-Code

Name	1-Buchstaben-Code	3-Buchstaben-Code
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

1 EINLEITUNG

1.1 Chitinasen

1.1.1 Chitin

Chitinasen sind ubiquitär vorkommende Hydrolasen des Chitins, eines linearen Polymers von β -(1,4)-*N*-Acetylglucosaminen, dessen Zuckereinheiten wie bei der Zellulose alternierend um 180° gedreht sind. Chitin, erstmals 1811 durch Henri Braconnot aus Champignons isoliert und zunächst als Fungin bekannt, trägt den Namen Chitin seit 1823, als Antoine Odier es im Exoskelett (altgriechisch: *chiton* = Hülle) von Maikäfern fand. Die in der Natur in verschiedenen Deacetylierungsstufen vorkommenden unlöslichen Chitinpolymere bestehen aus 100 bis 10000 Monomeren und bilden, u.a. in Abhängigkeit von Hydratation und Kettenanzahl pro Fibrille, verschiedene mikrokristalline Strukturen: α -, β - und γ - Chitin (Muzzarelli, 1999b, Raabe et al., 2007). Abb. 1-1 zeigt die chemische Struktur von Chitin, seine Anordnung als α -Chitin sowie eine Chitin-Nanofibrille.

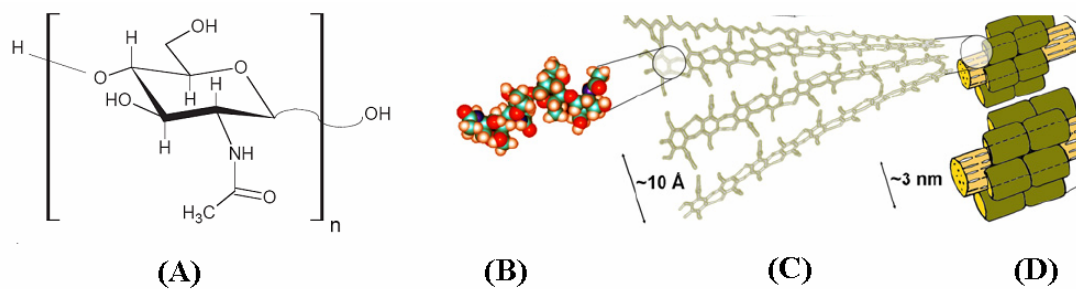


Abbildung 1-1: Chitin. Dargestellt sind (A) ein *N*-Acetylglucosaminbaustein des Chitins, dessen Polymerisation zu einem Chitinmolekül (B) führt, welches in antiparalleler Anordnung α -Chitin (C) bildet. Ca. 20 Chitinketten bilden schließlich Chitin-Nanofasern (D). Weitere mögliche Suprastrukturierungen sind nicht abgebildet worden. Abbildung modifiziert nach Merzendorfer & Zimoch, 2003 (A) bzw. Raabe et al., 2007 (B-D).

Neben Zellulose ist Chitin, welches aufgrund seiner zahlreicheren Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Wechselwirkungen das deutlich stabilere Polymer ist, das am häufigsten vorkommende Glykopolymer auf der Erde. Mehr als 10 Milliarden Tonnen Chitin werden pro Jahr durch zahlreiche Organismen unseres Planeten produziert (Muzzarelli, 1999b). In Pilzen soll Chitin neben seinem Vorkommen in der extrazellulären Matrix u. a. nutritive und morphogenetische Funktionen haben (Adams, 2004). Die Hülle von Insekten wird durch eine in der Bauweise dem Stahlbeton ähnliche Matrix aus Chitinfasern und Proteinen stabilisiert (Kramer & Muthukrishnan, 1997). Chitin konnte in der Eihülle von Nematoden nachgewiesen werden (Muzzarelli, 1999b); Schalentiere wie Krill bestehen zu ca. 75% aus Chitin (Wang et al., 1997). Für symbiontische Beziehungen zwischen Pflanzen und Bakterien sind Chitin und Chitinderivate als morphogenetische Steuerungsfaktoren bekannt (Semino & Robbins, 1995, Meyer & Kreil, 1996), ähnliches ist für die Embryogenese von Wirbeltieren, beispielsweise von

Zebrafischen, nachgewiesen worden (Bakkers et al., 1999). Die praktischen Anwendungsbeispiele für Chitin reichen von der Nahrungsmittel- über die chemische Industrie bis hin zur Abwasserklärung (Flach et al., 1992). Medizinische Relevanz hat vor allem deacetyliertes Chitin, sogenanntes Chitosan, welches als biokompatibles Polymer beispielsweise im Bereich des *tissue engineering*s eingesetzt werden kann. Ebenso soll Chitosan Wundheilungsprozesse befördern können und über antimikrobielle Eigenschaften verfügen (Kato et al., 2003; Shi et al., 2006).

1.1.2 Verbreitung und Bedeutung von Chitinasen

Trotz dieser enormen Verbreitung sowie seiner hohen chemischen Widerstandskraft und Unlöslichkeit befindet sich Chitin in einem als „*steady state*“ bezeichneten Fließgleichgewicht (Kawada et al., 2007). Grundlage dafür ist die Tatsache, dass chitinolytische Enzyme, z. B. Chitinasen, in der Natur ebenso weit verbreitet sind wie ihr Substrat (Gooday, 1999). So sind bakterielle Chitinasen bedeutsam für die Verdauung und Nutzung von Chitin als Kohlenstoff- und Energiequelle, Pflanzen nutzen Chitin abbauende Enzyme zur Abwehr und während ihrer Morphogenese (Graham & Sticklan, 1994). Chitinasen von Insekten und Krustentieren sind bei Häutungsvorgängen in der postembryonalen Entwicklung bedeutsam (Merzendorfer & Zimoch, 2003). Im Genom zahlreicher Baculoviren, u.a. *Autographa californica*, konnten Chitinasegene nachgewiesen werden (Hawtin et al., 1995; Thomas et al., 2000). In manchen Wirbeltieren sind Chitinasen enzymatische Bestandteile des Verdauungs- und Respirationstraktes (Boot et al., 2001), wobei auch Abwehrfunktionen, u.a. gegen Pilze, nachgewiesen werden konnten (Gooday, 1999). Die biotechnologischen Anwendungen von Chitinasen sind vielfältig und betreffen u. a. Landwirtschaft – dort z. B. als Insektizide, Fungizide und Pestizide -, sowie Umweltschutz und Industrie (Lorito et al., 1998; Felse & Panda, 1999; Herrera-Estrello & Chet, 1999).

Medizinische Relevanz finden Chitinasen nicht zuletzt durch ihre mögliche Rolle bei der Abwehr von chitinhaltigen Pathogenen (Boot et al., 1995, 1998; Gooday, 1999), z. B. von *Candida albicans* durch humane Chitotriosidase (Labadaridis et al., 2005). Letzteres Enzym wird als nicht essentieller Teil des angeborenen Immunsystems (Hollak et al., 1994; Boot et al., 1998) von humanen Makrophagen sezerniert, kommt aber auch in kleinen Anteilen als zelluläre Fraktion (u. a. lysosomal) vor (Renkema et al., 1995). Chitotriosidase-defiziente Patienten weisen eine höhere Anfälligkeit für Nematodeninfektionen auf (Choi, 2001). Der bei lysosomalen Speicherkrankheiten wie der Gaucher-Erkrankung oder Morbus Fabry teilweise

1000fach erhöhte Chitotriosidase-Plasmaspiegel dient als wichtiger Biomarker dieser Erkrankungen für Diagnostik und Therapie (Deegan et al., 2005). Die Urinkonzentration des Enzyms ist bei Nierenschäden, z. B. Glomerulonephritis, chronischer Pyelonephritis, schwerem Diabetes mellitus oder durch transiente Hypoxien, erhöht (Muzzarelli, 1999a).

Die humane saure Säugerchitinase (*Acidic Mammalian Chitinase*, AMCHT) und enzymatisch inaktive *chitinase-like-proteins* (CLPs) werden mit chronisch entzündlichen Erkrankungen oder Allergien in Verbindung gebracht. AMCHT soll beispielsweise im Rahmen der Pathogenese von Asthma bronchiale als Stimulans der durch Makrophagen, T-Zellen und eosinophile Granulozyten unterhaltenen Entzündung dienen (Elias et al., 2003, 2005; Zhu et al., 2004; Zhao et al., 2005; Kawada et al., 2007). Weitere, mit Chitinasen oder CLPs interagierende Entzündungsprozesse finden sich u. a. auch bei chronischer Rhinosinusitis (Ramanathan et al., 2006), rheumathoider Arthritis (Hakala et al., 1993), Leberzirrhose (Cintin et al., 1999), Arteriosklerose (Boot et al., 1999), akuter Pneumokokkenpneumonie (Nordenbaek et al., 1999) oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa (Kawada et al., 2007).

Unklar bleiben hingegen die physiologischen Funktionen von Chitinasen bei Säugern: Neben der genannten Abwehr chitinhaltiger Pathogene scheinen Chitinasen oder CLPs eine protektive Wirkung auf die extrazelluläre Matrix durch Hemmung von Matrixmetalloproteasen und IL-8 zu haben (Ling & Recklies; 2004). Ebenso werden Steuerungseffekte auf die zelluläre Proliferation und Differenzierung, basierend auf lektinähnlicher Kohlenhydraterkennung, diskutiert (Johansen et al., 1996).

1.1.3 Einteilung der Chitinasen

Zur Klassifikation von Chitinasen werden verschiedene Systeme verwendet. So basiert die IUB-Nomenklatur (1984) von Enzymen auf dem katalytischen Reaktionsmechanismus und der Substratspezifität. Glycosylhydrolasen besitzen den Code EC 3.2.1.x, der auf die Hydrolyse von O-Glycosylverbindungen hinweist und mit der letzten Ziffer Substrat und teilweise auch molekularen Mechanismus kodiert (Henrissat, 1991). Daraus abgeleitet können Chitinasen in Endochitinasen (EC 3.2.1.14) bzw. Exochitinasen unterteilt werden, wobei Endochitinasen die Kohlenhydratketten an beliebigen Stellen spalten und dadurch lösliche, niedermolekulare Multimere wie Chitotetraose oder -triose produzieren (Cohen-Kupiec & Chet, 1998). Exochitinasen lassen sich nochmals in Chitobiosidasen, d.h. vom reduzierenden Terminus der

Kette Chitobiose abspaltende Enzyme (EC 3.2.1.29), und *N*-Acetylglucosaminidasen (EC 3.2.1.30) einteilen. Letztere spalten aus den Oligomerprodukten von Endochitinasen oder Chitobiosidasen ausnahmslos *N*-Acetylglucosamin-Monomere ab. Alternativ zum Chitinabbau durch Chitinasen kann eine Deacetylierung des Chitins und eine anschließende Hydrolyse durch Chitosanasen (EC 3.2.1.132) erfolgen. Letztere hydrolysieren Chitosan (überwiegend deacetyliertes Chitin) zu Glucosaminen. Die Verbreitung dieser Einteilung fußt auf ihrer Einheitlichkeit, jedoch sind aus der oben beschriebenen Systematik keinerlei Aussagen zu struktureller oder evolutionärer Verwandtschaft möglich.

Neben der beschriebenen Einteilungen findet daher häufig eine von Henrissat und Bairoch entworfene Klassifikation von Glycosylhydrolasen (GH) Anwendung (Henrissat, 1991, 1999; Henrissat & Bairoch, 1993). Die Zuordnung der Enzyme erfolgt dabei nach Aminosäuresequenzhomologien der katalytischen Zentren, wobei Chitinasen dann in die GH-Familien 18, 19 und 20 einzuordnen sind. Erstere Gruppe umfasst mehr als 180 Enzyme (Henrissat, 1999) und ist äußerst heterogen hinsichtlich ihrer Ursprungsorganismen (Viren, Bakterien, Pilze, Tiere, einige Pflanzen). Es bestehen sowohl strukturell als auch bezüglich des katalytischen Mechanismus deutliche Unterschiede zur GH-Familie 19, welche v.a. Chitinasen aus Pflanzen und einigen Pilzen bzw. Nematoden umfasst (Hamel et al., 1997; Suzuki et al., 1999). Die Familie 20 besteht aus *N*-Acetylhexosaminidasen und -glucosaminidasen, die in Bakterien, Pilzen und dem Menschen vorkommen.

Chitinasen der Glycosylhydrolase Familie 18

Homologien der Aminosäuresequenzen der katalytischen Zentren einzelner Familien finden auch in der jeweiligen dreidimensionalen Struktur Niederschlag: So weisen Mitglieder der GH-Familie 18 ein $(\beta\alpha)_8$ -barrel auf (Perrakis et al., 1994; van Aalten et al., 2000; Hollis et al., 2000; Fusetti et al., 2002), eine erstmals bei der Triosephosphatisomerase gefundene Faltungsstruktur, daher „TIM-barrel“ (Lasters et al., 1988). Charakteristischerweise findet man bei Chitinasen innerhalb des *barrels* verschiedene konservierte Sequenzmotive, wie z. B. das den katalytisch wichtigen Glutamatrest enthaltende DXDXE-Motiv im 4. β -Strang (Watanabe et al., 1993; Bortone et al., 2002). Die Besetzung des katalytischen Spaltes mit aromatischen Aminosäuren soll der Substratbindung dienen (Fusetti et al., 2002; Synstad et al., 2004; Katouno et al., 2004). Typische Vertreter von Familie 18 Chitinasen mit beschriebenen Strukturen sind das chitinolytische Hevamin aus dem Gummibaum (Terwisscha van Scheltinga et al., 1994,

1996), die Chitinasen A und B von *Serratia marcescens* (Perrakis et al., 1994; Houston et al., 2002a) Chitinase I aus dem Pilz *Coccidioides immitis* (Hollis et al., 2000) oder die humane Chitotriosidase (Boot et al. 1998, Bhattacharya et al., 2007). Die Röntgenkristallstruktur letzteren Enzyms ist in Abbildung 1-4 am Ende dieses Abschnittes dargestellt.

GH-18 Chitinasen nutzen einen einzigartigen katalytischen Mechanismus (Abb. 1-2), der die Mithilfe des Substrates erfordert („substratassistent“), und dabei ein als Oxazolinium-Reaktionsintermediat bezeichnetes Zwischenprodukt bildet (Hart et al., 1995; Robertus & Monzingo, 1999, Merzendorfer & Zimoch, 2003).

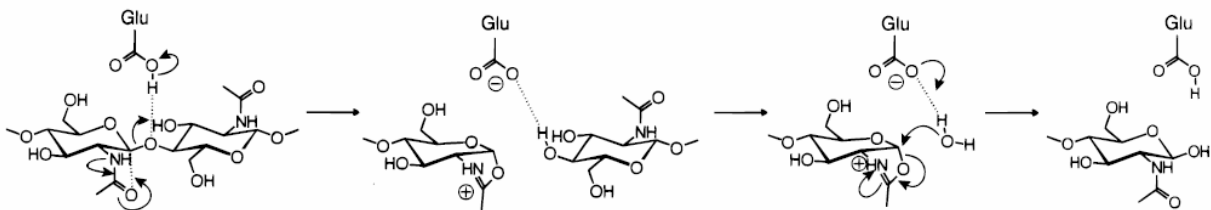


Abbildung 1-2: Katalytischer Mechanismus von Chitinasen der GH-Familie 18. Die Protonierung des glykosidischen Sauerstoffes durch den katalytischen Glutamatrest führt zur Spaltung der Glykosidbindung. Die *N*-Acetylgruppe des Substrats selbst bewirkt dabei einen nukleophilen Angriff, die Stabilisierung des Übergangszustandes erfolgt durch Bildung des Oxazolinium-Reaktionsintermediates. Die ursprüngliche Stereochemie wird schließlich wieder hergestellt (Retentionsmechanismus). Details siehe Text (mod. nach Tews et al., 1997).

Zunächst wird der in der -1 Substratbindungstasche liegende Zuckerrest durch Bindung rotiert und in die Boot- oder Sofakonformation gezwungen. Durch Protonierung des glykosidischen Sauerstoffes des -1 *N*-Acetylglucosamins durch den katalytischen Glutamatrest kommt es zur Spaltung der O-Brücke der zwischen den Substratbindungsdomänen -1 und $+1$ liegenden Kettenglieder. Das positiv geladene Oxazolinium-Intermediat wird nun durch eine kovalente Bindung des Carboxylsauerstoffes der *N*-Acetylgruppe mit dem C1-Atom des Zuckers stabilisiert, ebenso wird eine weitere Stabilisierung des kationischen Oxazoliniums durch ionische Paarinteraktion mit einem Aspartatrest diskutiert (Bortone et al., 2002). Nach Verlassen des in den Taschen $+1$ und $+2$ liegende Acetylzuckers wird der Glutamatrest durch ein Wassermolekül reprotoniert und die ursprüngliche Stereochemie des verbleibenden Zuckers wieder hergestellt. Im Gegensatz zu Chitinasen der GH-Familie 19 (s.u.) wird ein zweiter Carboxylrest nicht benötigt, eine Inversion des -1 -Zuckers findet ebenso nicht statt (Retentionsmechanismus). Daneben weisen einige dieser Enzyme Transglykosylaseaktivität auf. Entstehende Produkte sind Chitobiose, -triose und -tetraose (Terwisscha van Scheltinga et al., 1995; Tews et al., 1997; Robertus & Monzingo, 1999; Fukamizo, 2000).

Chitinasen der Glycosylhydrolase Familie 19

Zur Familie 19 zählen vor allem pflanzliche, aber auch Pilzchitinasen, denen die strukturelle Ähnlichkeit zum α -Helix reichen Hühnereiweißlysozym gemein ist. Beispielhaft seien die Chitinase C1 von *Streptomyces griseus* (Ohno et al., 1996) sowie Chitinasen aus der Jackbohne, *Canavalia ensiformis* (Hahn et al., 2000), oder der Saatgerste, *Hordeum vulgare* (Hart et al., 1995) genannt. Die Röntgenkristallstruktur letzteren Enzyms ist in Abb. 1-5 gezeigt.

Solche Chitinasen spalten Chitin vor allem über Inversionsmechanismen (Robertus & Monzingo, 1999; Fukamizo, 2000; Honda et al., 2004). Dabei wirken zwei beteiligte Carboxylgruppen des Enzyms agonistisch: Durch Protonierung des glykosidischen Sauerstoffes kommt es zur Inversion in die α -Form, gleichzeitig aktiviert eine als Base wirkende Carboxylgruppe Wassermoleküle, welche anschließend die zu spaltende Glykosidbindung angreifen. (Abb. 1-3). Ein ähnlicher Mechanismus liegt auch der Lysozymkatalyse zugrunde (Fukamizo, 2000).

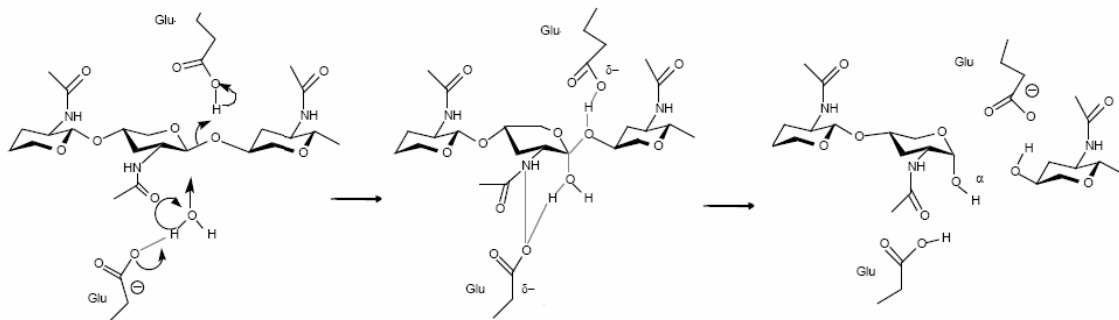


Abbildung 1-3: Katalytischer Mechanismus von GH-19 Chitinasen am Beispiel der Chitinase aus der Saatgerste. Die Carboxylgruppen zweier Glutamatreste wirken agonistisch im Sinne einer Säure-Basen-Katalyse. Die Protonierung des glykosidischen Sauerstoffs führt zur Inversion und zur Bildung des Oxacarbeniumreaktionsintermediats, ein durch die zweite Carboxylgruppe aktiviertes Wassermolekül führt zur Spaltung an C1 (mod. nach Fukamizo, 2000).

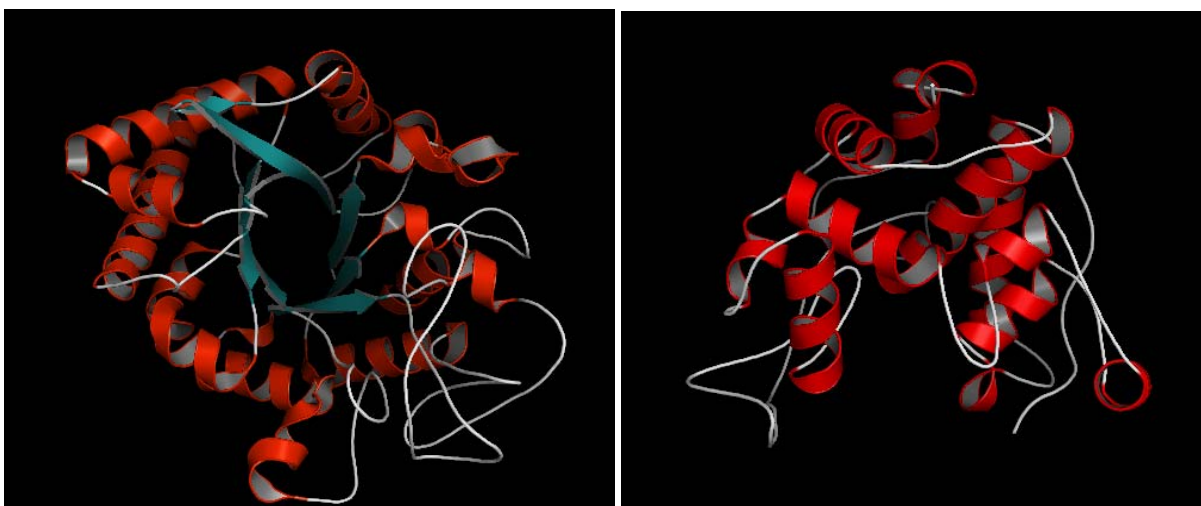


Abbildung 1-4 und 1-5: Röntgenkristallstrukturen zweier, aus verschiedenen GH-Familien stammender Chitinasen. Links die zur GH-18-Familie gehörige humane Chitotriosidase (HCHT, Fusetti et al., 2002, pdb 1lq0); rechts die Chitinase aus der Saatgerste, *Hordeum vulgare*, zur GH-19-Familie gehörig (Hart et al., 1995, pdb 2baa). Strukturmerkmale wie das $(\beta\alpha)_8$ -barrel der HCHT oder die zahlreichen α -Helices der pflanzlichen Chitinase werden deutlich.

1.2 Filarien und ihre Chitinasen

1.2.1 Filarien, *Acanthocheilonema viteae*

Filarien, Fadenwürmer, sind zur Ordnungsgruppe der Spirurida gehörende, parasitische Nematoden (Rundwürmer), die in die Superfamilie der Filarioidea eingeordnet werden. Letztere wird in die Familien Filariidae und Onchocercidae unterteilt, welche nochmals aus 2 bzw. 8 Subfamilien bestehen (Anderson & Bain, 1976; Bain et al. 1982, Anderson, 2000). Zu den Onchocercidae zählen z. B. die Subfamilien der Dirofiliinae (z.B. *Loa loa*) und der Onchocercinae, zu letzterer gehören u.a. *Brugia* Spezies (spp.), *Acanthocheilonema* spp., *Onchocerca* spp. und *Wucheria bancrofti*. Die genannten Filarien gelten als Verursacher von noch zu beschreibenden Erkrankungen, eine Übersicht humanpathogener Fadenwürmer und Filariosen gibt Tab. 1-1.

Tabelle 1-1: Humanpathogene Filarien und ihre Merkmale (mod. nach Pantchev, 2006).

Spezies	Verbreitung	Vektoren	Lokalisation Adulte/ Mikrofilarien	Symptomatik
<i>B. malayi</i>	Indien, Afrika, Südasiens	Moskitos	Lymphatisches System/ Blut	Lymphadenitis, Elephantiasis,
<i>B. timori</i>	Indonesien	Moskitos	Lymphatisches System/ Blut	Hydrozele
<i>Loa loa</i>	West-/ Zentralafrika	<i>Chrysops</i> spp. (Bremesen)	Bindegewebe/ Blut	“Kamerunbeule”
<i>O. volvulus</i>	Afrika, Jemen, Zentral-/ Südamerika	<i>Simulium</i> spp. (Fliegen)	Haut, Auge, Lymphgewebe	Dermatitis, Okularsymptome, Lymphadenitis
<i>W. bancrofti</i>	Tropen	Moskitos	Lymphatisches System/ Blut	siehe <i>Brugia</i> spp.

Der Lebenszyklus von Filarien besteht aus fünf Stufen:

- (1.) Filarien entwickeln sich im Uterus weiblicher Adulte als Mikrofilarie innerhalb der Eihülle. Bei Entlassung in das Wirtsgewebe lassen einige Filarienspezies wie *O. volvulus* und *A. viteae* die Eierschale im mütterlichen Uterus zurück und verfügen folglich über keinerlei extrakutikulären Strukturen. Andere Fadenwürmer wie *W. bancrofti* oder *B. malayi* restrukturieren und dehnen die Eihülle, um sie in modifizierter Form als Mikrofilarienscheide bis zur Aufnahme durch den Zwischenwirt zu erhalten (Rogers et al., 1976; Ellis et al., 1978).
- (2.) Die Mikrofilarien erreichen über lymphatische oder Blutgefäße das oberflächliche Hautgefäßbett des Wirtes und können nun vom blutsaugenden Arthropoden aufgenommen werden. Für *A. viteae* dienen z. B. Lederzecken wie *Ornithodores moubata* als Zwischenwirte.
- (3.) In ihren Vektoren penetrieren Filarien die Darmwand und wandern in die Speicheldrüsen oder Flugmuskulatur, wo sie sich meist innerhalb von 2 - 4 Wochen zweimal häuten und zu infektiösen Larven des Stadiums L3, die auf Adhärenz und Gewebspenetration spezialisiert sind, entwickeln (Bain & Babayan, 2003).

(4.) Bei einer Blutmahlzeit wandern die L3 in den Stichkanal ein. Es erfolgt die Transmission auf den Wirt, für *A. viteae* überwiegend Nager (Weiss, 1970) wie die lybische oder persische Rennmaus (*Meriones libicus* bzw. *persicus*).

(5.) Die weitere Entwicklung über L4 Larven zu Adulten schließt den Zyklus. Die Entwicklungsdauer kann 50 Tage (*A. viteae*) bis 800 oder mehr Tage (*O. volvulus*) dauern (Pantchev, 2006).

Die *A. viteae* Weibchen sind mit ca. 40 - 70 mm Länge deutlich größer als die Männchen (20 - 40 mm). Beide besiedeln in ihrem Endwirt überwiegend das subkutane Bindegewebe, ca. 25 % der Parasiten werden in Muskelfaszien und nur wenige in von Serosa ausgekleideten Körperhöhlen gefunden (Mössinger & Barthold, 1987). In den genannten Geweben kommt es zur Begattung; nach ca. 48 Tagen Präpatenz (Chandrashekar et al., 1990) entlassen die Weibchen wiederum Mikrofilarien.

Adulte Fadenwürmer persistieren in der Regel über ein längeren Zeitraum mehr oder weniger symptomatisch in den Endwirten. *O. volvulus* Weibchen beispielsweise leben bis zu 15 Jahre in subkutanen, granulomartigen Knoten (Onchozerkomen). Die lange Infektiondauer der Parasiten wird beispielsweise auf genetische Wirtsprädisposition (Meyer et al., 1994) oder Immunmodulation bzw. -suppression (Schönemeyer et al., 2001; Brattig et al., 2001) durch die Parasiten zurückgeführt. Die immunogene Potenz der Filarien konnte bei Infektion von Ratten des Stammes *Mastomys natalensis* mit *A. viteae* durch den Nachweis zytotoxischer Antikörper nach 15 bis 18 Wochen *post infectionem* bewiesen werden (Chandashekar et al., 1990). Zudem konnte gezeigt werden, dass etablierte *A. viteae*-Infektionen von *Meriones unguiculatus* zu einem partiellen Schutz gegen homologe Superinfektionen führen, wobei ein ökologischer Regulationsmechanismus der Populationsdichte vermutet wird (Rajakumar et al., 2006).

1.2.2 Filariosen

Infektionen von Menschen durch Fadenwurmparasiten können in lymphatische, subkutane und seröse Filariosen eingeteilt werden, und zählen weltweit zu den bedeutendsten parasitären Erkrankungen mit teilweise dramatischem Krankheitsbild, wobei vor allem lebende oder absterbende Mikrofilarien Ursache der nicht letal, sondern chronisch verlaufenden Erkrankungen sind.

Lymphatische Filariosen sind Infektionen des humanen Lymphsystems mit durch Moskitos übertragenen Fadenwürmern, wobei hier vor allem *W. bancrofti* (90 % der Infektionen) und *Brugia* spp. (*B. malayi* und *timori*) wichtig sind. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) beziffert die Zahl der betroffenen Menschen auf 2 % der Weltbevölkerung. Insgesamt 120 Millionen in 80 Ländern, vor allem in Indien, Afrika und Südasien, gelten als infiziert, über 40 Millionen Menschen weltweit sind in Folge der Infektion schwer entstellt oder behindert (WHO, 2000). Die Filarien besiedeln im menschlichen Wirt das lymphatische System, der einsetzende Abwehrmechanismus führt zu massiven Schäden des Lymphsystems mit nachfolgender lokaler Abwehrschwäche. Symptome der Infektion reichen von bakteriellen Superinfektionen der Epidermis über Schädigung der Nieren bis zu schweren Lymphödemen. Letzteres führt zum klinischen Vollbild der Elephantiasis, der massiven Vergrößerung von Genitalien und Extremitäten. Die Bekämpfung der Parasiten erfolgt als Massen- oder Individualtherapie mittels Diethylcarbamazin (DEC), Albendazole oder Ivermectin (Awadzi et al., 1995). 99 % der Mikrofilarien können so vernichtet werden (Ottesen, 2000). Prophylaxemaßnahmen, wie eine penible Hygiene und Beförderung des Lymphflusses, sind dabei unerlässlich.

Zu den subkutanen Filariosen zählen beispielsweise die Onchozerkose oder Infektionen mit *Loa loa*. Letztere Würmer leben im Unterhautbindegewebe und verursachen ödematöse Schwellungen („Kamerunbeule“), Juckreiz und Schmerzen. Infektionen mit *O. volvulus*, dem Erreger der Flussblindheit (Onchozerkose), betreffen weltweit ca. 18 Millionen Menschen, vor allem im sogenannten „Afrikanischen Onchozerkalen Gürtel“ vom Senegal bis nach Äthiopien. 4 Millionen Menschen zeigen schwere Haut- und 2 Millionen Betroffene Augensymptome. *O. volvulus* wird von Schwarzfliegen des Genus *Simulium*, welche vor allem in Flussniederungen brüten, übertragen. Die Würmer nisten sich im Endwirt in den mitunter golfballgroßen Onchozerkomein, welche 2 - 4 Würmer enthalten. Zu den Hautsymptomen werden pustulöse Ekzeme, lichenoiden Hyperkeratosen und –pigmentosen oder die durch Depigmentierung hervorgerufenen „Leopardenhaut“ gezählt (Murdoch, 1992). Onchozerkale Okularerkrankungen reichen von Rötung, Keratitis und Photophobie über Nachtblindheit bis zur völligen Erblindung, dem als „Flussblindheit“ beschriebenen, schwersten Symptom.

Die dargestellte Therapie der lymphatischen Filariosen hat sich als ineffektiv gegen adulte Würmer erwiesen, dasselbe gilt für die Therapie der Onchozerkose mittels Ivermectin (Soboslay et al., 1987). Genannte Therapeutika unterbrechen die Transmission der Parasiten und stoppen das Fortschreiten der Erkrankung, eine Heilung und Auslöschung der Parasiten ermöglichen sie jedoch nicht (Behm et al., 2005). Zudem unterliegen auch die vorhandenen Medikamente einem zunehmenden Risiko von Resistenzentwicklungen, wie sie bei Vektorkontrollmedikamenten bereits beobachtet werden (Awadzi et al. 2004).

Gravierend sind die teilweise beschriebenen Nebenwirkungen. Diese werden auf aus sterbenden oder toten Mikrofilarien freigesetzte Substanzen zurückgeführt, die im Sinne von Superantigenen stark immunogen wirken. Dabei wird vermehrt die Bedeutung symbiontischer Rickettsien des Genus *Wolbachia*, welche in bestimmten Filariensubfamilien und –spezies anzutreffen sind und vermutlich vertikal übertragen werden, diskutiert (Bandi et al., 1998, Bazzocchi et al., 2000, Saint-André et al., 2002; Taylor et al., 2005, Müller & Zahner, 2005). Bakterielle Oberflächenmoleküle, z.B. Lipopolysaccharide, könnten bei der Bekämpfung der Filarien vermehrt freigesetzt werden. Im Ergebnis kommt es durch die Therapie zur massiven Überflutung mit inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IFN γ oder Stickstoffmonoxid (NO), welche massive und generalisierte Entzündungsphänomene befördern.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass kein Wirkstoff alle Kriterien eines idealen Antifilarienpharmakons erfüllt, z.B. Gabe *per os*, Wirksamkeit gegen Mikro- und Makrofilarien, keine Nebenwirkungen durch das Abtöten der Würmer, effektiv auch bei jährlich einmaliger Einnahme usw. (Behm et al., 2005). Die Suche nach neuen, diesen Kriterien genügenden Pharmaka gestaltet sich schwierig: Humanpathogene Filarien sind aufgrund ihrer strengen Wirtsspezifität nur eingeschränkt untersuchbar - für *in vivo* Versuche muss auf Tiermodelle ausgewichen werden, wobei oftmals weder der gesamte Lebenszyklus der Parasiten noch die natürliche Umgebung nachgebildet werden können (Abraham et al., 2002). *B. pahangi*-Infektionen von Katzen sind als Modell für humanpathogene lymphatische Filarien etabliert (Grenfell et al., 1991). *A. viteae* als Bindegewebsfilarie (Lucius & Textor, 1995) kann in dem experimentellen Wirtstier *Meriones unguiculatus* (mongolische Rennmaus) als Modellorganismus für die Onchozerkose dienen, da sowohl *O. volvulus* als auch *A. viteae* im subkutanen Bindegewebe angesiedelt sind und über ähnliche antigene Eigenschaften verfügen (Adam et al., 1996). Das beschriebene Modellsystem kann durch für Filariosen beschriebene

Kreuzimmunisierung (Geiger et al., 1996) für Vakzinationsversuche dienen (Abraham et al., 2002; Bleiss et al., 2002), ebenso sind Screenings filarizider Substanzen in diesem Modell möglich (Zahner & Schares, 1993), wobei die Angriffspunkte im Filarienmetabolismus vielfältig sind (Gupta & Srivastava, 2006). Als potentielle Zielmoleküle werden dabei u. a. Chitinasen diskutiert.

1.2.3 Filarienchitinasen

Domänenstruktur

Die Chitinasen der meisten Filarien gehören zur Familie 18 der Glycosylhydrolasen (GH), deren Gemeinsamkeit eine charakteristische Multidomänenorganisation ist: Einer der Sekretion der Chitinase in den Extrazellulärraum dienenden N-terminalen Signalsequenz folgt die katalytische Region, welche die N-terminale Hälfte des Enzyms ausmacht und über zwei hochkonservierte Sequenzen verfügt. Die zweite dieser Sequenzen, das bereits angesprochene DXDXE-Motiv, enthält den für die Katalyse entscheidenden Glutamatrest (Henrissat, 1991; Watanabe et al., 1993; Fukamizo, 2000; Bortone et al., 2002; Coutinho et al., 2003), dessen Bedeutung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte: So führen Mutation dieses Glutamats zum Verlust der enzymatischen Aktivität der Chitinasen. Umgekehrt ist dieser Rest bei inaktiven, sonst aber stark chitinasehomologen Chitolektinen nicht anzutreffen (Watanabe et al., 1993).

Es schließt sich eine Serin-Threonin-reiche *Linker*-Region an, für die teilweise eine posttranslationale O-Glykosylierung bekannt ist. Letztere soll der Sekretion und Löslichkeit sowie der Stabilität und Proteaseresistenz des Enzyms dienen (Arakane et al., 2003). Dieser *Linker*-Domäne, welche durch die geschilderte Modifikation vermutlich stark gestreckt und ohne Sekundärstrukturen ausgebildet wird, soll eine Platzhalterfunktion zwischen katalytischer Domäne und Chitinbindungsdomäne zukommen (Linder & Terri, 1997).

Die C-terminale Chitinbindungsdomäne (CBD), die nicht mit der im katalytischen Anteil des Enzyms gelegenen Substratbindungsdomäne identisch ist (Henrissat, 1999), enthält sechs konservierte Cysteine, die drei Disulfidbrückenbindungen bilden, und dient der Adsorption des Enzyms an hochmolekulares, unlösliches Substrat (Henrissat & Bairoch, 1993). CBDs scheinen dabei die Enzymkonzentration an der Oberfläche unlöslichen Substrates zu erhöhen sowie eine bessere Positionierung der katalytischen Domäne zu ermöglichen (Linder & Terri, 1997). Dies erhöht spezifisch die Aktivität für hochmolekulares Substrat (Arakane et al., 2003). Der Verlust

einer CBD führt wiederum zur Abnahme dieser Aktivität und zur Freisetzung längerer Oligosaccharidprodukte (Zhou et al., 2002). Bei Verlust der C-terminalen CBD konnten für *B. malayi*-Chitinase keinerlei Veränderung des K_M -Wertes für Di- oder Trisaccharide, aber deutliche Einbußen der katalytischen Aktivität für hochmolekulares Substrat beobachtet werden (Venegas et al., 1996). Über Ähnlichkeiten einiger CBDs mit Zellulosebindungsdomänen ist berichtet worden (Duo-Chuan, 2006). Das Hexacysteinmotiv ist in diversen, der zellulären Adhäsion und Rezeption dienenden Molekülen nachgewiesen worden (Tellam, 1996; Kramer & Mutukrishnan, 1997; Shen & Jacobs-Lorena, 1999). Die enge Verwandtschaft verschiedener Filarien-chitinasen, z.B. aus *O. volvulus*, *B. malayi* und *A. viteae*, ließ sich auch durch Sequenzvergleiche der CBDs dieser Enzyme belegen (Shen & Jacobs-Lorena, 1999). Eine C-terminale Extensionsregion vollendet das Enzym.

Genstruktur der Chitinasegene von A. viteae

A. viteae verfügt über drei bisher bekannte Gensequenzen, die für Chitinasen kodieren: Alle zeigen die beschriebene Multidomänenorganisation, wobei dem Gen für Chitinase II die Kodierungen des Startmethionins und der Serin-Threonin reichen Region fehlen (Tachu, 2006). Die Sequenz der Chitinase I umfasst 13 Exons (Abb. 1-6). Exon A kodiert für die N-terminale Signalsequenz, was auf extrazelluläre Funktion des Enzyms schließen lässt. Die Aminosäuresequenz für das reife, sezernierte Enzym beginnt mit der in Exon B kodierten, in Filarien-chitinasen konservierten Sequenz YVRG (Fuhrman et al., 1992). Die zweite hochkonservierte Sequenz der sich über Exon B bis J erstreckenden katalytischen Domäne wird in Exon E kodiert (FDGFDLWEYP). Zwischen Exon J und M wird für die Serin-Threonin reiche Region kodiert, in Exon M finden sich schließlich Informationen für die Chitinbindungsdomäne mit den beschriebenen 6 Cysteinen. Die Sequenz der Chitinase III ist weitestgehend homolog, einzig die Exons K und L sind in Chitinase III zu einem deutlich größeren Exon Z zusammengefasst (Tachu, 2006). Die Sequenzen von Chitinase I aus *A. viteae* und *B. malayi* Mikrofilarien-chitinase I zeigen weitestgehende Übereinstimmungen (Fuhrman et al., 1992). Insgesamt bestehen zwischen Chitinasen aus *Brugia* spp., *O. volvulus*, *W. bancrofti* und *A. viteae* weitestgehende Sequenzhomologien, die auf eine phylogenetische Verwandtschaft zurückgeführt werden (Tachu, 2006). Abgeleitet aus den geschilderten Strukturmerkmale ist der beschriebene, substratassistierte Reaktionsmechanismus aller GH-18 Chitinasen anzunehmen (Tews et al., 1997; Robertus & Monzingo, 1999).

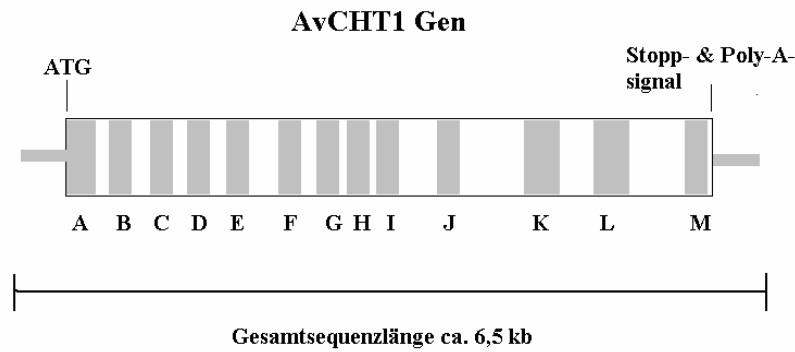


Abbildung 1-6: Exonstruktur des Chitinase I Gens aus *A. viteae* (AvCHT1). Die Exons sind mit Buchstaben A bis M bezeichnet (grau), Introns sind weiß dargestellt. Die Gesamtsequenzlänge beträgt ca. 6500 bp. Details siehe Text. Darstellung nach Tachu, 2006.

Bedeutung von Filarienchitinase

Filarien exprimieren Chitinasen in verschiedenen Entwicklungsstufen, ähnlich wie auch Chitin in bestimmten Entwicklungsstadien von Nematoden nachgewiesen werden konnte (Brydon et al., 1987; Araujo et al., 1993): So wurden bei *A. viteae* und *O. volvulus* Chitinasen im infektiösen Larvenstadium L3 gefunden (Adam et al., 1996, Wu et al., 1996), bei *B. malayi* und *B. pahangi* in Mikrofilarien (Fuhrman et al., 1992), bei *W. bancrofti* in beiden Stadien (Raghavan et al., 1994). Die im glandulären Anteil des Nematodenösophagus gespeicherten Chitinasen von L3 *A. viteae* und *O. volvulus* sollen bei der Übertragung auf den Wirt, bei der Häutung während der postinfektiven Entwicklung sowie bei der Migration des Parasiten im Bindegewebe des Wirtes bedeutsam sein (Wu et al., 1996; Adam et al., 1996). Die Chitinasen der Mikrofilarien aus *B. malayi* wurden z. B. einige Tage nach Beginn der Reifung gefunden, ihre mögliche Funktion beim Umbau der Eischale der Parasiten zum Zeitpunkt der Transmission auf den Vektor soll mit der Infektivität der Filarien korrespondieren (Fuhrman et al., 1992). Es konnte gezeigt werden, dass *Brugia* spp. Mikrofilarien, welche keine Chitinase exprimieren, die Wand des Mitteldarms ihres Vektors nicht durchdringen konnten (Fuhrman, 1995). Eine hypothetische Ursache kann die Bindung von Mikrofilarien durch Lektine innerhalb des Arthropoden sein. Durch Chitinhydrolyse und Absättigung der Lektine mit *N*-Acetylglucosaminmonomeren sollen Filarien diesen Abwehrmechanismus überwinden können (Welburn et al., 1993; Tellam, 1996). Ebenfalls denkbar ist die zur Migration der Filarie im Vektor nötige Lyse der peritrophen Matrix der Arthropoden durch Chitinasen (Langer & Vinetz, 2001).

Filarienchitinasen können in verschiedenen therapeutischen Strategien genutzt werden. Chitinasen oder die für sie kodierende DNA wurden z. B. als immundominante Antigene bei Impfversuchen erkannt (Adam et al., 1996), wobei eine Reduktion parasitierender Nematoden

durch gegen die Hülle von L3 Larven gerichteten Antikörpern beobachtet wurde. Die Immunisierung mit synthetischen Derivaten des aktiven Zentrums von Chitinasen könnte zur Bildung chitinaseinhibierender Antikörper stimulieren und die Infektivität der Parasiten vermindern (Fujii et al., 2004, Tachu, 2006). Nicht zuletzt ist die Herstellung spezifischer, gut synthetisierbarer und charakterisierter Inhibitoren von Filarien-chitinasen zum Ersatz bisheriger Pharmaka vielversprechend.

1.3 Chitinaseinhibitoren

Der Bedarf an Hemmstoffen von Chitinasen ergibt sich einerseits aus der beschriebenen Verbreitung dieser Enzyme, andererseits aus der potentiellen Rolle dieser Hemmstoffe als Chemotherapeutika. Einsatzmöglichkeiten von Chitinaseinhibitoren gegen Parasiten, Pilze oder Insekten sind u.a. anhand des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum* (Shahabuddin et al., 1993), des über die Luft übertragenen Pilzes *Aspergillus fumigatus* (Chet & Inbar, 1994 oder an Larven der Hausfliege, *Musca domestica*, aufgezeigt worden (Sakuda et al., 1987). Auf die mögliche Rolle von Chitinaseinhibitoren bei der Bekämpfung von Filarieninfektionen ist bereits eingegangen worden. Neben therapeutischen oder industriellen Zwecken ist durch Inhibitoren die Aufklärung der katalytischen Mechanismen von Chitinasen möglich, beispielsweise durch Untersuchung von Komplexstrukturen aus Hemmstoff und Enzym (Spindler & Spindler-Barth, 1999).

Zur Inhibition von Chitinasen sind neben bivalenten Kationen wie Hg^{2+} und Ag^{2+} zumeist niedermolekulare Derivate von Chitinasesubstraten befähigt (Spindler & Spindler-Barth, 1999). Der am besten untersuchte Inhibitor dieser Klasse ist das Pseudotrisaccharid Allosamidin, ein Metabolit im Stoffwechsel der Streptomyzeten (Sakuda et al., 1986), welcher als Signalmolekül für die Chitinaseproduktion und -freisetzung aus *Streptomyces* spp. wirken kann (Suzuki et al., 2006). Allosamidin besteht aus zwei *N*-Acetylallosaminzuckern, verbunden mit einer als Allosamizolin bezeichneten Gruppe, die ein Dimethylamin-tragendes Oxazolin beinhaltet (Abb. 1-7). Allosamidin hemmt verschiedene chitinolytische Enzyme im nanomolaren bis millimolaren Bereich (Koga et al., 1989; Spindler & Spindler-Barth, 1999), darunter alle Chitinasen der GH-18-Familie. Die Hemmung letzterer erfolgt durch Nachahmung des beschriebenen Oxazolinium-Reaktionsintermediates durch den nicht hydrolysierbaren Allosamizolin-Anteil des Allosamidins (Sakuda et al., 1986, 1987, Tews et al., 1997, Vaaje-Kolstad et al., 2004). Problematisch sind die nicht vorhandene Spezifität sowie eine für Synthesen ungünstige

Struktur, die zudem zu begrenzter Stabilität des Hemmstoffes führt (Blattner et al., 1996, Spindler & Spindler-Barth, 1999). Mittlerweile ist Allosamidin nicht mehr käuflich zu erwerben.

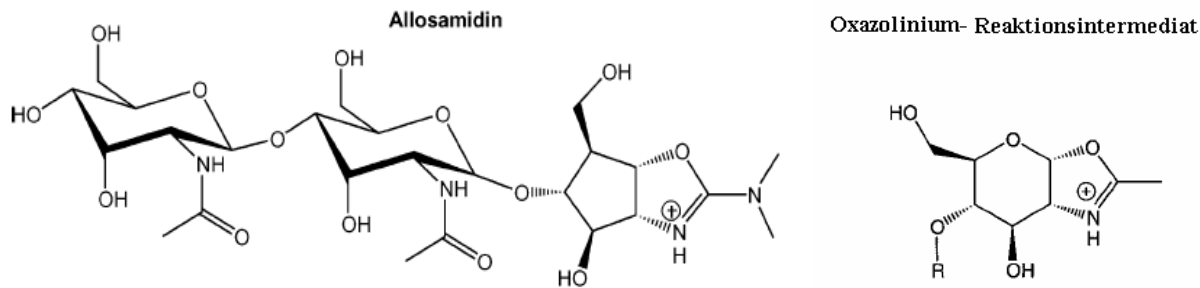


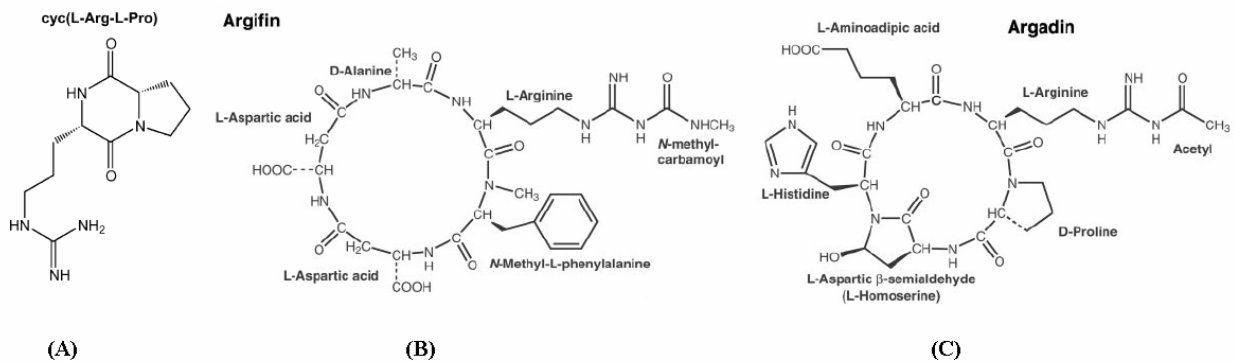
Abbildung 1-7: Chemische Strukturen des Allosamidins und des Oxazolinium-Reaktionsintermediats. Der Allosamidinanteil des Allosamidins bzw. die gezeigte Oxazolinstruktur des Intermediates liegen jeweils in der -1 Bindungstasche der Chitinasen. Die *N*-Acetylglucosaminkette des Chitins ist als Rest (R) gekennzeichnet. Modifiziert nach Houston et al., 2002b, 2004.

Der Einsatz anderer Kohlenhydrate als Substratanaloga ist durch die teils aufwendige Synthese sowie die Größe dieser Moleküle, die zu eingeschränkter Membranpermeabilität führt, begrenzt. Zudem ist teilweise eine Hydrolyse solcher hemmenden Substratderivate möglich, wie z. B. für das Diacetylbiosid-Derivat HM508 gezeigt wurde (Berecibar et al., 1999; Vaaje-Kolstad et al., 2003).

Neben Chitinaseinhibitoren auf Kohlenhydratbasis haben sich peptidische Hemmstoffe etabliert, deren Vorteil u. a. die üblicherweise einfachere Synthese ist. Zu diesen Peptidinhibitoren zählen zyklische Dipeptide. Izumida et al. konnten 1996 das zyklische Dipeptid *cyclo*-(L-Arg-D-Pro), kurz Cl-4, aus dem marinen Bakterium *Pseudomonas* IZ208 als Chitinaseinhibitor identifizieren. *In vivo* konnte Cl-4 Teilungs- bzw. Entwicklungsvorgängen von *Saccharomyces cerevisiae* bzw. *Candida albicans* hemmen (Izumida et al., 1996b). Die Hemmung von Chitinase B aus *S. marcescens* durch Cl-4 erwies sich im Vergleich mit Allosamidin jedoch als schwach ($K_i = 0,65$ mM), Substitutionen der Argininseitenkette konnten jedoch Verbesserungen der Hemmpotenz herbeiführen (Houston et al., 2002b, 2004). Nachteil dieser Inhibitoren bleibt die mangelnde Spezifität gegenüber ausgewählten Chitinasen.

Daneben sind weitere zyklische Peptidinhibitoren von Chitinasen bekannt, so das aus *Clonostachys* sp. isolierte Argadin oder das von *Gliocladium* sp. gebildete Argifin. Für beide zyklischen Peptide konnte die Hemmung der Chitinase aus der Fliege *Lucilia cuprina* mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich nachgewiesen werden (Arai et al., 2000, Shiomi et al., 2000). Daneben erfolgt auch eine Hemmung von humaner Chitotriosidase oder Chitinase aus

A. fumigatus (Rao et al., 2005). Die Wirkung *in vivo* konnten Arai et al. 2000 durch Injektion des Inhibitors in Larven von *Periplaneta americana* und einer sich daraus ergebenden Unterbrechung der Häutung demonstrieren. Nachteilig ist bei diesen zyklischen Pentapeptiden wiederum die mangelnde Spezifität. Durch Zyklisierung und ungewöhnliche Modifikation der Seitenketten gestaltet sich zudem die Synthese schwierig. Abb. 1-8 zeigt die chemische Struktur der drei vorgestellten zyklischen Peptidinhibitoren.



Abbildungen 1-8: Chemische Strukturen zyklischer Peptidinhibitoren von Chitinasen. (A) Das zyklische Dipeptid Cl-4 (mod. nach Houston et al., 2004). (B) und (C) Die zyklischen Pentapeptide Argifin und Argadin mit Bezeichnung der einzelnen Aminosäuren (mod. nach Houston et al. 2002a).

Weitere Hemmstoffe seien an dieser Stelle nur überblickshaft erwähnt. Psammaplin A, ein bromiertes Tyrosinderivat, hemmt nichtkompetitiv Chitinase B aus *S. marcescens* durch Bindung nahe am aktiven Zentrum (Tabudravu et al., 2002). PUGNAC (2-Acetoamid-2-Deoxy-D-Glucopyranosyl-Amino-Phenylcarbamot) hemmt sowohl pflanzliche als auch Pilzchitinasen und könnte zur Bekämpfung dualer Pathogensysteme wirksam sein (Hodge et al., 1996). Die Isolation eines Chitinasepropeptides aus *Anopheles gambiae* und anschließende *in vitro* und *in vivo* Anwendung konnte eine Hemmung verschiedener Moskitochitinasen zeigen und zur Blockade der Entwicklung parasitierender *Plasmodium* spp. führen (Bhatnagar et al., 2003). Schließlich sind Inhibitoren auf Purinbasis bekannt, die mittels elektronischer Datenauswertung und Modellierung (*virtual screening*) gefunden wurden (Schüttelkopf et al., 2006).

1.4 Molekulare Mimikry, Kreuzreaktivität, Polyspezifität

Die Inhibition von Enzymen, z. B. Chitinasen, beruht auf der Interaktion der Hemmstoffe mit Aminosäureresten innerhalb oder auch außerhalb des aktiven Zentrums bzw. der katalytischen Domäne des Enzyms. Diese Interaktion ist in zahlreichen Fällen den für die Katalyse notwendigen Bindungs- und Reaktionsbeziehungen von Enzym, Substrat und Produkt ähnlich. Auf struktureller Basis wird häufig die Nachahmung z.B. von Substraten durch Hemmstoffe

beobachtet. Solches Nachahmen wird auch als Mimikry, abgeleitet vom griechischen *mímisi* (nachahmen), bezeichnet, und basiert auf dem Vermögen, aufgrund einer bestimmten Körperlichkeit, z.B. der molekularen Struktur, eine Wirkung zu erzielen (Mimese). Die bekannteste Form von natürlicher Mimikry ist die 1862 durch Henry Walter Bates beschriebene Nachahmung eines wehrhaften oder ungenießbaren Tieres durch harmlose Tiere zur Täuschung von Feinden, heute als „Schutzmimikry“ bezeichnet.

1.4.1 Natürliche Molekularnachahmung

Das Prinzip des Nachahmens von Molekülstrukturen wurde in Anlehnung an die oben beschriebene Begrifflichkeit als Molekulare Mimikry bezeichnet und hat in der Natur weite Verbreitung. So haben Orthopoxviren zur Überwindung der zum angeborenen Immunsystem gehörenden Komplementabwehr diverse Strategien entwickelt, beispielsweise die Nachahmung von Komplementkontrollproteinen (CCP) durch virale Oberflächenproteine (Miller et al., 1997; Rosengard et al., 1999). Die in Sequenz und räumlicher Struktur den Wirtsproteinen ähnlichen Moleküle (Henderson et al., 2001) können Viren und virusinfizierte Zellen vor dem Zugriff durch das Komplementsystem schützen (Isaacs et al., 1992). Weitere Beispiele dieser auch als Molekularpiraterie bezeichneten viralen Mimikry finden sich z. B. auch bei Herpes Simplex oder Epstein Barr Viren (Bernet et al., 2003).

Neben Protein-Protein-Mimese ist auch die Nachahmung von Nukleinsäuren durch Proteine detailliert untersucht und beschrieben worden (Nissen et al., 2000; Morris et al., 2007). Ebenso scheint Mimikry von Kohlenhydraten durch Peptide in der Natur vorzukommen. So sind Peptide bekannt, die Galaktosestrukturen in den für die Zell-Zellerkennung von Bakterien und Viren wichtigen Glykosphingolipiden nachahmen (Taki et al., 1997). Bei der Entstehung zahlreicher Autoimmunerkrankungen werden Mimesen als kopathogenetische Ursachen diskutiert, wobei stets die Diskrimination des Immunsystems zwischen eigenen und fremden, aber strukturell ähnlichen Molekülen gestört ist. So führen immundominante Kohlenhydrat- und Peptidepitope auf Oberflächen von β -hämolyisierenden Streptokokken der Serogruppe A zu einer Antikörper- und T-Zellantwort, welche sich nicht nur gegen die Mikroorganismen, sondern auch gegen Autoantigene, u. a. in Gelenken oder in Herzgeweben, richtet. Das klinische Krankheitsbild ist als Rheumatisches Fieber bekannt (Zabriskie, 1982; Cunningham, 2000; Fae et al., 2006). Weitere, häufig infektionsassoziierte Autoimmunerkrankungen sind z.B. das Behçet-Syndrom, Multiple Sklerose, Systemischer Lupus erythematodes oder Colitis ulcerosa, wobei stets die

Kreuzreaktion von Bestandteilen des Immunsystems sowohl gegen Fremdepitope als auch gegen Autoantigene als möglicher Triggerfaktor der Erkrankung diskutiert wird (Libbey et al. 2007; Yuki, 2005; James et al., 2001; Kovvali & Das, 2005).

1.4.2 Kreureaktivität und Polyspezifität

Als Kreuzreaktivität werden durch Schlüsselreste von Epitopen ausgelöste, teilweise auf verschiedenen Bindungsmodi beruhende Reaktionen bezeichnet, wobei Sequenz oder Konformation beider Epitope mitunter stark verschieden sind (Keitel et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass nicht Sequenzen oder zweidimensionale Strukturen, sondern räumliche Formen die Grundlage für die dargestellten Interaktionen sein müssen. Homologien innerhalb einer Antigensequenz führen nicht zwingend zu derselben Immunantwort, wohingegen Strukturen mit absolut unterschiedlichen Sequenzen durch räumliche Übereinstimmung sehr wohl die gleiche Antwort auslösen können (Kovvali & Das, 2005). Insgesamt findet zwar eine Nachahmung statt, sie beruht nur nicht stets auf molekularer Ähnlichkeit, weshalb der Begriff der molekularen Mimikry teilweise durch „Mimikry räumlicher Strukturen“ oder Polyspezifität ersetzt werden sollte. Als Polyspezifität, z.B. von Antikörpern, wird dabei die Fähigkeit bezeichnet, mit nicht homologen Epitopen in verschiedenen Bindungsweisen zu interagieren. Eindrucksvolle Beispiele sind Antikörper, welche gleichzeitig Affinitäten zu DNA, Proteinen und Lipiden zeigen (Ternynck & Avrameas, 1986; Casali & Notkins, 1989).

1.4.3 Anwendung

In der naturwissenschaftlichen Forschung wird die Idee der Nachahmung beim Design optimierter Abkömmlinge natürlicher Verbindungen mit dem Ziel höherer Wirkeffizienz, größerer Selektivität oder einfacherer Synthese genutzt. Dieser Strategie der Modifikation vorhandener Strukturen steht die Herstellung neuer, nicht verwandter Verbindungen gegenüber, wie sie in diversen, noch zu schildernden Displaymethoden verwirklicht wird (Sergeeva et al. 2006). Die Modifikationsstrategie wurde beispielsweise bei der Mimese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie Hyaluronat und Chondroitinsulfaten, durch Chitin verwirklicht, was den Einsatz von Chitin-Nanofasern als zytokompatible Biometika im Bereich des *tissue engineering* erlaubt (Park et al., 2006). Durch Nachahmung des Übergangszustand von Substraten konnten klinisch wirksame Enzyminhibitoren entwickelt werden. So sollen Hemmstoffe der Asparatprotease von *P. falciparum* im Rahmen der Malariabekämpfung wirksam sein (Abdel-Rahman et al., 2004).

Die Mimese von Kohlenhydraten durch Peptide konnte zu peptidischen Nachahmern von Mannosidmotiven der Zelloberfläche von *Mycobacterium tuberculosis* führen, welche als Impfstoffe gegen Tuberkulose eingesetzt werden sollen (Gevorkian et al., 2005). Auch die Wirkung fast aller beschriebenen Chitinaseinhibitoren fußt auf der Kohlenhydratnachahmung (Carbomimetik). Details einiger zur Hemmung führender Interaktionen bleiben zu diskutieren.

1.5 Molekulare Evolution und Displaytechnologien

1.5.1 Molekulare *in-vitro*-Evolution

Die unter einem Konkurrenzdruck stattfindende Auswahl bestimmter Eigenschaften aus einem vielfältigen Pool und die anschließende Vervielfältigung der Träger dieser Eigenschaften wird allgemein als Evolution bezeichnet. Bereits 1858 berichteten Darwin und Wallace von den Mechanismen, sich an geänderte Lebensbedingungen durch Plastizität von Eigenschaften anzupassen; das hervorgehende Konzept des „*survival of the fittest*“ lässt sich 150 Jahre später auf die molekulare Ebene übertragen. Die „Betroffenen“ sind nunmehr Moleküle wie Proteine, DNA oder RNA, allesamt Polymere verschiedener, durch Kombination und Polymerisationsgrad zu mannigfachen Anordnungen fähiger Monomere, z. B. Aminosäuren oder (Desoxy-) Ribonukleotide. Molekulare *in-vitro*-Evolution bezeichnet also jenen Prozess aus aufeinanderfolgender Diversifikation, Selektion und Amplifikation von gesuchten molekularen Eigenschaften, der zu einer Optimierung dieser Eigenschaften führt (Matsuura & Yomo, 2006), wobei teilweise auch *in vivo* gearbeitet wird.

Proteine waren und sind solchen Evolutionsmechanismen unterworfen, wobei eine enorme Zahl verschiedener Moleküle entstand, schätzungsweise 10^{14} . Dies stellt jedoch nur eine kleine Fraktion aller denkbaren Proteine dar (Luisi, 2007). Der „Protein-Sequenz-Raum“ (Matsuura & Yomo, 2006) aller theoretisch möglichen Proteine ist viel größer, als die bisherige Proteinauswahl ihn erscheinen lässt. Die Selektion der existierenden Proteine erfolgte durch molekulare Evolution. Diesen Evolutionsprozess in kurzer Zeit mit bestimmten Selektionszielen nachzuahmen, ist die Absicht von Display-Technologien, die somit das Handwerkszeug für die experimentelle molekulare Evolution darstellen.

1.5.2 Display-Technologien

Als Display wird jener Prozess beschrieben, der ein „Darbieten“ bestimmter Eigenschaften (oftmals strukturellen Charakters), die anschließende Auswahl eines oder mehrerer Träger dieser

Eigenschaften, beispielsweise durch Bindung, und evtl. die Vervielfältigung dieser Träger beinhaltet. Rundenweise durchgeführt erhofft man sich, über diesen Auswahlprozess entweder komplett neue geeignete Moleküle oder verbesserte bekannte molekulare Individuen aufzufinden. Aus der Kenntnis, dass zahlreiche Erkrankungen des Menschen durch Veränderung in der Proteinexpression verursacht oder mit ihnen assoziiert sind, werden sowohl Notwendigkeit als auch therapeutischer Nutzen von Proteindisplay-Technologien abgeleitet. Das Proteinprofil bestimmter erkrankter Zellen kann als Marker, Entscheidungskriterium sowie als Therapiebasis genutzt werden. Durch Displaytechnologien konnten z. B. gegen autoaggressive B-Zellen gerichtete Antikörper für die Therapie des Systemischen Lupus erythematoses (Rothe et al., 2006) oder Marker atherosklerotischer Läsionen (Kelly et al., 2006) gefunden werden. Chitinasen, deren potentiell pestizide, fungizide und insektizide Bedeutung bereits angesprochen wurde, konnten mittels *in-vitro*-Evolution in ihrer Aktivität optimiert werden, wobei die Optimierung der Aminosäuresequenz außerhalb des aktiven Zentrums erfolgte – genau dort, wo rationales *Re-Design* nicht angesetzt hätte (Fan et al., 2007). Rothe et al. stellten 2006 einige aus *in-vitro*-Technologien stammende Biopharmaka tabellarisch dar.

Die Vielzahl vorhandener Displaysysteme zu beschreiben ist in diesem Rahmen unmöglich. Vielmehr soll der ausführlichen Darstellung der in dieser Arbeit angewandten beiden Technologien eine kurze Übersicht vorangestellt werden: Eine häufig anzutreffende Gruppe ist die des Virus- oder Phagendisplay, auf Näheres wird einzugehen sein. Weiterhin existieren mit dem Bakterien-, dem Hefe- und dem Säugerzelldisplay eine Gruppe von *in-vivo*-Technologien, die als Zelloberflächendisplay zusammengefasst werden (Sergeeva et., 2006). Letztlich werden unter dem Begriff *in-vitro*-Technologien jene Displaysysteme aufgeführt, welche durch den Verzicht auf eine zelluläre Komponente eine höhere Diversifität realisieren können sollen (Lipovsek & Pluckthun, 2004), z. B. das Ribosomen- oder das mRNA-Display. Die dadurch mögliche Vergrößerung der Bibliothek führte teilweise zu deutlich höher affinen Bindern (Lancet et al. 1993). Zudem können wirtsabhängige Präselektionen, z. B. durch Toxizität exprimierter Proteine oder Faltungs- und Proteolyseprozesse, vermieden werden (Lamla, 2002). Den genannten „biologischen“ Techniken können chemische Display-Methoden, beispielsweise mittels synthetisierter Peptidbibliotheken auf Membranträgern, gegenüber gestellt werden.

Allen gemein sind (i) die Diversifikation der zu untersuchenden Eigenschaften, z.B. über Herstellung einer Bibliothek – entweder *de novo* ohne jegliche strukturellen Vorgaben oder in

Anlehnung an vorhandene Proteinstrukturen -, sowie (ii) das schrittweise Selektieren bestimmter Eigenschaften durch das Display an sich, oftmals über Bindung an das gewünschte Zielmolekül (Matsuura & Yomo, 2006).

1.5.3 Phagendisplay

Eine Kopplung von Peptiden an Oberflächenproteine von bakterieninfizierenden Viren, die anschließende Selektion bestimmter virusassoziierter Peptide dieser „Bibliothek“ und schließlich die Sequenzierung des zugrunde liegenden, gentechnisch veränderten Genotyps wurde zuerst 1985 durch Georg Smith beschrieben und als Phagen-Display bezeichnet. Die Anwendungsmöglichkeiten und relativ einfache Handhabung dieser Methode führten dazu, dass Phagendisplay-basierte Techniken in den letzten zwei Dekaden eine zentrale Rolle im Studium der Interaktion von Proteinen mit anderen Molekülen einnehmen konnten und immer vielseitiger einsetzbar sind. Auf der Grundlage einer hergestellten DNA-Bibliothek können dargebotene Peptide aus einem Pool von mehreren Milliarden Varianten gegen diverse Zielmoleküle selektiert werden, die direkte Kopplung von Phänotyp und Genotyp ermöglicht durch DNA-Sequenzierung die Analyse der Aminosäuresequenz aufgefundener Peptide (Willats, 2002).

Phagen: Struktur und Lebenszyklus

Phagen sind Viren, welche Bakterien infizieren und sie zur Vermehrung nutzen. Ihre Entdeckung geht auf Twort und d'Herelle 1915 bzw. 1917 zurück.

Die Struktur und der Lebenszyklus von filamentösen Phagen wie M13, fd oder f1 sind gut untersucht. Wildtyp M13 haben eine Länge von 9300 nm und einen Durchmesser von ca. 6 nm. Die zirkuläre einzelsträngige DNA (ssDNA, 6407/8 Nukleotide) bildet, eingeschleitet von einer Röhre aus ca. 2700 Kopien des *major coat* Proteins pVIII, den Rumpf des Virions. Die Länge des Phagen ist dabei von der zu verpackenden DNA abhängig: Bis zu 12000 Nukleotide sollen ohne funktionelle oder strukturelle Defizite verpackt werden können (Marvin, 1998). An den Enden des Stäbchens finden sich jeweils 4-5 Kopien der sogenannten *minor coat* Proteine pIII und pVI bzw. pVII und pIX (Smith & Petrenko, 1997). Insbesondere die Hüllproteine pIII und pVIII sind detailliert beschrieben und oftmals zu Displayzwecken genutzt worden. Neben den Genen für die genannten Hüllproteine werden im Phagen genom Proteine zur Replikation der DNA und für die membranassoziierte Assemblierung des Virions kodiert (Abb. 1-9). Zusätzlich findet sich eine sogenannte intergenische Region, hier befinden sich die u. a. Startpunkte für die

DNA-Strang-Synthese. Diese intergenische Region kann ohne negative Beeinflussung des Phagens vergrößert werden (Burritt et al., 1996), was die Verwendung filamentöser Phagen in der Gentechnik ermöglicht.

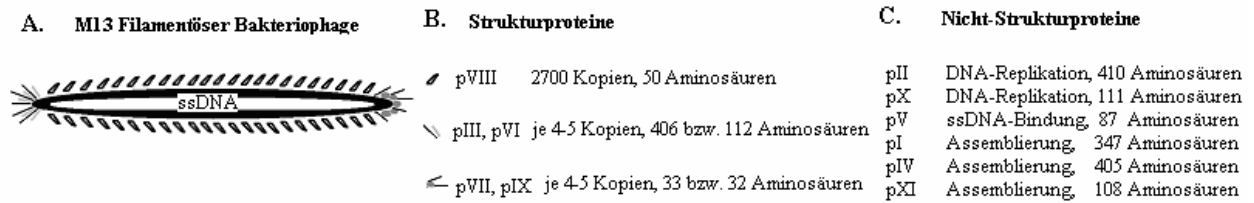


Abbildung 1-9: M13 Bakteriophage und M13 Proteine. (A.) Nicht maßstabsgetreue Schemazeichnung eines M13 Bakteriophagen. pVIII *major coat* Proteine scheiden die zirkuläre Einzelstrang-DNA ein. pIII/pVI bzw. pVII/pIX *minor coat* Proteine besetzen die Enden des Virionen. (B.) Legende zu A.: Strukturproteine von M13. (C.) Alle weiteren, im M13 Genom kodierten Genprodukte, die nicht strukturellen, sondern funktionellen Charakter haben. Abbildung in Anlehnung an Kay & Kehoe, 2005.

Phagen-Partikel adsorbieren mit pIII spezifisch an die Spitzen der F-Pili von F⁺-Bakterien. Für den Infektionsprozess ist der F-Pilus entscheidend, dessen Retraktion die Annäherung des Phagen an die äußere Membran des Bakteriums ermöglicht. Alternativ ist eine Ausstülpung der Membran bei hoher Umgebungskonzentration von Calcium beobachtet worden, die eine Infektion auch von pilusnegativen *E. coli*-Zellen ermöglichte (Barbas et al., 2001). Die Phagen-DNA gelangt über einen noch unklaren Prozess in die Zelle, dort wird der Einzelstrang in die doppelsträngige, sogenannte Replikative-Form DNA (RF-DNA) überführt. Diese wird nun zur Expression der Gene transkribiert. Die gebildeten Strukturproteine inserieren spontan in die innere Bakterienmembran, wo sie auf die zu replizierende ssDNA „warten“. Bei ausreichend hoher Konzentration von pV interagiert dieses mit neu replizierter ssDNA und verhindert die Bildung von DNA-Doppelsträngen. Die Assemblierung des Phagen findet an der inneren Membran, an einer durch die Proteine pI und pIV gebildeten, die innere und äußere Membran durchspannenden Pore statt. Die pV-besetzte, einzelsträngige DNA durchquert diese Pore, alle pV werden „abgestreift“, und die DNA von den Hüllproteinen, zunächst von pVII und pIX, danach von pVIII, und abschließend von pVI und pIII, umhüllt. Dabei sichert pIII die Freisetzung des Virions; Partikel mit mutationsdefekten pIII bilden am Bakterium anhaftende, überlange Polyphagen (Barbas et al., 2001). Die Phagen verlassen die Wirtszelle ohne Lyse (Azzazy & Highsmith, 2002), überlebende Wirte wachsen und teilen sich nun weiter, die Teilungsrate ist allerdings verglichen mit nicht infizierten Bakterien um gut 50% vermindert (Barbas et al., 2001).

Phagen-,Display“

Phagendisplay-Peptidbibliotheken sind eine Sammlung infektiöser Virionen, welche auf ihrer Oberfläche eine oder mehrere Kopien einer einzelnen, zufälligen Oligopeptidsequenz präsentieren. Neben filamentösen Phagen werden auch lytische Spezies wie T4 und T7 (Sidhu, 2001) oder Lambda-Phagen genutzt, oftmals in der Hoffnung, im *E. coli*-Periplasma unlösliche Fusionsproteine durch Lyse des Bakteriums in löslicher Form zu erhalten. Allen gemein ist der Einbau fremder DNA, deren peptidisches Genprodukt zusammen mit einem der Hüllproteine auf der Oberfläche als Fusionsprotein erscheint. Phagen tolerieren diesen Einbau veränderter Hüllproteine bei Erhaltung der Infektiosität, die zu verpackende fremde DNA muss lediglich die beschriebene, virustypische intergenische Region aufweisen (Dotto et al., 1981). Alle Hüllproteine sind verwendbar, wobei vor allem die Modifikation am N-Terminus des *major coat* Proteins pVIII (2700 Kopien/Phage) oder des *minor coat* Proteins pIII (4-5 Kopien/Phage) Anwendung findet. Die Veränderung von pIII bietet gewisse Vorteile: Die niedrige Kopienzahl der eingebauten pIII-Moleküle vermindert chelatbindungsähnliche Aviditätseffekte und die damit verbundene Selektion niedrig affiner Binder. Die Position am Phagenterminus gilt aus Verankerungsgründen als günstig, weil so Scherkräften, wie sie z. B. bei Waschprozessen auftreten, besser widerstanden werden kann (Burritt et al., 1996). Die Präsentation von Peptiden auf pVIII führt zu einem stark gehäuften Auftreten des Fusionsmoleküls, da schätzungsweise 10 % der pVIII Proteine als Fusionsproteine präsentiert werden (~250). Der sich ergebende Aviditätseffekt ist jedoch zur Identifizierung schwach affiner Binder nützlich. Auf pVIII können durch noch unklare Ursachen nur kurze, maximal 12 Aminosäuren lange Peptide präsentiert werden (Barbas, 2001). Größere Sequenzabschnitte erfordern die Koinfektion mit einem Helferphagen (Burritt et al., 1996).

Neben Phagenvektoren mit eigenständiger Infektivität werden heute oftmals Phagemide genutzt. Letztere sind Vektoren, die auf Koinfektion mit Helferphagen angewiesen sind. Die verschiedenen genutzten Displaysysteme sind in Abb. 1-10 dargestellt, für ausführlichere Informationen sei auf die Literaturstellen verwiesen (z. B. Review Kay & Keheo, 2005.)

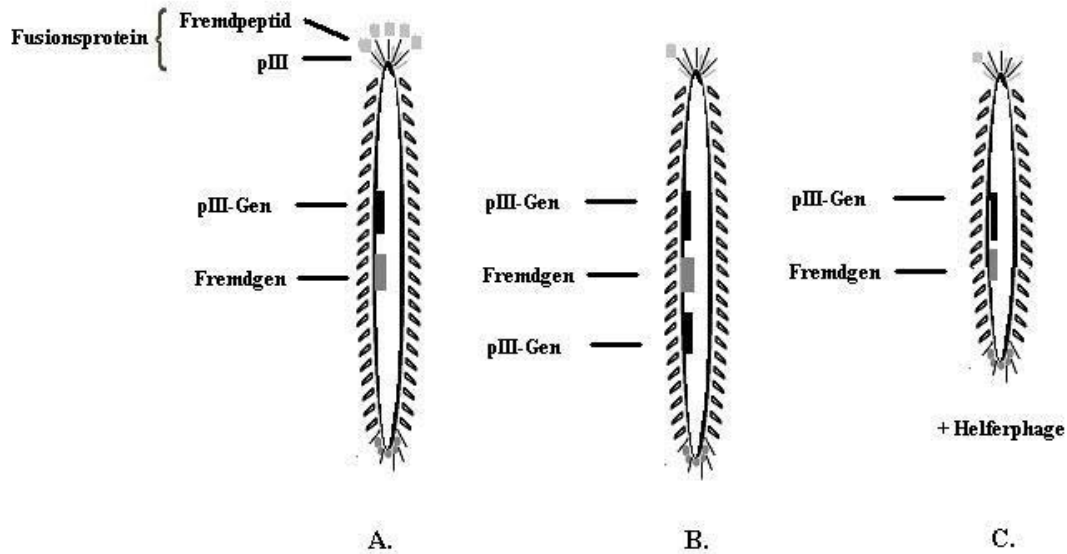


Abbildung 1-10: pIII - Phagendisplay-Systeme. (A.) Phagensystem. Das Phagenom enthält nur eine Kopie des pIII-Gens (schwarz), das fremde Genmaterial für das zu präsentierende Peptid (grau) ist mit dem für pIII fusioniert („one-gene-system“). Jedes pIII wird als identisches Fusionsprotein auf der Oberfläche dargeboten. (B.) Hybridsystem. Das Phagenom enthält zwei Kopien von pIII, eine mit und eine ohne Fusionspartner („two-gene-system“). Durch entsprechende Gestaltung der jeweiligen Promoter wird das Wildtyp-pIII häufiger exprimiert. (C.) Phagemidsystem. Der virale Partikel trägt nicht das gesamte Phagenom, sondern den kleineren Phagemid. Durch Koinfektion mit Helferphagen kommt es zur Expression der Phagemid-DNA und damit der pIII-Fusionsbibliothek. Abbildung in Anlehnung an Kay & Kehoe, 2005.

Was sind nun die Vorteile des Phagen-Peptiddisplays gegenüber anderen Displaytechnologien? Zunächst können Bibliotheken mit großer Diversifität gescreent werden. Die Grundlage für die Erzeugung einer solchen Bibliothek ist die Herstellung von diversifizierten DNA-Bibliotheken, beispielsweise durch Kunkel-Mutagenese, *Error-prone-PCR* oder DNA-Shuffling (Stemmer, 1994; Kay & Kehoy, 2005). Die dabei entstehende Phagen-Peptidbibliothek kann z. B. für ein aus 5 Aminosäuren bestehendes Peptid bei Verwendung aller 20 natürlichen Aminosäuren 20^5 bzw. $3,2 \times 10^6$ verschiedene Sequenzen aufweisen; die Anwendung ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* möglich. Durch Größe und Stabilität der Virionen ist eine langjährige Lagerung auch hochtitriger Bibliotheken (bis zu 10^{14} /ml) bei 4°C möglich. Nach Selektion einzelner Phagen aus der Bibliothek, anschließender Reinfektion von *E. coli* mit diesen Phagen und nachfolgender Amplifikation der Virionen ist eine Sequenzierung der DNA, welche dem präsentierten Peptid zugrunde liegt, möglich. Aus der Nukleotidsequenz kann leicht die Aminosäuresequenz ermittelt werden (Burrill et al., 1996). Zuletzt ist das Phagendisplay eine einfache, günstige, schnell und ohne speziellen technischen Aufwand zu installierende Technik.

Der grundsätzliche Ablauf aller Phagendisplay-Methoden ist wie folgt: Bei der ersten sog. *Panning*-Runde werden die Bibliotheksphagen mit einem Zielmolekül inkubiert, dabei kommt es

zur verschieden stark ausgeprägten Bindung von Phagen an dieses immobilisierte *Target*. Anschließend werden ungebundene Phagen abgewaschen, wobei die Stringenz des Waschens (Waschzeit, Konzentration des Waschmediums) entscheidend ist für die Auswahl entweder zahlreicher, oftmals schwächerer oder weniger, evtl. stärkerer Binder. Die dann noch gebundenen Phagen werden schließlich eluiert, z. B. unspezifisch mittels pH-Verschiebungen. Eluierte Phagen können nun nach Reinfektion von *E. coli*-Bakterien amplifiziert werden. Das amplifizierte Eluat kann jetzt weiteren *Panning*-Runde zugeführt werden, wobei nach 3 – 5 Runden eine überschaubare Anzahl von Klonen selektiert und angereichert worden sein sollte. Diese können nun z. B. mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) in ihrer Affinität zum Zielmolekül quantitativ charakterisiert werden. Eine Sequenzierung von aus Phagen stammender DNA führt schließlich zur Aminosäuresequenz der besten Binder.

Anwendungsmöglichkeiten

Phagendisplay-Technologien von Peptiden wurden seit der ersten Beschreibung als leistungsfähiges Werkzeug beim Epitop-Mapping für Antikörper (Hoess et al., 1994) bzw. der Selektion von Mimetopen (Pincus et al., 1998; Böttger et al., 1999) begriffen. Das Screening nach peptidischen Inhibitoren (Oldenburg et al., 1992; Nakamura et al., 2005; Sanschagrin & Levesque, 2005), wie es auch in dieser Arbeit Anwendung findet, vermag stabile, spezifische, einfach zu synthetisierende Hemmstoffe hervorzubringen, und liefert damit sowohl Informationen über zugrunde liegende Interaktionsmechanismen als auch Vorlagen für neue therapeutische Pharmaka. Auch in der Nanotechnologie (Nam et al., 2006) oder zum Zweck des *tissue engineering*s, z. B. durch Auffinden Kollagen-ähnlicher Moleküle für künstliche Knochenstrukturen (Merzlyak & Lee 2006), konnte Phagen-Peptiddisplay eingesetzt werden. Schließlich finden Phagen-basierte Displaytechnologien Anwendung in der Infektionskontrolle, beispielsweise in Biosensoren (Nanduri et al., 2007a, 2007b). Daneben wird die antimikrobielle Therapie von antibiotikaresistenten Keimen durch Phagen diskutiert, beispielsweise über Phagentherapie (Biswas et al., 2002) oder durch Unterbindung der Adhäsion von Bakterien an Oberflächen (z. B. der extrazellulären Matrix) mittels Phagen (Jacobsson & Frykberg, 1996).

1.5.4 Peptid-Arrays

Die genannten biologischen Display-Methoden für Peptide, z. B. Phagendisplay, Ribosomendisplay oder Zelloberflächendisplay-Techniken, sind prädestiniert für Screenings von Zufallsbibliotheken, d.h. aller möglichen Aminosäuresequenzen einer definierten Peptidlänge

oder auch verschieden langer Peptide (Matsuura & Yomo, 2006). Alternativ dazu sind Verfahren auf Basis chemisch hergestellter Bibliotheken etabliert, bei denen nur einzelne Positionen einer Aminosäuresequenz gleichzeitig oder nacheinander verändert werden (Smith & Petrenko, 1997). Ebenso können in komplexen Substitutionsanalysen schrittweise alle einzelnen Aminosäurepositionen ausgetauscht werden.

Hierfür gilt z. B. das auf SPOT-Synthese (Frank, 2002) basierende Screening von Peptidbibliotheken als robuste, verlässliche, einfache und im Vergleich zur Festphasensynthese einzelner Peptide preiswerte Methode, um Protein-Protein-Interaktionen oder ähnliche molekulare Erkennungen zu studieren (Reimer et al., 2002; Frank, 2002; Hilpert et al., 2007). Dabei erfolgt eine hochparallele Peptidsynthese zahlreicher verschiedener Peptide auf Trägermaterialien, z. B. Zellulose. Die Peptide werden ausgehend vom C-Terminus, beginnend mit β -Alanin, unter Nutzung der Fmoc-Chemie synthetisiert. Die Verwendung von β -Alanin ermöglicht eine spätere hydrolytische Ablösung der Peptide von der Trägermembran (Hilpert et al., 2007). Zudem ist die Verwendung auch nicht kodierter Aminosäuren oder von Stereoisomeren kodierter Aminosäuren möglich (Hilpert et al., 2000, 2007). Die unterschiedlichen Möglichkeiten von Zufalls- bzw. Substitutionsbibliotheken werden bei folgenden Überlegungen deutlich: Bei völlig variabler Anordnung aller 20 natürlichen Aminosäuren in einem 12er-Peptid, wie z. B. beim Phagendisplay, kann es zu 20^{12} , also ca. 4×10^{15} verschiedenen Peptiden, die präsentiert und gescreent werden, kommen. Die aufeinanderfolgende Variation immer nur eines Elementes, beispielsweise bei einer komplexen Substitution des bekannten Peptides gleicher Länge, führt lediglich zu $12 \times 20 - 11$, also 229 verschiedenen Peptiden. Die Anwendungsmöglichkeiten chemischer Bibliotheken reichen von einfachen Bindungsuntersuchungen bis hin zu *Array*-Analysen von abgespaltenen, gelösten Peptide, z. B. als Enzyminhibitoren (Frank, 2002).

So können mittels synthetischer Peptidbibliotheken auf der Basis von SPOT-Synthese z. B. peptidische Inhibitoren, welche mittels Phagendisplay aufgefunden wurden, charakterisiert und weiterentwickelt werden. Dabei sind entweder direkte Screeninguntersuchungen, z. B. nach Bindern eines Zielmoleküles, aber auch Versuche mit abgelösten Peptiden möglich. Letzteres ermöglicht Studien zur Enzymhemmung. Die Auswertung solcher Substitutionsanalysen von Bindern oder Inhibitoren erlaubt Aussagen zur Rolle einzelner Aminosäuren und ihrer Positionen und kann zum Auffinden von affineren Interaktionspartnern führen (Hilpert et al., 2000).

1.6 Ziele der Arbeit

Die Chitinase eines infektiösen Larvenstadiums der als Modellorganismus für verschiedene Filariosen geeigneten Nagerfilarie *Acanthocheilonema viteae* bietet mehrere mögliche therapeutische Ansätze zur Bekämpfung parasitärer Erkrankungen durch Fadenwürmer. In dieser Arbeit sollten aus molekularen Peptidbibliotheken mittels Phagendisplay spezifische peptidische Inhibitoren dieser Chitinase aufgefunden und anschließend charakterisiert und optimiert werden.

Für erste Versuche und zur eigenständigen Synthese von enzymatisch aktiver Chitinase wurden Enzym und für Chitinase aus *A. viteae* kodierende DNA durch Prof. Richard Lucius (Institut für Parasitologie, HU Berlin) zur Verfügung gestellt. Es sollte ein um die Chitinbindungsdomäne verkürztes, enzymatisch aktives Chitinasefragment mittels rekombinanter Expression in *E. coli* gewonnen und aufgereinigt werden. Anschließend sollten Informationen zu den wichtigsten kinetischen Kenngrößen dieses Chitinasefragmentes mit verschiedenen Substraten unter variablen Milieubedingungen gewonnen werden.

An Chitinase bindende Peptide sollten nun mittels Phagendisplay aus randomisierten, molekularen Bibliotheken selektiert und die zugrunde liegende DNA sequenziert werden. Aufgefundene Binder sollten synthetisiert und auf mögliche Hemmung von Chitinase untersucht werden. Anschließend sollten wirksame inhibitorische Peptide und ihre Interaktion mit Chitinase charakterisiert und, wenn möglich, in ihrer inhibitorischen Potenz und Stabilität optimiert werden. Dazu sollten verschiedene Substitutionsanalysen, u. a. mittels Bindungs- und Aktivitätsstudien von auf Zellulosemembranen synthetisierten Peptiden, genutzt werden. Spezifitätsuntersuchungen unter Einbeziehung von Chitinasen aus verschiedenen Familien von Enzymen und Wirtsorganismen sollten die Eignung der gefundenen Inhibitoren, auch im Vergleich mit bekannten Hemmstoffen von Chitinasen, belegen.

Schließlich sollten strukturelle Mechanismen der Hemmung von *Acanthocheilonema viteae* Chitinase durch gefundene Peptide diskutiert und mit bekannten Mechanismen spezifischer und unspezifischer Inhibitoren für diese und andere Chitinasen verglichen werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid/ Bisacrylamidstammlösung 29:1	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Blocking Buffer 10x	Sigma, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau R 250	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Desoxyribonukleotide	New England Biolabs, Ipswich, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	MallinkrodtBaker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glyzerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Oxoid, Cambridge, UK
HRP-Substrate	Seramun, Dolgenbrodt, Deutschland
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lysozym	Sigma, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat	Sigma, St. Louis, USA
N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin (Tricin)	Serva, Heidelberg, Deutschland
N,N-Dimethylformamide (DMF)	Merck, Darmstadt, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Temed)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Polyethylenglycol 8000	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tetracyclin	Sigma, St. Louis, USA
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypton	Oxoid, Cambridge, UK
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Medien

Name	Zusammensetzung
Luria-Bertani-Medium (LB)	1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 171 mM NaCl; pH 7,5
LB-Agar	1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 171 mM NaCl; 1,5 % Agar; pH 7,5
LB-Agarose-TOP	1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 86 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O; 0,8 % Agarose; pH 7,5
SOC-Medium	2 % Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glukose
2xTY-Medium	1,6 % Trypton; 1,0 % Hefeextrakt; 85,5 mM NaCl; pH 7,5

2.1.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Aufbewahrungslösung	7 % Essigsäure; 2 % Glycerol
Bindepuffer PB (QIAprep [®] Miniprep Kit)	4 M GnHCl; 50% Isopropanol; Essigsäure (pH 5,0)
Bromphenolblau-Lösung	2 % Bromphenolblau; 60 % Glycerol; 0,2 M EDTA
Coomassie-Färbelösung	10 % Essigsäure; 40 % Ethanol; 0,25 % Coomassie Brillant Blau R250
6 x DNA- Auftragspuffer	30 % Glycerol; 0,25 % Bromphenolblau; 50 mM Na ₂ EDTA; pH 8,0
E-Blotpuffer	25 mM Tris; 200 mM Glycin; 20% Ethanol
Elutionspuffer EB (QIAprep [®] Miniprep Kit)	10 mM Tris/HCl (pH 8.5)
Entfärbelösung	10 % Essigsäure; 40 % Ethanol
IPTG/Xgal-Mix	0,25 g IPTG; 0,2 g Xgal in 5 ml DMF
Laemmli-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,3); 250 mM Glycin ; 0,1 % SDS
Lysispuffer P2 (QIAprep [®] Miniprep Kit)	200 mM NaOH; 1,0 % (w/v) SDS

Natrium-Phosphat-Puffer	0,1M NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O; 0,1M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
Neutralisationspuffer N1 (QIAprep [®] Miniprep Kit)	3 M Kaliumacetat/ Essigsäure pH 5,5
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 12 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 1,2 mM KH ₂ PO ₄
1 x PBST	PBS; 0,1 % Tween 20
PEG/NaCl	20 % Polyethylenglycol-8000; 2,5 M NaCl
Periplasmapuffer	500 mM Saccharose; 100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM Na ₂ EDTA
5 x Probenpuffer für SDS-PAGE	250 mM Tris/Cl (pH 8,0); 12,5 % β-Mercaptoethanol; 7,5 % SDS; 0,25 % Bromphenolblau; 25 % Glycerol
Puffer A	20 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4); 300 mM NaCl
Puffer B	20 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4); 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol
Resuspensionspuffer P1 (QIAprep [®] Miniprep Kit)	50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 10 µg/ml RNase A
5 x TBE	450 mM Tris-HCl (pH 8,0); 450 mM Borsäure; 10 mM EDTA
1 x TBS-Puffer	50 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,5
1 x T-TBS-Puffer	1 x TBS-Puffer mit 0,1 % Tween 20
Waschpuffer PE (QIAprep [®] Miniprep Kit)	800 mM NaCl; 100 mM Natriumacetat/Essigsäure

2.1.4 Bakterienstämme

Stamm	Herkunft
<i>E. coli</i> ER2738	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>E. coli</i> Origami B (DE3)	Novagen, Merck, Whitehouse Station, USA
<i>E. coli</i> BL21	Stratagen, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> T7 Express I ⁺	New England Biolabs, Ipswich, USA

2.1.5 Phagen

Bezeichnung	Charakterisierung	Herkunft
Ph.D.-C7C	disulfidzyklisierte Heptapeptid M13KE Phagendisplay-Bibliothek	New England Biolabs, Ipswich, USA
Ph.D.-7	lineare Heptapeptid M13KE Phagendisplay- Bibliothek	New England Biolabs, Ipswich, USA
M13K07	Helferphagen	New England Biolabs, Ipswich, USA

2.1.6 Enzyme

Bezeichnung	Charakterisierung	Herkunft
AvCHT1	<i>Acanthocheilonema viteae</i> Chitinase I Fragment	diese Arbeit
Benzonase	Endonuklease	Merck, Darmstadt, Dtschl.
BmCHT1	<i>Brugia malayi</i> Chitinase I	New England Biolabs, USA
CeCHT	<i>Canavalia ensiformis</i> Chitinase	Inst. für Biochemie, Charité
<i>Nco</i> I	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs, USA
OvCHT1	<i>Onchocerca volvulus</i> Chitinase I	New England Biolabs, USA
PfCHT1	<i>Plasmodium falciparum</i> Chitinase I	New England Biolabs, USA
<i>Pfu</i> Turbo	<i>Pyrococcus furiosus</i> DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
SmCHTA	<i>Serratia marcescens</i> Chitinase A	Inst. für Biochemie, Charité
SmCHTB	<i>Serratia marcescens</i> Chitinase B	Inst. für Biochemie, Charité
SmCHTC	<i>Serratia marcescens</i> Chitinase C	Inst. für Biochemie, Charité
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase	InViTek, Berlin, Dtschl.
<i>Xho</i> I	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs, USA

Die Lagerung der Enzyme erfolgte aliquotiert bei -20°C bzw. -70°C .

2.1.7 Substrate

Bezeichnung	Charakterisierung	Herkunft
4-Methylumbelliferyl- β -D-N,N',N''-triacetylchitotriosid	Chitinasesubstrat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

4-Methylumbellifery- β -D-N,N'-diacetylchitobiosid	Chitinasesubstrat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
CM-Chitin RBV	Chitinasesubstrat	Loewe, Sauerlach, Deutschland
TMB-prec	Peroxidasesubstrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TMB-fast	Peroxidasesubstrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.8 Peptide

Die Festphasensynthese von Peptiden erfolgte automatisiert (Synthesizer Abimed, Langenfeld) durch Dr. P. Henklein (Inst. für Biochemie, Charité) oder industriell (ThermoScientific Fisher, Ulm). Die verwendeten Peptidindividuen verfügten C-terminal über eine Säureamidgruppe, wurden mittels HPLC gereinigt und massenspektrometrisch auf ihren Reinheitsgrad (>80 %) überprüft. Wenn gegeben, erfolgte eine Zyklisierung über Nacht im basischen Milieu (0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 8,5), wobei 20 % DMSO als Lösungsvermittler eingesetzt wurden. Die Lösung bereits zyklisierter Peptide erfolgte zu 100 % in DMSO bzw. bei membrangebundenen Peptiden wie beschrieben. Die SPOT-Synthese von Peptiden auf Zellulosemembranen erfolgte durch Dr. R. Volkmer (Medizinische Immunologie, Charité).

2.1.9 Antikörper, Kits, Standards, Säulen, Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
2-Log DNA-Leiter	New England Biolabs, Ipswich, USA
α -poly-His-HRP mono-Ab	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
α -fd-Phagen-HRP poly-Ab	Seramun, Heidesee, Deutschland
Biotin Protein Labeling Kit	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Dynabeads M-270	Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen
His-Trap-HP-1-Säule	GE Healthcare, München, Deutschland
QIAprep [®] Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
pET-22b (+)	Novagen, Merck, Whitehouse Station, USA
Rainbow Marker	Amersham, Heidelberg, Deutschland
SeeBlue Plus2 Marker	Invitrogen, Carlsbad, USA
Streptavidin-HRP	BD Bioscience, San José, USA
VivaSpin Device (MWCO 30)	Sartorius, Göttingen, Deutschland

2.1.10 Geräte, Zubehör, Software

Produkt	Hersteller
Dialyseschlauch 12.000 MWCO ZelluTrans	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophorese-Kammern Mighty Small II	Hoefer Scientific, Amstetten, Österreich
ELISA-Reader htII	Anthos, Krefeld, Deutschland
ELISA-Reader SpectraFluor Plus	Tecan, Crailsheim, Deutschland
ELISA Platte MaxiSorb 96-well	Nunc, Roskilde, Dänemark
EndNote 7.0	Thomson, Frankfurt, Deutschland
Feinwaage M2P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filtrationsanlage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenz Spektrometer LS50B	Perkin Elmer, Waltham, USA
Fluoreszenzküvetten 101 QS / 105-251 QS	Hellma , Müllheim, Deutschland
Fotokamera RT1	Kaiser, Buchen, Deutschland
Gradi Frac FPLC	GE Healthcare, München, Deutschland
Küvette Plastibrand PS	Brand, Wertheim, Deutschland
Küvette Uvette 50 - 2000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizblock DriBlock DB3	Techne Barloworld, Staffordshire, UK
Magellan 2 Genios Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Membranfilter 0,2 µM/ 0,45 µM	Renner, Dannstadt, Deutschland
MicroWin 2000 Version 4.35	Microtek, Willich, Deutschland
Multikanalpipetten (8 bzw. 12 Hub, 100 / 200 µl)	Dunn, Asbach, Deutschland
Orbitalschüttler	Stuart Scientific, Staffordshire, UK
pH-Meter pH 320	WTW-Vario, Weilheim, Deutschland
Pipetten (2/10/20/100/200/1000/5000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Pymol 0.99	DeLano Scientific, San Francisco, USA
Quarzmikrotiterplatte QG schwarz	Hellma , Müllheim, Deutschland
Reinstwasser-Anlage Milli-Q A10	Millipore, Billirica, USA
Rotor 5624 (Mikrotiterplatten)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Rotor Sorvall SLC-6000 (>20 ml Kulturen)	ThermoScientific Fisher, Waltham, USA

Rotor Sorvall SS-34 (15 ml Polycarbonatröhren)	ThermoScientific Fisher, Waltham, USA
Rotor 5415 (Eppendorfgefäße)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttelbrutschrank Innova 4230	New Brunswick Science, Edison, USA
Semidry Blotkammer Trans-Blot SD	Bio-Rad, Hercules, USA
Sicherheitswerkbank Microflow II	Microflow-Astec, Andover, UK
Spektralphotometer UV 160A	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Stickstofftank Arpege 70	AirLiquide, Düsseldorf, Deutschland
Thermocycler	Landgraf HLL, Langenhagen, Deutschland
UV-Leuchttisch	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vakuumpumpe Unijet II	UniEquip, München, Deutschland
Vector NTI Suite 10.0	Invitrogen, Carlsbad, USA
Viewer Pro 4.2	Accelrys, Cambridge, UK
Whatman 3 MM Filterpapier	Whatman, Kent, UK
Zellkulturplatte DeepWell Masterblock	Greiner Biochemica, Fracht, Deutschland
Zelluloseacetatfilter 0,2 µM	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Zentrifuge Universal 30 F (Kulturröhren)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotanda 460 R (Mikrotiterplatten)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5415 (Eppendorfgefäße)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhren Polyallomer/Polycarbonat	Beckman, Krefeld, Deutschland

Den Rotoren und Zentrifugen sind die zur Zentrifugation genutzten Gefäße zugeordnet.

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Gewinnung von Plasmid-DNA erfolgte unter Zuhilfenahme kommerzieller Kits (QIAprep[®] Miniprep Kit, Qiagen). Dabei wurden 5 ml einer plasmidhaltigen *E. coli*-Übernachtskultur 10 min bei 5000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 250 µl Resuspensionspuffer mit RNase A resuspendiert und mit 250 µl Lysispuffer unter mehrmaligem Schwenken lysiert. Mit 300 µl Neutralisationspuffer erfolgte die Präzipitation chromosomaler DNA. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand auf ein Anionenaustauscher-Säulchen gegeben und 1 min bei 15000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nun erfolgte die Phenolextraktion und Ribonuklease A Behandlung. Nach Waschung der Säule mit 500 µl Bindepuffer und anschließend mit 750 µl ethanolhaltigem Waschpuffer wurde jeweils 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Um eine Ethanolkontamination des Eluats zu verhindern, erfolgte zuletzt eine Trocknung durch nochmalige Zentrifugation. Nun konnte die Plasmid-DNA durch einminütige Inkubation mit 50 µl Elutionspuffer und anschließende Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm eluiert werden.

2.2.1.2 Restriktionsverdau und –analyse

Zur Analyse von Nukleinsäuren, beispielsweise von Plasmiden, erfolgte eine Restriktionsspaltung mittels Restriktionsendonukleasen. Dazu wurde 10 x Restriktionspuffer mit DNA-Lösung im Verhältnis 1 : 10 versetzt, 1 U Restriktionsendonuklease je µg DNA hinzugefügt und bei einer Temperatur von 37°C für 90 min inkubiert. Die Analyse der zu erwartenden Spaltfragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Auswahl der Restriktionsenzyme erfolgte unter Berücksichtigung der Sequenzarchitektur der eingesetzten Nukleinsäuren. Zur Analyse des Expressionsvektors für *A. viteae* Chitinase, peT22b(+) (Novagen Merck), auf korrekte Positionierung und Vollständigkeit des *Inserts* wurden die Restriktionsenzyme *Nco* I und *Xho* I (New England Biolabs) verwendet.

2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen, zwei Oligonukleotidprimern und Desoxynukleotiden als Polymerasekettenreaktion. Ein 25 µl Reaktionsansatz enthielt dazu eine Mischung aus *Taq* und

Pfu Turbo Polymerase, um die gute Prozessivität der *Taq* mit der Fehlerkorrektur-Aktivität (*Proofreading*) der *Pfu* Turbo Polymerase zu verbinden. Dabei wurden 100 U *Taq* DNA-Polymerase (InViTek) und 5 U *Pfu* Turbo DNA Polymerase (Stratagene) unter der DNA-Bank, die zuvor für 15 min mit UV Licht bestrahlt worden war, gemischt und mit Oligonukleotiden, Primern, Desoxynukleotiden und destilliertem Wasser versetzt. Außerhalb der DNA-Bank wurden 20 – 40 ng Plasmid DNA eingesetzt. Im Thermocycler erfolgten hintereinander ein Denaturierungsschritt für 1 min bei 95°C, die Anlagerung (*Annealing*) der Primer für 1 min bei 51°C und die Strangverlängerung (*Elongation*) durch die Polymerasen für 1 min bei 72°C. Diese drei Schritte wurden 25-30 Mal wiederholt, es folgte ein finaler Elongationsschritt bei 72°C für 10 min. Danach wurde auf 4°C abgekühlt. Bei Benutzung von Thermocyclern ohne Deckelheizung wurde die Probe vor der PCR mit 25 µl Paraffinöl überschichtet, um ein Verdunsten zu verhindern. Für alle PCR-Arbeiten wurde entionisiertes und zweifach autoklaviertes Wasser benutzt.

2.2.1.4 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung von Agarose-Gelen wurde eine dem Trennbereich angepasste Menge Agarose (1,5 % Agarose für DNA-Größen von 500 bis 10000 Basenpaaren) in 400 ml TBE suspendiert, aufgeköcht und mit 40 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Von dieser Stammlösung wurden jeweils benötigte Mengen für das Gießen der Gele abgenommen, erwärmt und in die Gelkammern gegossen. Vor dem Erkalten wurde der Kamm eingeführt. Für die Elektrophorese wurde der Probe 6 x DNA-Auftragspuffer im Verhältnis 1 : 6 zugesetzt. Die Elektrophorese wurde bei konstant 125 V Spannung durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande das untere Ende der Gelkassette erreicht hatte. Als Standard wurde die 2-log-DNA-Leiter (New England Biolabs) mitgeführt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte auf dem UV-Leuchttisch (Biometra).

2.2.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht mit einer Maximalabsorption bei einer Wellenlänge von 257 nm. Die Extinktionsmessung (Spektralphotometer UV-160A, Shimadzu) erfolgte als Spektrum zwischen 200 - 300 nm, der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm wurde als Maß für die Reinheit der Lösung herangezogen werden. Aus der Absorption bei 260 nm wurde, je nach Nukleinsäure, die Konzentration berechnet. Bei einer Schichtdicke der Lösung von 1 cm entspricht eine Absorptionseinheit bei 260 nm für einzelsträngige DNA-

Oligomere einer Konzentration von etwa 33 µg/ml, für RNA etwa 40 µg/ml und für doppelsträngige DNA etwa 50 µg/ml.

2.2.1.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen erfolgten durch das Sequenzierlabor von Dr. Martin Meixner mittels des DNA-Sequenzers ABI Prism 377 (Perkin Elmer Applied Biosystem) unter Verwendung sequenzspezifischer synthetischer Oligonukleotiden nach dem *BigDye-Terminator-Cycle-Sequencing*-Protokoll. Die Analyse der Sequenzen erfolgt mit Hilfe des Programmes Vector NTI Suite 10.0 (Invitrogen).

2.2.2 Gewinnung enzymatisch aktiven Proteins

2.2.2.1 Zellanzucht

Zur Zellanzucht in Flüssigmedium wurden 5 ml LB-(Luria-Bertani) oder 2 x TY-(Trypton)-Flüssigmedium mit einer Spatelspitze gefrorener Stammkultur oder mit einer auf Festmedium gezüchteten Einzelkolonie angeimpft. Das Zellwachstum erfolgte für 2,5 h oder über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C und 220 rpm. Zur Anzucht von Einzelkolonien wurden Zellkulturen nach Transformation kompetenter Zellen oder aus einer Flüssigkultur ausgestrichen und 12 – 20 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das Animpfen von Flüssigkulturen erfolgte mit einer sterilen Platin-Impföse oder einer sterilen Pipettenspitze aus Einzelkolonien. Die Herstellung von LB-Festmedium erfolgte aus LB-Flüssigmedium durch Versetzen mit Agar in einer Endkonzentration von 1,5 % (w/v). Nach Autoklavierung für 10 min bei 121°C wurde das Medium gegebenenfalls mit Zusätzen ergänzt und dann in sterile Petrischalen portioniert.

2.2.2.2 Transformation CaCl₂-kompetenter Zellen

Für die Transformation von CaCl₂-kompetenten Bakterienzellen mit Plasmiden wurden diese zunächst auf Eis aufgetaut und 50 µl dieser Zellen mit 10 – 50 ng Plasmid-DNA gemischt. Nach 10 bzw. 30 min Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C im Wasserbad. Nach 2 min auf Eis wurde die Zellsuspension mit 250 µl 37°C-warmem SOC-Medium gemischt und für 60 min bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Für das Ausplattieren wurden jeweils 20, 50 und 100 µl dieses Ansatzes auf entsprechenden LB-Nährböden eingesetzt und für 12 – 20 h bei 37°C inkubiert.

2.2.2.3 Proteinexpression

Zur Gewinnung periplasmatisch exprimierten, enzymatisch aktiven Proteins wurden transformierte *E. coli*-Klone des Stammes T7Express I⁹ (New England Biolabs) aus einem Glycerolstock auf eine LB-Agarplatte (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht aufgezogen. Die Kultur wurde anschließend mit 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) abgewaschen, diese Lösung wurde in 1 l des gleichen Mediums inokuliert und für 4 h bis zu einer OD_{600 nm} = 0,6 bei 22°C und 180 rpm inkubiert. Nun erfolgte die Abnahme von 1 ml Kultur für die spätere Analyse des nicht induzierten Totallysats. Die Induktion erfolgte mit 0,01 mM IPTG. Nach weiteren 3 h Inkubation bei 22°C und 180 rpm im Schüttelinkubator wurde 1 ml des induzierten Totallysats abgenommen und die verbleibende Zellkultur durch 15 min Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C geerntet. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Präzipitat wurde aufgeschlossen und weiterverwendet.

2.2.2.4 Zellaufschluss und Fraktionierung

Das Zellkulturpräzipitat wurde mit 1/100 des Kulturvolumens eiskaltem Periplasmapuffer aufgenommen und behutsam resuspendiert, die Suspension für 30 min auf Eis gestellt und anschließend erneut für 15 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Zur Trennung der im Überstand vorhandenen löslichen und unlöslichen periplasmatischen Proteinfractionen wurde schließlich nochmals für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Auswertung der Expression erfolgte semiquantitativ mit Hilfe von SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunoblotting.

2.2.2.5 Proteinreinigung

Die Reinigung der periplasmatischen Proteinfraction erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Die exprimierte Chitinase verfügte C-terminal über einen Hexahistidin-*Tag*, welcher mit Nickel-Ionen hochaffine Chelatbindungen eingeht. Dieser Mechanismus sollte bei der Affinitätschromatographie über eine His-Trap-Säule (GE Healthcare, München) genutzt werden. Letztere bestehen aus hochgradig vernetzter Agarose, an die mit Ni²⁺ beladene Nitrilotetraessigsäure (NTA) kovalent gebunden ist.

Zunächst wurde die periplasmatische Proteinfraction über Nacht gegen PBS dialysiert und danach sterilfiltriert (Ausschlussgröße 0,45 µM). Vor dem Aufbringen der Proben wurden alle Schläuche der Chromatografieanlage (Gradi frac FPLC, GE Healthcare) mit 20% Ethanol gespült (Fließgeschwindigkeit 1 ml/min) und die Säule luftblasenfrei in das System eingebaut. Jetzt wurden die einzelnen Schläuche mit je 10 Säulenvolumina der jeweiligen Puffer (Schlauch

A und C - Puffer A; Schlauch B - Puffer B) äquilibriert. Die Probe wurde mit 0,3 ml/min aufgetragen und 20 min mit 0,5 ml/min Puffer A, anschließend weitere 20 min mit 4% Puffer B (20 mM Imidazol) gewaschen. Es erfolgte die zweistufige, lineare Gradientenelution bis 250 mM Imidazol (100% Puffer B) mit 0,5 ml/min über 65 min. Die Fraktionierung erfolgte in 1 ml Schritten, anschließend wurde mit 10 Säulenvolumina 500 mM Imidazol gewaschen. Die Säule wurde nach einer abschließenden Spülung mit Wasser und 20 % Ethanol im letzten Spülmedium gelagert. Die gesammelten Fraktionen wurden über Nacht gegen PBS dialysiert, zusammengeführt und semiquantitativ mittels SDS-PAGE und Westernblot ausgewertet. Nach der Aufkonzentrierung mittels VivaSpin Device (Sartorius) erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung des Enzymstocks, welcher aliquotiert und bei -70°C gelagert wurde.

2.2.3 Proteinanalytik

2.2.3.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung und Analyse von Proteinen mittels SDS-PAGE wurden die Proteinproben zunächst mit 1/5 Probenvolumen des 5 x –SDS-Auftragspuffers gemischt und 5 min auf 95°C erhitzt. 1 ml des zusammengestellten Trenngels (Tab. 2-1) wurde mit 10 μl 10 % (w/v) APS und 5 μl TEMED versetzt und zum Abdichten der Gelkassette verwendet. Das restliche Trenngel wurde mit 50 μl 10 % APS und 10 μl TEMED gemischt und zum Gießen verwendet (ca. 3,5 ml pro Gel). Nach der Polymerisation wurden 5 ml Gellösung mit 50 μl 10 % APS und 20 μl TEMED gemischt und zum Gießen des Sammelgels verwendet. Vor der Polymerisation wurde der Kamm eingeführt. Nun wurde die Gelapparatur mit 1 x Lämmli-Puffer befüllt, der Kamm gezogen, die Taschen gespült und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt mit 20 mA pro Gel bei 180 V Spannung, bis die Bromphenolblau-Bande das untere Ende der Gelkassette erreicht hatte.

Tabelle 2-1: Zusammensetzung des Trenngels

Stammlösung	Endkonzentration von Acrylamid im Trenngel [% (w/v)]						
	8	9	10	12	13	15	17
Acrylamid/ Bisacrylamid	2.7	3	3.3	4.0	4.3	5	5.7
4x Tris-Cl / SDS, pH 8,8	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
H ₂ O	4.8	4.5	4.2	3.5	3.2	2.5	1.8

2.2.3.2 Coomassie-Färbung von Acrylamid-Gelen

Nach Elektrophorese bzw. Westernblotting wurde das Gel mit ca. 30 ml Coomassie-Färbelösung überschichtet und für 30 min schüttelnd gefärbt. Die Färbelösung wurde abgegossen und das Gel

mit eventuell mehrfach zu wechselnder Entfärbelösung bis zum Verblässen des Hintergrundes geschüttelt, schließlich mit Aufbewahrungslösung gespült, ausgewertet und getrocknet.

2.2.3.3 Immunoblotting (*semidry Westernblotting*)

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurde die Westernblot-Analyse verwendet. Dabei wurden die Proteine von einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Millipore) elektrophoretisch überführt und mit einem Antikörper spezifisch nachgewiesen. Hierzu wurden zwei Filterpapiere (Whatman) in E-Blotpuffer getränkt, die PVDF-Membran in vergälltes Ethanol getaucht und 1 min in Wasser geschwenkt, anschließend wurde die Membran zu den Filterpapieren in E-Blotpuffer gelegt. Auf die untere Blot-Elektrode (+) wurden ein Filterpapier, darüber die Membran, das Gel auf die Membran und darüber das zweite Filterpapier gelegt. Nach Verschluss der Blotapparatur mit der oberen Elektrode (-) erfolgte der Transfer für 25 min bei 20 V. Dann wurde die Membran für mindestens eine Stunde in 0,5x Blocking-Reagenz (Sigma) in TBST geschwenkt, dann 3 x 5 min in TBST gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit 10 ml Antikörperlösung in TBST für 1 h sowie die Wiederholung des geschilderten Waschschritts mit TBST. Für Peroxidase-markierte Antikörper wurde die Membran mit 3 ml TMB prec (Seramun) benetzt und bis zu einer ausreichenden Blaufärbung entwickelt. Die Reaktion wurde mit Wasser gestoppt.

2.2.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Peptiden

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch die Messung der Absorption bei 280 nm am Spektralphotometer (UV-160A, Shimadzu). Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Formel $c_{\text{Protein}} \text{ (mol/l)} = \text{OD}_{280 \text{ nm}} \times \text{Lichtweg}^{-1} \times \varepsilon^{-1}_{\text{Protein}}$. Der proteinsequenzabhängige molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{280 \text{ nm}}$ wurde mit dem Programm ProtParam des EXPASY Proteomics Servers (www.expasy.ch) berechnet.

2.2.4 Phagendisplay

Das Phagendisplay von Peptidbibliotheken gegen Chitinase wurde in aufeinanderfolgenden Zyklen, bestehend aus Selektion und Amplifizierung selektierter Phagen, durchgeführt. Es kamen Phagenbanken mit zyklischen oder linearen, randomisierten Heptapeptiden zum Einsatz (Phage Display C7C bzw. 7, New England Biolabs). Die Selektionsrunden erfolgten dabei entweder in der festen Phase, wobei Chitinase immobilisiert an Polystyrolplatten vorlag, oder in der flüssigen Phase mit biotinyliertem *Target*. Bei letzterer Methodik kamen zur Abtrennung gebundener Phagen magnetische Streptavidin-*Beads* (Roche) zum Einsatz. Alle

Amplifizierungsmethoden nutzen *E. coli*-Zellen des Stammes ER2738 (New England Biolabs).

Abb. 2-1 stellt schematisch das gewählte Verfahren dar.

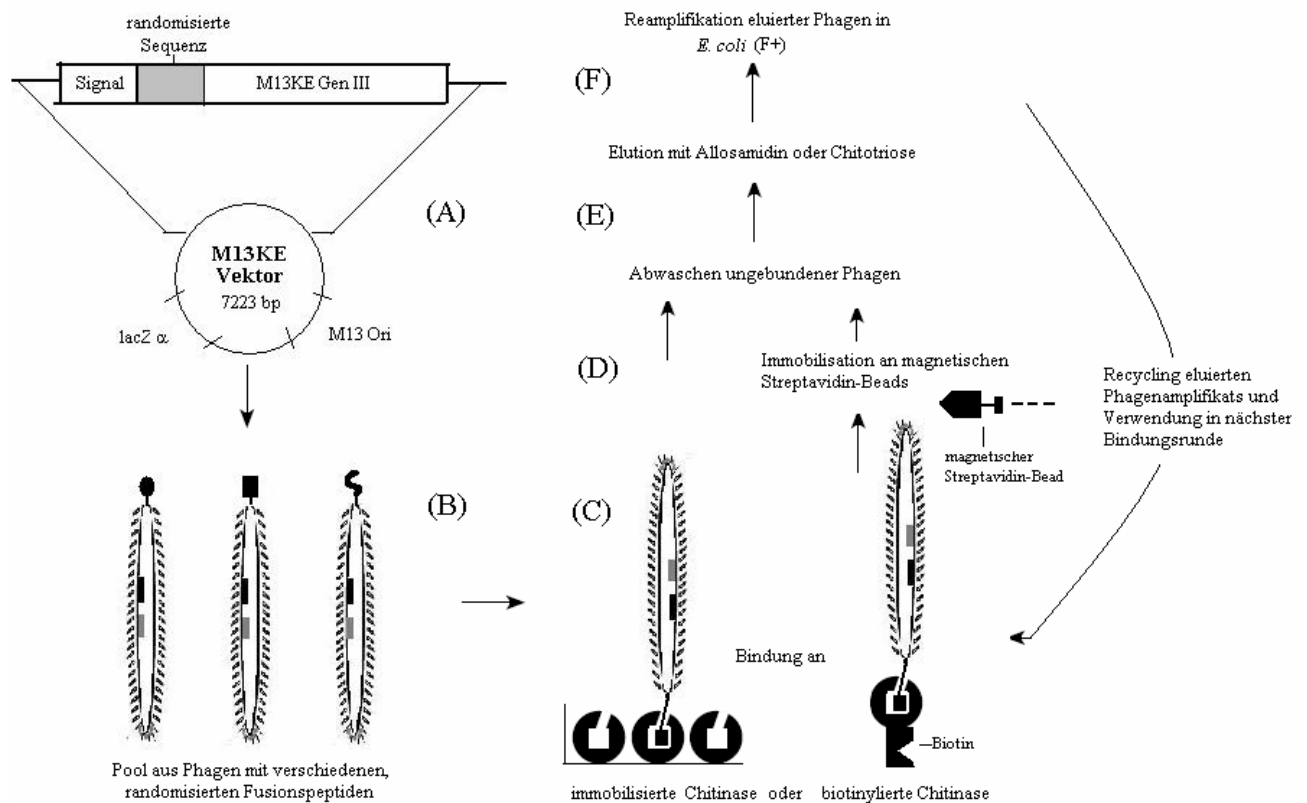


Abbildung 2-1: Phagendisplay verschiedener Peptidbibliotheken gegen Chitinase aus *A. viteae*. Zur Verwendung kam der Phagenvektor M13KE mit polyvalenter Präsentation randomisierter Peptide auf dem Hüllprotein pIII (A). Die jeweiligen Phagenbanken wiesen eine Komplexität aus $2,8 \times 10^9$ verschiedenen, zyklisierten oder linearen Peptiden auf (Ph.D.C7C oder Ph.D.7, New England Biolabs) (B). Die Selektion erfolgte zunächst gegen immobilisierte, später gegen biotinylierte Chitinase (C). Letztere wurde anschließend durch Bindung an magnetische Streptavidin-Beads und Verwendung eines Eppendorfgefäß-Magneten immobilisiert (D). Ungebundene Phagen wurden nun abgewaschen und gebundene Phagen anschließend durch Allosamidin oder Chitotriose eluiert (E). Das Eluat wurde in *E. coli*-Bakterien des Stammes ER2738 reamplifiziert (F), um nun einer weiteren Selektionsrunde zugeführt werden zu können (C-F).

2.2.4.1 Phagenselktion (*Panning*)

2.2.4.1.1 *Panning* mit Target-beschichteten Mikrotiterplatten

Zunächst wurden *wells* einer Polystyrol-Mikrotiterplatte (Maxisorb, Nunc) mit jeweils 100 μ l/*well* Target-Protein (100 – 150 μ g/ml in PBS) über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit PBST erfolgte die Blockierung der unbeschichteten Oberflächen mit 250 μ l/*well* 1 x Blocking-Reagenz (Sigma) für 1 h bei 120 rpm und Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler (Stuart Scientific). Vor dem Zusetzen von Phagen wurden die *wells* dreimal mit PBST gewaschen. Das Prepanning erfolgte durch Inkubation von nur geblockten, nicht beschichteten *wells* mit 100 μ l/*well* Phagen (ca. 2×10^{11} cfu in PBS) für 1 h bei 120 rpm und Raumtemperatur. Die ungebundenen Phagen wurden abgenommen und je 100 μ l/*well* Phagenlösung aus dem Prepanning für 2 h bei 120 rpm in beschichteten *wells* inkubiert. Es

folgten zehn Waschungen mit PBST, wobei die ersten zwei Waschschritte über 5 min schüttelnd erfolgten. Gebundene Phagen wurden nun mit jeweils 100 µl/well 0,2 mM Allosamidin (in PBS) oder 2,5 mM Chitotriose (in PBS und 25 % DMSO) über 30 min auf dem Schüttler (120 rpm, Raumtemperatur) eluiert. Die eluierten Phagen wurden für die Reamplifikation bzw. die Titerbestimmung eingesetzt.

2.2.4.1.2 Biotinylierung von Targetprotein

Für die Biotinylierung von Chitinase mittels des Biotin Protein Labeling Kits (Roche) wurden 65 µg *Target*-Protein unter leichtem Schütteln mit 3 µl Biotin-Lösung (2 mg/ml) gemischt und für 2 h bei Raumtemperatur im Rotor inkubiert. Es erfolgte eine Fraktionierung der Lösung mittels Säulenchromatographie (G25 Sephadex Säule, Roche), die Fraktionen wurden im Spektralphotometer (Shimadzu) auf ihre jeweilige Proteinkonzentration überprüft. Schließlich erfolgte ein semiquantitativer Nachweis der Biotinylierung mittels SDS-PAGE und Immunoblotting, letzteres unter Nutzung 1 : 1000 HRP-konjugierten Streptavidins (Roche), welches durch TMB-Prec (Sigma) detektiert wurde. Fraktionen, die im Photometer, im Gel und im Blot als proteinreich und gut biotinyliert identifiziert werden konnten, wurden gepoolt und mittels VivaSpin-Device (Sartorius) bei 3000 rpm in der Zentrifuge auf 100 µl aufkonzentriert. Abschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung im Photometer, die konzentrierte Lösung des biotinylierten Targets wurde aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.2.4.1.3 Pulldown Panning mit Streptavidin Beads M-270

Das Pulldown Panning erfolgte unter Zuhilfenahme von magnetischen M-270 Streptavidin *Beads* (Roche). Zunächst wurden 100 µl (1 mg) der *Beads* mit je 1 ml PBS 3 x gewaschen und danach mit je 1 ml 1 x Blocking-Reagenz (Sigma) für 2 h im Rotor bei Raumtemperatur inkubiert. Für das Prepanning wurden je 200 µl Phagen (2×10^{11} cfu in 1x Blocking-Reagenz) mit 0,5 mg geblockten *Beads* für 1 h bei Raumtemperatur im Rotor inkubiert, die nicht gebundenen Phagen abgenommen und für das Panning verwendet. Dazu wurden je 200 µl dieser Phagen mit 1 µg biotinyliertem *Target*-Protein gemischt und für 90 min bei Raumtemperatur im Rotor inkubiert. Die Lösung aus *Target* und Phagen wurde daraufhin zu je 0,5 mg geblockten *Beads* gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur im Rotor inkubiert. Nach zehnmalem Waschen mit PBST wurden gebundene Phagen mit 200 µl 0,2 mM Allosamidin (PBS) bzw. 2,5 mM Chitotriose (PBS/ 25 % DMSO) für 30 min im Rotor bei Raumtemperatur eluiert. Die eluierten Phagen wurden für die Reamplifikation bzw. die Titerbestimmung eingesetzt.

2.2.4.2 Amplifizierung und Aufreinigung von Phagen

2.2.4.2.1 Reamplifikation eluierter Phagen

Zur Reamplifikation eluierter Phagen wurden zunächst 200 µl dieses Phageneluats in 20 ml einer Bakterienflüssigkultur ER2738 ($OD_{600\text{ nm}} = 0,3$) inokuliert und für 4,5 h bei 150 rpm und 37°C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 10000 rpm und 4°C für 15 min, der Überstand wurde abgenommen und mit 5 ml PEG-NaCl-Lösung versetzt. Die Fällung erfolgte für mindestens 1 h auf Eis bzw. über Nacht bei 4°C. Der Fällungsansatz wurde dann erneut bei 10000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Sediment mit 1 ml PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde filtriert (Ausschlussgröße 0,45 µm) und mit 250 µl PEG-NaCl-Lösung gemischt. Der zweite Fällungsschritt erfolgte für 1 h auf Eis. Nach Zentrifugation (15 min; 10000 rpm; 4°C) wurde der Überstand entfernt und das Sediment mit 200 µl PBS aufgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der Titer der Phagen bestimmt.

2.2.4.2.2 Amplifizierung für Sequenzierung

Für die Sequenzierung von Phagenklonen mussten diese zunächst amplifiziert werden. Dazu wurde je 1 ml LB-Medium mit einer 1:100 verdünnten Übernachtskultur von *E. coli* ER2738 gemischt und mit einem blauen Plaque aus einer Titerplatte mit gut abgrenzbaren Kolonien beimpft. Die Inkubation erfolgte für 4,5 h bei 37°C und 220 rpm schüttelnd. Anschließend wurden die Kulturen 2 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand geteilt und in zwei Eppendorfgefäße überführt. Zur Herstellung von Phagenstocks wurden je 750 µl dieser Amplifikate mit 750 µl Glycerol versetzt, gemischt und bei -70°C eingefroren. Die verbleibenden 250 µl wurden zur Sequenzierung genutzt.

2.2.4.2.3 Amplifizierung von Einzelphagen

Zur Amplifikation von einzelnen Phagenklonen wurde wie folgt vorgegangen: 1) Inokultation von 200 µl Phagenlösung mit einer 20 ml einer 1:100 verdünnten Übernachtskultur *E.coli* ER2738, 2) Inkubation der Kultur für 4,5 h bei 150 rpm schüttelnd, 3) Abzentrifugation des zellulären Anteils der Kultur für 15 min bei 10000 rpm und Aufnahme des Überstandes in PBS und ¼ Volumen PEG-NaCl, 4) nach 1 h Fällung auf Eis nochmaliges Abzentrifugieren und erneute Aufnahme des Sediments in PBS und PEG-NaCl. Nach einem weiteren einstündigen Fällungsschritt wurde nochmals zentrifugiert und das Sediment in PBS aufgenommen. Anschließend wurde der Titer bestimmt, wobei ein Titerzuwachs von ca. 10^5 pfu/ml erwartet wurde.

2.2.4.2.4 Amplifizierung von Phagen im 96-well-Format

Die Amplifikation von Phagen im 96-well-Format erfolgte zur Vervielfältigung zahlreicher Phagenklone als Vorbereitung für Phagen-ELISAs. Dazu wurden pro well 200 µl einer 1:100 verdünnten Übernachtskultur von *E. coli* ER2738 in eine Deepwell-Platte (Greiner) überführt, 50 µl Phagenlösung pro well inokuliert und die Platte für 4,5 h bei 37°C und 250 rpm im Feuchtschüttler inkubiert. Durch 10 min Zentrifugation bei 5000 rpm erfolgte die Sedimentation der Zellen, der Phagenüberstand wurde in eine neue Platte überführt, dort mit ¼ Volumen PEG-NaCl gemischt und mindestens 1 h auf Eis gefällt. Anschließend erfolgte ein weitere Zentrifugationsschritt wie beschrieben, der resultierende Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen. Eine exemplarische Titerbestimmung konnte sich anschließen, erwartet wurde ein Titergewinn von 10⁴ pfu/ml. Zur Lagerung bei -70°C wurden 200 µl Glycerol zugesetzt.

2.2.4.3 Bestimmung des Phagentiters

Die Bestimmung des Titers von Phageneluat oder -reamplifikat erfolgte mittels der Plaque-Methode. Dafür wurde für die jeweilige Phagenlösung mittels LB-Medium eine serielle Verdünnungsreihe durchgeführt, je 10 µl der Verdünnungsstufen 10¹ bis 10⁴ (für Eluat) bzw. 10⁸ bis 10¹² (für Reamplifikat) wurden in 200 µl einer Kultur ER2738 (OD_{600 nm} = 0,3) inokuliert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 200 µl dieser Kulturen wurden mit 3 ml 50°C warmer TOP-Agarose gemischt und auf LB-Agar-Platten (IPTG/Xgal) aufgegossen. Nach Inkubation bei 37°C für 16 h wurden die blauen Plaques ausgezählt und nach der Formel $N \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^2$ der Titer in *plaque forming units* pro ml (pfu/ml) berechnet.

2.2.4.4 Phagen-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Zur Quantifizierung der Bindung selektierter Phagen an Chitinase erfolgte ein Phagen-ELISA. Dazu wurden wells einer Maxisorb-Platte (Nunc) mit 50 µl Chitinase (25 µg/ml) über Nacht beschichtet. Die Chitinaselösung wurde anschließend mit PBST abgewaschen, und sowohl beschichtete als auch unbeschichtete Kontroll-wells wurden für 4 h bei 37°C mit 1 x Blocking (Sigma) geblockt, anschließend wurde 3 x mit PBST gewaschen. 80 µl Einzelphagenamplifikat (6x10¹² pfu/ml) wurden nun für 2 h in beschichteten und unbeschichteten wells schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zehn Waschschrte mit PBST. Nun wurden die wells mit 100 µl HRP-gekoppelten α-fd-Phagen-Antikörpern (Seramun) für 1 h schüttelnd inkubiert, mit PBST gewaschen und zügig mit Peroxidasesubstrat (TMB fast, Sigma) beschickt. Die

Farbentwicklung wurde bei 650 nm Wellenlänge am ELISA-Reader (htII, anthos) verfolgt, die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes Microwin 2000 (Microtek).

2.2.4.5 Sequenzierung von Phagen-DNA

Die Sequenzierung von DNA aus präparierten, phageninfizierten *E. coli*-Kulturen erfolgte wie dargestellt unter Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden nach dem *BigDye-Terminator Cycle-Sequencing*-Protokoll (M.Meixner). Die Oligonukleotide waren sequenzspezifisch für das gIII-Gen des Phagengenoms (5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3', New England Biolabs). Die Analyse der Sequenzen erfolgt mit Hilfe des Programmes Vector NTI Suite 10.0 (Invitrogen).

2.2.5 Kinetische Charakterisierung von *A. viteae* Chitinase

2.2.5.1 Prinzip der Aktivitätsmessung über Fluoreszenzassays

Die initialen Aktivitäten von chitinspaltenden Enzymen mit niedermolekularen Substraten, z. B. Chitotriose- und Chitobiosederivaten, wurden fluorimetrisch über die Freisetzung von Methylumbelliferon aus den jeweiligen Substratmolekülen (z.B. N-N'-N''-Trimethyl-Umbelliferyl-Chitotriose, Sigma) bestimmt. Die Messungen erfolgten im Fluoreszenzspektrometer (LSB50B, Perkin Elmer) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm, einer Emissionswellenlänge von 450 nm und einer Bandbreite von 10 nm über verschiedene Zeiten, wobei das mittels des Programms FL Lab (Perkin Elmer) errechnete Verhältnis $\Delta\text{RFU} \times \text{min}^{-1}$ (Relative Fluorimetrische Einheiten pro Minute) als Maß für die enzymatische Aktivität herangezogen wurde. Beim Einsatz von in DMSO gelösten Inhibitorpeptiden wurde zur Bestimmung der Aktivität ohne Inhibitor DMSO in gleichen Anteilen eingesetzt. Die Messungen erfolgten als Mehrfachwerte bei konstanten Temperatur- und Pufferbedingungen, die Puffer wurden zuvor durch einen Zelluloseacetatfilter (Porenvolumen 0,2 μM) sterilfiltriert und entlüftet (Filter und Filtrationsanlage: Sartorius). Für alle Messungen konnte eine lineare Zunahme an Fluoreszenzprodukt aufgezeichnet werden.

2.2.5.2 Bestimmung der spezifischen enzymatischen Aktivität

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität von Chitinase erfolgte zunächst die Messung relativer Fluoreszenz bezogen auf die Methylumbelliferonkonzentration. Nachfolgend wurde die Chitinaseaktivität bei Substratkonzentrationen $>5 \times K_M$ bestimmt. Als spezifische Aktivität wurde die zur vollständigen Hydrolyse von 1 μM UMB-Chitotriose pro Minute benötigte Enzymmenge bei 37 °C und pH 7,25 definiert.

2.2.5.3 Bestimmung des K_M -Wertes

Die Bestimmung des K_M -Wertes für das Substrat UMB-Chitotriose mit N-terminalem Chitinase I Fragment aus *A. viteae* erfolgte in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,25) bei Substratkonzentrationen zwischen 1 μ M und 50 μ M. Dazu wurden 0,0375 μ g/ml Chitinase eingesetzt. Die Messung erfolgte wie oben beschrieben über 3 min. Der K_M -Wert wurde anschließend mit dem Programm OriginPro 7.0E nach der Formel $v = V_{\max} \times S \times (K_M + S)^{-1}$ bestimmt.

2.2.5.4 Milieuabhängige Aktivitätsbestimmungen

Die Aktivität von Chitinase sollte bei variablen pH-Werten, Temperaturen und Ionenkonzentrationen untersucht werden. Für die pH-abhängigen Messungen wurden dazu Puffer in den pH-Bereichen 5,0 - 6,5 (0,1 M McIlvain-Puffer), 6,5 - 8,1 (0,1 M Natriumphosphat-Puffer) sowie 8,1 - 8,9 (0,05 M Borat-Puffer) eingesetzt. Zum Ausschluss etwaiger Katalyse-bedingter pH-Änderungen wurden pH-Kontrollmessungen durchgeführt. Für die Messungen zur Temperaturabhängigkeit wurde Chitinase in den jeweiligen Temperaturintervallen 30 min vorgewärmt. Zudem wurde die Fluoreszenz eines Methylumbelliferon-Kontrollansatz aufgezeichnet und Aktivitätsmesswerte entsprechend korrigiert. Durch Variation der Ionenkonzentration (0 – 1,0 M NaCl bzw. 0 – 10 mM Trifluoressigsäure) sollte die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität und Hemmbarkeit der Enzyme vom Ionenmilieu untersucht werden. Etwaige signifikante pH-Wertverschiebungen durch Substrat- oder Inhibitorzugabe konnten ausgeschlossen werden.

2.2.5.5 Aktivitätsmessungen mit hochmolekularem Substrat

Zur Überprüfung der Aktivität verschiedener Chitinasen mit dem hochmolekularen Substrat Carboxymethyl-Chitin RBV (Loewe, Sauerlach) und möglichen Inhibitoren wurde ca. 0,1 μ g Substrat in 150 μ l 0,1 M McIlvain-Puffer (pH 5,0; 37°C) gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 0,1 - 0,4 μ g Enzym gestartet. Nach 10 min wurde $\frac{1}{4}$ Volumen 1 N HCl hinzugefügt. Die resultierende pH-Absenkung reichte zum Abstoppen der Reaktion, führte jedoch nicht zu einer übermäßigen sauren Autohydrolyse des Substrates. Nach 10 min Fällung auf Eis erfolgten sequentielle Zentrifugationsschritte für insgesamt 4 min bei 14000 rpm und 4°C. Die anschließende photometrische Messung des Überstandes erfolgte bei 520 nm gegen einen Leerwert derselben Lösung ohne Enzymzugabe. Die hydrolytische Funktionstüchtigkeit der Chitinasen wurde zuvor mittels Fluoreszenzassays unter Verwendung des Substrates UMB-Chitotriose überprüft. Beim Einsatz von in DMSO gelösten Inhibitoren erfolgte ein DMSO-

Ausgleich. Als Positivkontrolle für die Hemmung mit Peptidinhibitoren wurden Ansätze mit Allosamidin mitgeführt. Bei allen Messungen wurde abschließend der pH-Wert bestimmt.

2.2.6 Inhibitorcharakterisierung und –optimierung

2.2.6.1 Enzymkinetik unter Zugabe von Inhibitoren

Um Inhibitoren und potenzielle Inhibitorpeptide auf ihre Fähigkeit zur Hemmung von Chitinasen zu testen, wurden diese bei Konzentrationen von 0,25 bis 3 μM (Allosamidin) bzw. 25-200 μM (Peptide) mit verschiedenen Chitinasen in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,25) 10 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe UMB-Chitotriose bzw. UMB-Chitobiose gestartet und erfolgte über 3 min bei 37°C wie beschrieben. Die Konzentration der Chitinasen und ihrer jeweiligen Substrate sind in Tab. 2-2 angegeben. Zum Ausschluss etwaiger Peptid-basierter Milieuveränderungen erfolgte eine pH-Kontrollmessung in Küvetten mit und ohne Peptidzugabe nach Abschluss der Messung. Die Aktivitätsmessung mit Chitinase aus *C. ensiformis* und Inhibitorpeptiden erfolgte wie unter 2.2.5.5 beschrieben.

Tabelle 2-2: Für Fluoreszenzassays eingesetzte Enzym- und Substratkonzentrationen.

Enzym	Enzymkonzentration	Substrat	Substratkonzentration
AvCHT1	0,0375 $\mu\text{g/ml}$	UMB-Chitotriose	25,0 μM
SmCHTA	0,01 $\mu\text{g/ml}$	UMB-Chitobiose	25,0 μM
SmCHTB	0,04 $\mu\text{g/ml}$	UMB-Chitobiose	25,0 μM
SmCHTC	5,00 $\mu\text{g/ml}$	UMB-Chitotriose	25,0 μM
BmCHT1	12,5 U/ml	UMB-Chitotriose	25,0 μM
OvCHT1	12,5 U/l	UMB-Chitotriose	25,0 μM
PfCHT1	25,0 U/l	UMB-Chitotriose	25,0 μM
CeCHT	0,455 $\mu\text{g/ml}$	RBV-CM-Chitin	0,377 mg/ml

Angegeben sind verschiedene genutzten Chitinasen (CHT) mit korrespondierend verwendeten Substraten und ihre jeweiligen Konzentrationen. Herkunftsorganismen waren *Acanthocheilonema viteae* (Av), *Serratia marcescens* (Sm), *Brugia malayi* (Bm), *Onchocerca volvulus* (Ov), *Plasmodium falciparum* (Pf) und *Canavalia ensiformis* (Ce).

2.2.6.2 Bestimmung des K_i -Wertes

Zur Bestimmung des K_i -Wertes von Chitinase-Inhibitoren wurden Chitinaseaktivitäten mit dem Fluoreszenzsubstrat UMB-Chitotriose bei verschiedenen Substrat- und Inhibitorkonzentrationen gemessen. Für die Messung wurden Natriumphosphatpuffer (0,1M; pH 7,25), 0,02 – 0,4 $\mu\text{g/ml}$ Chitinase, UMB-Chitotriose (12,5 – 50 μM) sowie Inhibitoren eingesetzt, wobei peptidische Inhibitoren in DMSO gelöst waren. Die Messung erfolgte nach zehnmütiger Vorinkubation

von Enzym und Inhibitor wie beschrieben über 3 min bei 37°C. Der K_i -Wert wurde unter Annahme einer kompetitiven Hemmung durch nichtlineare Regression nach der Formel $v = (V_{\max} \times S) / (S + K_M (1 + (I / K_i))) + \text{off}$ mit dem Programm OriginPro 7.0E errechnet, wobei „off“ für eine eventuelle Restaktivität steht.

2.2.6.3 SH-Gruppenbestimmung mittels Ellmann's Reagenz (DTNB)

Zur Überprüfung des Zyklisierungsgrades synthetisierter Peptide mit zwei Cysteinen oder zum Ausschluss etwaiger intermolekularer Disulfidbrückenbildung bei Peptiden mit nur einem Cystein wurde die Anzahl freier SH-Gruppen bestimmt. Dazu wurden je 250 μM Peptid mit 200 μM DTNB in einem Tris-HCl-Puffer (0,1 M, pH 8) gemischt und nach 10 min das Spektrum von 380 – 550 nm gemessen (Spektralphotometer UV-160A, Shimadzu). Als Referenz wurde der gleiche Ansatz ohne Peptid genutzt, ein Ansatz mit 250 μM Cystein diente als Positivkontrolle. Die Konzentration an freien SH-Gruppen nach der Reaktion mit DTNB wurde mittels der Formel $c = E_{412 \text{ nm}} \times \epsilon^{-1} \times d^{-1}$ (mol/l) bestimmt, wobei der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{412 \text{ nm}} = 13600 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ beträgt.

2.2.6.4 Bindung an membrangebundene Peptide

Die Bindung von Chitinase an membrangebundene Peptide sollte der Untersuchung von für Interaktionsmechanismen wichtigen Aminosäurepositionen innerhalb der Peptidsequenz dienen. Zunächst erfolgt ein fünfminütiger Waschschrift der mit gebundenen Peptiden versehenen Zellulosemembran mit 96 % Methanol. Die anschließende Zyklisierung der Peptide wurde durch Inkubation der Membran mit 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) und 20 % DMSO für 48 h bei Raumtemperatur sichergestellt. Danach wurde die Membran 3 x 5 min mit 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,5) gewaschen und über Nacht mit 2 x Blockingreagenz (0,1 M Natrium-Phosphatpuffer; pH 7,5) bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Bindung der Chitinase an die Peptide wurde diese in einer Konzentration von ca. 100 nM in 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,5) für 2 h mit der Membran inkubiert und diese anschließend 3 x 10 Minuten mit TTBS gewaschen. Nach der Trocknung der Membran mit Hilfe von Whatmanpapier erfolgte die Inkubation mit monoklonalem α -poly-His-HRP-Antikörper (1:1000 in TBST) für 1 h. Nach Waschung der Membran mit TBST wurde diese mit 3 ml TMB prec (Seramun) benetzt. Die Detektion wurde bei ausreichender Färbung durch Spülung mit destilliertem Wasser beendet, die Membran über Nacht weiter in Wasser geschwenkt, anschließend getrocknet und ausgewertet.

2.2.6.5 Komplexe Substitutionsanalyse mittels abgespaltener Peptid-SPOTS

Zur Optimierung von mittels Phagendisplay selektierten inhibitorischen Peptiden wurde eine schrittweise Substitution aller Aminosäuren der Inhibitorpeptide durchgeführt. Die Zyklisierung und Abspaltung der auf Zellulosemembranen synthetisierten Peptid-SPOTS erfolgte durch 1 h Inkubation des jeweiligen SPOTS mit 20 µl DMSO sowie Zugabe von 80 µl Natrium-Phosphat-Puffer (0,1 M; pH 7,25) und Inkubation für 48 h jeweils bei Raumtemperatur. Der Zyklisierungsgrad der gelösten Peptide wurde wie beschrieben überprüft. Die Analyse der Inhibitions Potenz der Substituenten erfolgte im Mikrotiterplattenformat (HelQ96 black, Hellma) am ELISA-Reader SpectraFluor Plus (Tecan) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm. Für die Messungen wurden je 25 µl der Peptidlösung (0,02 mM) und 50 µl Chitinaselösung (ca. 20 ng/ml) eingesetzt und 10 min bei Raumtemperatur schüttelnd vorinkubiert. Als Standard wurden 50 µl dieser Chitinaselösung und 25 µl eines mit 20 % DMSO versetzten Natrium-Phosphatpuffers (0,1 M; pH 7,25) genutzt. Der Start erfolgte mit 25 µl UMB-Chitotrioselösung (100 µmol/l). Die Signaländerung pro Minute wurde in 20 Zyklen von je 30 sec als Mehrfachmessungen für die einzelnen Peptide aufgezeichnet und anschließend mittels des Programmes Magellan 2 Genios (Tecan) ausgewertet.

2.2.7 Statistische Auswertung

Fluorimetrische Untersuchungen wurden als Mehrfachmessungen ($n = 2 - 6$) durchgeführt, angegeben wurde jeweils der arithmetische Mittelwert sowie die Streuung (Spannweite) der Messergebnisse. Die Angabe von Standardabweichungen war durch die geringer Zahl paralleler Messungen nicht angebracht. Nichtlineare Regressionen wurden mit Hilfe des Programmes Origin Pro7.0E unter Nutzung des Levenberg-Marquard-Algorithmus' mit verschiedenen Regressionsformeln durchgeführt. Die kalkulierten Werte wurden jeweils zusammen mit dem Standardfehler (*standard error of the mean*) angegeben. Zur Ermittlung der Signifikanz gefundener Aminosäurehäufungen durch Phagendisplayselektion wurde der Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest durchgeführt, die Wahrscheinlichkeiten einer unabhängig gefundenen Verteilung wurden in Prozent angegeben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Expression und Aufreinigung von *A. viteae* Chitinase

Sowohl für die geplante Selektion peptidischer Binder und möglicher Hemmstoffe von Chitinase aus molekularen Bibliotheken als auch zur Charakterisierung der Enzymkinetik und potentieller peptidischer Inhibitoren war die Gewinnung von enzymatisch aktivem Chitinaseprotein notwendig. Die für ein um die Chitinbindungsdomäne verkürztes Chitinasefragment aus *A. viteae* kodierende DNA wurde im Vektor pET-22b(+) (Novagen Merck) durch Prof. Richard Lucius (Institut für Parasitologie, HU Berlin) freundlichst zur Verfügung gestellt. Dem kodierenden Gen liegen die Sequenzen von Wu et al. (1996) bzw. Adam et al. (1996) zugrunde, erstere ist am 5-Ende um 12 bp, welche für Methionin, Arginin, Tryptophan und Isoleucin kodieren, länger. Durch eine für ein Signalpeptid kodierende *leader* Sequenz des Vektors sollte periplasmatische Expression möglich sein. Nach Abtrennen dieses Signalpeptides durch eine Signalprotease sollte das periplasmatisch exprimierte Chitinasefragment N-terminal nach einem kurzen, aus dem Vektor verbliebenen *Linker* mit dem für Filarienchitinasen typischen YVRG-Aminosäuremotiv beginnen. C-terminal sollte ein Hexahistidin-*Tag*, der ebenfalls durch den Vektor kodiert würde, das Protein abschließen.

Zunächst sollte das Plasmid isoliert werden, anschließend war eine Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen mit dem kodierenden Plasmid geplant. Schließlich sollte enzymatisch aktive Chitinase heterolog exprimiert und aufgereinigt werden. Bei diversen Vorversuchen mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen zeigte sich, dass eine Proteingewinnung sowohl aus dem Zyto- als auch aus dem Periplasma möglich wäre. Bei beiden Varianten war der mit Abstand größte Teil der Proteine in Einschlusskörperchen exprimiert worden. Die Entscheidung fiel zugunsten der Gewinnung periplasmatisch exprimierten Proteins mittels Zellen des *E. coli*-Stammes T7 Express *I*^q (New England Biolabs).

3.1.1 Plasmidpräparation, -analyse und Transformation von *E. coli*-Zellen

Bei der Präparation der Plasmid-DNA mittels des QIAprep[®] Miniprep Kits (Qiagen) konnten 50 µl Elutionspuffer mit einer DNA-Konzentration von 56,3 ng/µl gewonnen werden. Zur Kontrolle der Präparation wurden jeweils 50 ng DNA auf ein 1,2 %-Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Anschließend wurde das Plasmid einem Restriktionsverdau unter Nutzung der Restriktionsenzyme *NcoI* und *XhoI* unterzogen und die Spaltprodukte mittels 1,2 %-Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 3-1). Es konnte eine korrekte Präparation des das Chitinasegen tragenden Plasmids festgestellt werden.

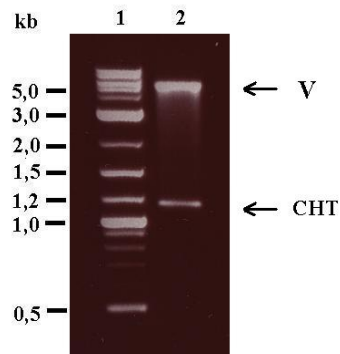


Abbildung 3-1: Restriktionsverdau.

1,2 %-Agarosegelelektrophorese des präparierten Plasmids (Spur 2). Das für AvCHT1 kodierende Insert (\rightarrow CHT) hat eine theoretische Größe von 1136 bp, der Vektor pET-22b (+) ca. 5,4 kb (\rightarrow V). 2-log-DNA-Marker (Invitrogen) in Spur 1.

Daraufhin erfolgte die Transformation von 500 μ l kompetenten T7 Express *I^q*- Zellen mit 50 ng der gewonnenen Plasmid-DNA und anschließende Kultivierung auf LB-Agar (100 μ g/ml Ampicillin) über Nacht. Aus gewonnenen Klonkulturen isolierte, für Chitinase kodierende DNA-Fragmente konnten dann mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotide (5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3' & 5'-CTAGTTATTGCTCAGCGG-3', Novagen Merck) amplifiziert werden. Der Nachweis von elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkten erfolgte im Agarosegel. Alle Klone waren erfolgreich mit dem für *A. viteae* Chitinasefragment kodierenden Konstrukt transformiert worden (Abb. 3-2).

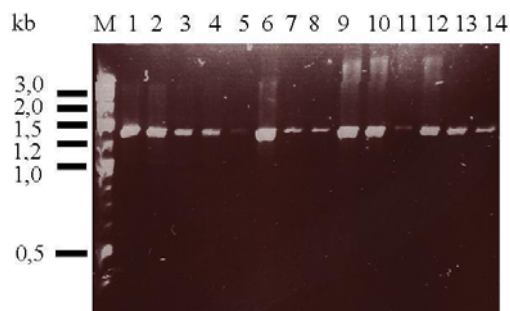


Abbildung 3-2: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten aus transformierten *E. coli*-Klonen.

Das theoretische PCR-Produkt des Konstruktes hatte eine theoretische Größe von 1439 bp. Jeweils 5 μ l der PCR-Produkte aus 14 Klonen (Spuren 1-14) und 2-log-DNA-Marker (New England Biolabs, Spur M) wurden aufgetragen.

Zur abschließenden Kontrolle wurde die gewonnene plasmidische DNA unter Verwendung genannter Oligonukleotidprimer sequenziert (M. Meixner). Die aufgefundene Sequenz (Genstrukturübersicht: Abb. 3-3) kodiert wie erwartet für eine um C-terminale Anteile verkürzte Chitinase I aus *A. viteae* (Aminosäuresequenz: Abb. 3-4).

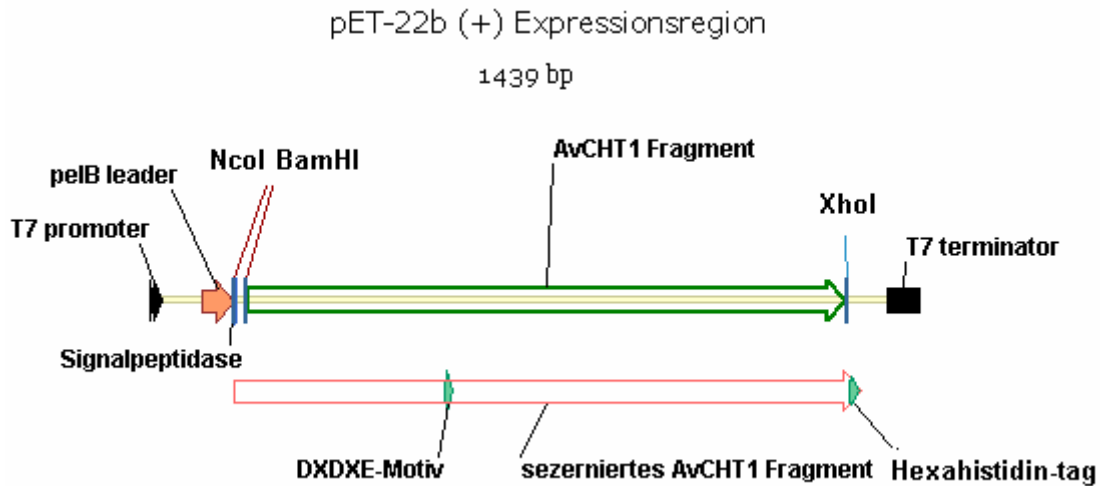


Abbildung 3-3: Expressionsregion des Vektors pET-22b (+) (Novagen, Merck) mit dem für AvCHT1 kodierenden Insert. Schematisch abgebildet sind die zur PCR genutzten Promoter- und Terminatorregionen, Restriktionsschnittstellen sowie die Schnittstelle der Signalpeptidase für das exprimierte Genprodukt. Die daraus resultierende sezernierte Chitinase verfügt über das hochkonservierte DXDXE-Motiv und einen Hexahistidin-Tag. Die gesamte Expressionsregion umfasst 1439 Basenpaare, das resultierende sezernierte Peptid ist 389 Aminosäuren lang.

1	MDIGINSDP	<u>YVRCYYTNWA</u>	QYRQEGGKFL	PEDIPIGLCT	HILYAFKVD	EKGTSMFAF
61	WNDEDTEWS	KGMYSRVIKLR	ENDPTLKILL	SYGGYNFGSS	TFTAIKSAE	RKHFIQSA
121	FLRKHKFDG	FLLDWEYPTGV	AEEHAKLVEE	MKAAFVEEAK	ESGKQQLLLT	AVSAGKMT
181	DESYNVQSL	GKVWDLFLMS	YDLHGSWEKN	VDLHGELRPT	ERETSGTGVC	TEFAANYW
241	AEKGMPKQK	IIIGIPAYSRG	WTLSNPSETA	IGAEGDRPSS	PSTTNPAGGT	AYWEICKY
301	VKEGGKETV	DKKSVGAYMVK	GDQWHGYDNE	ETIKIKMKWL	KEEDYGGAFM	TLDFDDFK
361	GTSCGKGPY	PLLNAINNGLE	<u>SEQTLEHHHH</u>	<u>HH</u>		

Abbildung 3-4: Aminosäuresequenz der periplasmatisch exprimierten N-terminalen Chitinase aus *A. viteae*. Das sezernierte Chitinasefragment umfasst 389 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 43837 Da. Die beiden konservierten Motive in der katalytischen Domäne sowie der C-terminale Hexahistidin-Tag wurden unterstrichen.

3.1.2 Expression, Gewinnung und Reinigung enzymatisch aktiver Chitinase

Erfolgreich transformierte *E. coli*-Klonkulturen des Stammes T7 Express I^q aus einem angelegten Glycerolstock wurden wie beschrieben kultiviert. Es folgte die Optimierung der periplasmatischen Expression löslichen, enzymatisch aktiven Proteins durch Variation der Induktionskonzentration von IPTG. Eine Konzentration von 0,01 mM IPTG wurde hinsichtlich der Gesamtproteinmenge und des Verhältnisses von löslichem zu unlöslichem Protein als günstig bewertet.

Nun wurden transformierte Zellen wie beschrieben in insgesamt 2 x 0,5 l LB-Medium inokuliert. Nach Induktion und 2 h Inkubation bei 22°C waren beide Kulturen ähnlich herangewachsen ($OD_{600\text{ nm}} \approx 1,2$). Der Zellaufschluss und die Präparation der periplasmatischen

Proteinfractionen erfolgten wie dargestellt, das Ergebnis waren jeweils 5 ml proteinhaltiger Periplasmafraktion. Die Auswertung erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (12% Acrylamid), anschließend Immunoblotting mit peroxidasegekoppelten α -poly-His-POD-Antikörpern sowie Detektion mit Peroxidasesubstrat TMB-prec. Beide periplasmatischen Fraktionen wurden zusammengeführt, gegen PBS dialysiert und schließlich sterilfiltriert.

Die Proben wurden wie dargestellt gewaschen und fraktioniert. Das aufgezeichnete Chromatogramm (Abb. 3-5) zeigte zwei Elutionspeaks, wobei der erste Peak zwischen 75 - 100 mM und der zweite zwischen 100 - 125 mM Imidazol eluiert wurde. Fluorimetrische Aktivitätsmessungen mit dem Substrat UMB-Chitotriose zeigten, dass nur Peak 2 enzymatisch aktiv war. Von einer weiteren Bearbeitung der ersten Elutionsfraktion wurde daher abgesehen.

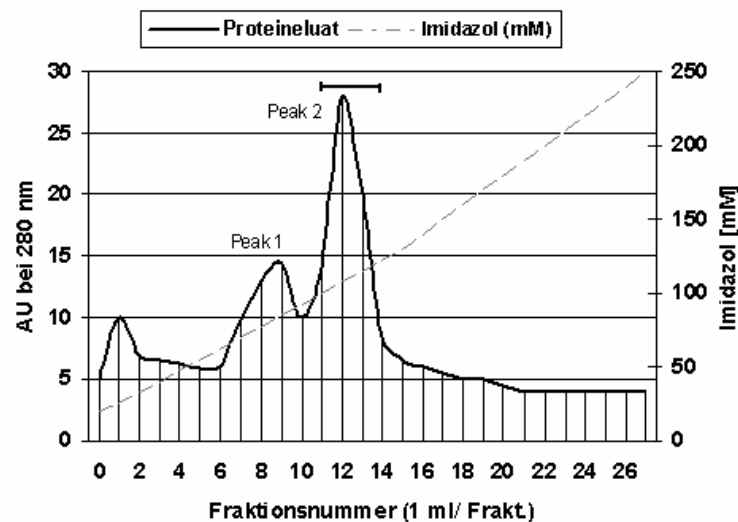


Abbildung 3-5: His – Trap - Säulenchromatografie von periplasmatisch exprimierter *A. viteae* Chitinase. Die dialysierte Enzymlösung wurde auf die zuvor mit 20 mM Imidazol äquilibrierte Säule aufgetragen und mittels GradiFrac FPLC fraktioniert. Die Elution erfolgte mit einem biphasisch-linearen Imidazolgradienten bis 250 mM. Die Empfindlichkeit des Schreibers betrug 0,2 Absorptionseinheiten (AU). Zwischen 75 - 100 bzw. 100 - 125 mM Imidazol konnten größere Proteinmengen eluiert werden.

Die den Peak 2 darstellenden Fraktionen 11-14 wurden zusammengeführt, gegen PBS dialysiert und aufkonzentriert (Endkonzentration 88,8 μ g/ml). Nach Auftragung von je 12 μ l Proteinlösung auf ein 12 % acrylamidhaltiges SDS-Gel erfolgten eine Auftrennung durch Elektrophorese und Proteindetektion im Immunoblot (Abb. 3-6). Abschließend konnte die Reinigung durch Affinitäts-chromatografie als erfolgreich bewertet werden.

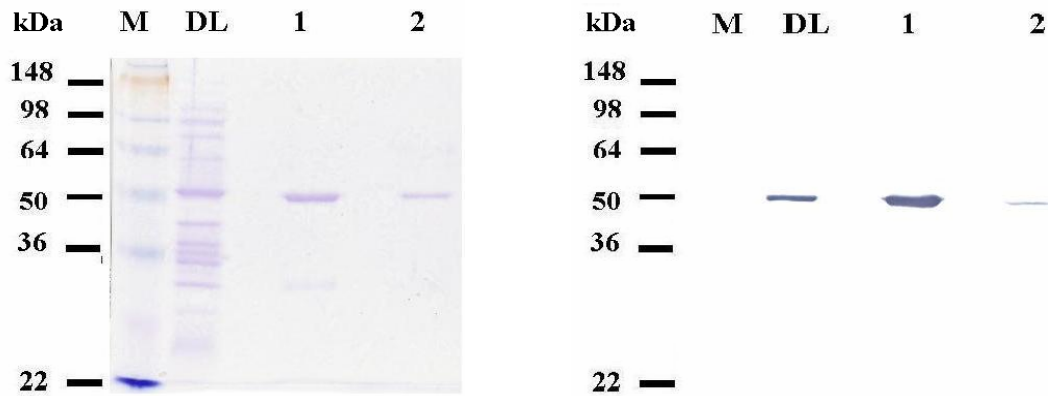


Abbildung 3-6: 12%-SDS-PAGE und Western-Blot von mittels Affinitätschromatographie aufgereinigter Chitinase. Coomassie-Färbung und Immunoblot mit α -poly-His-Antikörpern (Sigma). Je 12 μ l der ungereinigten, nur dialysierten periplasmatischen Proteinfraction (Spur DL) sowie der durch Affinitätschromatographie mittels His-Trap-Säule gereinigten und aufkonzentrierten (Spur 1) bzw. nur gereinigten (Spur 2) Proteine wurden aufgetragen. Das exprimierte Chitinasefragment hatte eine theoretische Größe von ca. 44 kDa, die Banden liegen in Gel und Blot bei ca. 50 kDa. Um eindeutige Aussagen zu diesen Größenabweichungen treffen zu können, wären massenspektrometrische Messungen notwendig. Für Chitinasen sind schwankende Elektrophoresemobilitäten beobachtet worden (Arakane et al., 2003), wahrscheinlicher ist jedoch eine unzureichende SDS-Beladung der Proteine. Es muss auch in Betracht gezogen werden, dass zytoplasmatische Chitinase durch fehlerhaften Zellaufschluss isoliert worden sein könnte– die vergrößerte molekulare Masse im Gel würde dann durch das noch vorhandene Signapeptid verursacht. Spur M: Seebblue Plus2 Marker (Invitrogen).

Die gereinigte Chitinase aus *A. viteae* zeigte in fluorimetrischen Aktivitätsmessungen mit UMB-Chitotriose bei pH 7,25 und 37°C eine spezifische Aktivität von $11,9 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ und wurde für die folgenden Versuche genutzt. Die gewonnene Menge an enzymatisch aktiver Chitinase war mit 44,4 μg zwar gering, jedoch für Aktivitätsmessungen ausreichend. Für die Gewinnung größerer Enzymmengen, beispielsweise für das Screening gegen Peptidbibliotheken, wurde das Kulturvolumen entsprechend erhöht. Eine weitere Optimierung der Expressionseffizienz wäre mittelfristig als sinnvoll anzusehen.

3.2 Phagen-Display zum Auffinden von Inhibitorpeptiden

Die Selektion von peptidischen Bindern als potentielle Inhibitoren von Chitinase aus *A. viteae* erfolgte mittels kommerzieller Phagenbibliotheken (lineare und disulfidzyklisierte Heptapeptidbibliotheken). Jede Phagenbank wies eine Komplexität von durchschnittlich $2,8 \times 10^9$ verschiedenen Sequenzen auf. Die vergleichende Nutzung zweier verschiedener Peptidbibliotheken sollte Aussagen zu bevorzugten Konformationen unterschiedlicher Peptidsysteme hinsichtlich Bindung und Hemmung ermöglichen. Beide Systeme wurden jeweils isoliert verwendet; zusätzlich wurden beide Bibliotheken gemischt, um Vergleiche über etwaige Vorteile einer Peptidvariante während des Selektionsprozesses anstellen zu können.

Das randomisierte Heptapeptid war nach dem Schema (A)-(C) $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ -(C)-GGGS-pIII aufgebaut, wobei die zyklische Bibliothek über das N-terminale Alanin und die zwei flankierenden Cysteine verfügte. Letztere Peptidvarianten sollten spontan durch Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken im nichtreduzierenden Milieu des *E. coli*-Periplasmas beim Zusammenbau des Phagen zyklisieren. Die Präsentation erfolgte auf dem *minor coat* Protein pIII.

Um die Selektion von hochaffinen Phagen zu ermöglichen und etwaige an Kunststoffoberflächen bindende Virionen auszuschließen, sollte das Panning in unterschiedlichen Phasen erfolgen: Zunächst sollten Binder an Chitinase, welche an der festen Oberfläche einer Polystyrolplatte immobilisiert wurde, selektiert werden. Anschließend sollte ein Wechsel in die flüssige Phase stattfinden; hier lag Chitinase als Zielprotein biotinyliert vor, und an Enzym gebundene Phagen sollten über magnetische Streptavidinbeads gebunden werden. Der Phasenwechsel sollte durch einen Konzentrationsabfall angebotenen Enzyms (von 100 $\mu\text{g/ml}$ auf 5 $\mu\text{g/ml}$) den Selektionsdruck erhöhen und jene Phagen ausschließen, die an Plastikoberflächen binden. An Polystyrol, Streptavidin oder die magnetischen Beads bindende Phagen sollten durch ein vorgeschaltetes Prepanning aussortiert werden.

Zur Elution sollten Substanzen verwendet werden, die entweder als Substrat (UMB-Chitotriose) oder als bekannter Inhibitor (Allosamidin) des Enzyms im aktiven Zentrum der Chitinase binden bzw. dort gebundene Phagen verdrängen. So sollten die bekannten Nachteile unspezifischer Elutionsmethoden vermieden werden, z. B. die Ablösung von nicht am aktiven Zentrum bindenden Peptiden durch Elution mittels pH-Verschiebung (Petter, 2006). Eine „Elution“ gebundener Phagen mittels spezifischer Proteasen an speziellen, zwischen pIII und dem präsentierten Peptid vorhandenen Proteaseschnittstellen würde zwar auch hochaffine Binder ablösen, wäre jedoch ebenfalls unspezifisch. Die vergleichende Elution der Peptide durch Substrat oder Inhibitor sollte hochaffine Binder erfassen und spezifisch die im aktiven Zentrum gebundenen Phagen herauslösen. Von Interesse waren dabei mögliche Unterschiede eluierter Phagenpeptide und Phagentiter. Die im Vergleich zum Allosamidin geringere Affinität von Chitotriose ($K_M=130 \mu\text{M}$) und die potentielle Hydrolyse des Substrates könnten mögliche Nachteile der Substrat- gegenüber der Inhibitor-Elution darstellen (Allosamidin $K_i = 2,4 \text{ nM} \pm 0,4$).

3.2.1 Phagen-Display mit zyklisierter Heptapeptid-Bibliothek

Basierend auf dem Wissen um die zyklische Struktur bekannter Chitinaseinhibitoren und häufig beobachteter Affinitätssteigerungen durch Konformationseinschränkung von Peptiden mittels Zyklisierung (Zoeiby et al., 2003) wurde zunächst die zyklische Phagenbank verwendet. Die für eine Selektion an magnetischen Streptavidinbeads notwendige Biotinylierung des Zielmoleküls erfolgte mittels eines kommerziellen Kits. Im SDS-Polyacrylamidgel und auf dem Westernblot wurden die einzelnen Elutionsfraktionen einer Gelfiltration kontrolliert und bewertet, als Positivkontrolle wurde biotinylierter mAb CB4-1 mitgeführt. Eine Biotinylierung von *A. viteae* Chitinase war möglich, proteinreiche und gut biotinylierte Fraktionen wurden zusammengeführt und aufkonzentriert.

Die einzelnen Selektionsrunden wurden wie beschrieben durchgeführt, wobei zunächst an der festen Phase und anschließend zweimal mittels Pulldown-Panning selektiert wurde. Bei der Titerbestimmung der einzelnen Panning-Runden mittels Plaque-Methode konnte ein deutlicher Titerabfall beim Wechsel von der festen in die flüssige Phase beobachtet werden (Tab. 3-1). Dies ist auf den erhöhten Selektionsdruck durch den Phasenwechsel zurückzuführen und bestätigt die Strategie des Mehrphasen-Pannings. In der dritten Bindungsrunde war eine vermehrte Regenerationsrate realisierbar.

Tabelle 3-1: Phagenanreicherung pro Bindungsrunde gegen *A. viteae* Chitinase (zykl. Heptapeptidbibliothek)

Selektions-Runde	Eingesetzte Phagen	Phagentiter nach Elution mit Allosamidin	Elution (%)	Phagentiter nach Elution mit Chitotriose	Elution (%)
Festphasen-Panning	1×10^{12} pfu	9×10^5 pfu/ml	$1,8 \times 10^{-5}$	8×10^5 pfu/ml	$1,6 \times 10^{-5}$
1. Pulldown-Panning	2×10^{11} pfu	3×10^3 pfu/ml	3×10^{-7}	8×10^3 pfu/ml	8×10^{-7}
2. Pulldown-Panning	2×10^{11} pfu	8×10^6 pfu/ml	8×10^{-4}	2×10^4 pfu/ml	2×10^{-6}

Den drei Selektionsrunden sind die jeweils eingesetzten Phagemengen (bezogen auf 200 μ l), die nach Elution mit Allosamidin bzw. Chitotriose bestimmten Titer und die Eluatkonzentrationen in Prozent des Ausgangstiters zugeordnet (pfu = plaque-forming-units).

Zur Ermittlung der Sequenzen gefundener Peptide erfolgte die Sequenzierung der DNA von zufällig gepickten, mit Phagen der Elutionslösungen infizierten *E. coli* - Klonkulturen (M. Meixner). Zur Verwendung kamen phagen-genomspezifische, synthetische Oligonukleotide. Bei der Auswertung der Sequenzierungsergebnisse konnte mit jeder Bindungsrunde eine Anreicherung bestimmter Sequenzen im randomisierten Teil des Fusionproteins gezeigt werden,

die unterschiedlichen Elutionsmethoden führten dabei zu weitestgehend abweichenden Aminosäuresequenzen (Tab. 3-2).

Tabelle 3-2: Aminosäuresequenzen präsentierter Peptide von gegen *A. viteae* Chitinase selektierten Phagen aus der zyklischen Peptidbibliothek.

Elution mit Allosamidin			Elution mit Chitotriose	
1. Runde	2. Runde	3. Runde	2. Runde	3. Runde
CLRSAHLTC	CHPMAPKAC 3X	CHPMAPKAC 10X	CHPQFQSMC 7X	CHPQFQSMC 11X
CTLFPFYDC	CLNQKLPQC	CPHKAFSNC	CGTWHHPQC 3X	CGTWHHPQC
YLQHPTKTC	CELAPIRQC	CHPQFQSMC	CSNDNPLYC	
CTLSHAGFC	CEPATRDC			
CQLIDTAAC	CPRYDALLC			
CVMNVSRTC	CYAWQQDIC			
CPKTQMQQC	CQPHENARC			
CTTPQWNGC	CLNHNSNRC			
CEQVAHTAC	CSPSKYNTC			
CTSPENYQC	CQQNYKTAC			

Angegeben sind alle in den verschiedenen Selektionsrunden gefundenen Aminosäuresequenzen der Heptapeptide inklusive der flankierenden Aminosäuren im Einbuchstabenkode sowie das genutzte Elutionsagenz. Bei mehrfach gefundenen Sequenzen ist die Anzahl mit angegeben.

Die Anreicherung nur weniger Sequenzen machte ein Screening im größeren Maßstab mittels ELISA unnötig. Die Zyklisierung der Peptide ist bis auf eine Ausnahme gegeben (1. Bindungsrunde, Elution mit Allosamidin): Obwohl der Bereich der flankierenden Cysteine nicht randomisiert sein sollte, findet sich hier eine Mutation des N-terminalen Cysteins zu Tyrosin. Mögliche Ursachen für diese Substitution bleiben zu diskutieren.

Die gefundenen Aminosäuresequenzen wurden der Synthese von Peptiden zugrunde gelegt. Dabei wurden sowohl das N-terminale Alanin als auch ein Glycin des GGGS-Linkers in die Gesamtpeptidsequenz mit einbezogen. Die synthetisierten Peptide (Dr. P. Henklein, Charité) trugen C-terminal eine Säureamidgruppe und waren, wenn möglich, disulfidzyklisiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels HPLC. Der durch Massenspektrometrie ermittelte Reinheitsgrad war hoch (>80 %). Die sich aus dem Screening der zyklischen Peptidbibliothek gegen *A. viteae* Chitinase ergebenden Peptide wurden anschließend für Inhibitionsstudien eingesetzt (Tab. 3-3).

Tabelle 3-3: Aminosäuresequenzen präsentierter Peptide beider 3. Bindungsrunden sowie des linearen Peptides aus der 1. Bindungsrunde gegen *A. viteae* Chitinase. Das N-terminale Alanin und ein Glycin des GGGS-Linkers zu pIII wurden im folgenden in das Peptid miteinbezogen. Die Peptide wurden C-terminal als Säureamid und (soweit möglich) disulfidzyklisiert verwendet.

ACPHKAFSNCG
ACHPMAPKACG
ACHPQFQSMCG
ACGTWHHPQCG
AYLQHPTKTCG

3.2.2 Phagen-Display mit linearer Heptapeptid-Bibliothek

Zum Vergleich der Chitinaseaffinität von etwaigen zyklischen und linearen Peptiden kam neben der zyklischen auch eine Phagenbank mit linearen Peptiden zum Einsatz. Nach einer Selektionsrunde gegen auf Polystyrolplatten immobilisierter Chitinase sowie zwei Pulldown-Panningrunden mittels biotinylierter Chitinase wurden deutlich niedrigere Titer als beim Display der zyklischen Bibliothek beobachtet (Tab. 3-4). Die Regenerationsrate betrug ca. $10^{-6} - 10^{-7}$ % des Ausgangstiter.

Tabelle 3-4: Phagenanreicherung pro Bindungsrunde gegen *A. viteae* Chitinase (lineare Heptapeptidbibliothek)

Selektions-Runde	Eingesetzte Phagen	Phagentiter nach Elution mit Allosamidin	Elution (%)	Phagentiter nach Elution mit Chitotriose	Elution (%)
Festphasen-Panning	1×10^{12} pfu	5×10^4 pfu/ml	1×10^{-6}	2×10^5 pfu/ml	4×10^{-6}
1. Pulldown-Panning	2×10^{11} pfu	6×10^3 pfu/ml	6×10^{-7}	1×10^4 pfu/ml	1×10^{-6}
2. Pulldown-Panning	2×10^{11} pfu	2×10^3 pfu/ml	2×10^{-7}	5×10^3 pfu/ml	5×10^{-7}

Den drei Selektionsrunden sind die jeweils eingesetzten Phagenmengen (bezogen auf 200 μ l), die nach Elution mit Allosamidin bzw. Chitotriose bestimmten Titer und die Eluatkonzentrationen in Prozent des Ausgangstiter zugeordnet (pfu = plaque-forming-units).

Zudem zeigte die Sequenzierung eluierter Phagen nur eine geringe Anreicherung bestimmter Sequenzen (Tab. 3-5). Daher wurde eine weitere Selektionsrunde in der flüssigen Phase angeschlossen. Die Sequenzen anschließend eluierter Phagen sind in Tab. 3-6 dargestellt, wobei die Titerregeneration bemerkenswert gering war.

Tabelle 3-5: Aminosäuresequenzen präsentierter Peptide von gegen *A. viteae* Chitinase selektierten Phagen aus der linearen Peptidbibliothek.

Elution mit Allosamidin			Elution mit Chitotriose		
1. Runde	2. Runde	3. Runde	1. Runde	2. Runde	3. Runde
MPMPHQG	WPLSTIP	SLSNPTW	VFGQQNS	SLMRLPV	HAPLLRY
LQSYPLN	VKASMTL	LPPPYHT	TTPNGPA	APMSQGP	HWLPRTN
TPKPSDV	TASYSLE	SPPLHTA	LSPYHPP	YFGSMPE	GMSGLSG
KPSGHTF	TTSANNY	LPSYPFT	SHLAPAY	SLGSTIR	SQFSLLS
AHHTPSL	HLAMPTK	ATNASPK	TLDNPGL	YVARLTQ	APSLPRT
WPWPWHQ	AFGPYTT	QTQLPPP	TSLLTRH	AVSPFPP	SLPSSPP
HLNPHKN	VIIPSIN	AFPHPVE	TAVGAVP	LRLEPTP	LQSPPL
HRAFIWP	KPQSSPP	TASYSLE	TAVPPPI	YPDTWVP	SQFSLLS
HGEYTNR	SLHRPPA	TASYSLE	STISTVY	SAHTPHP	VTSTPLR
VTHSRTQ	TGVPDQT	AVEKPPK	TIEVNFT	SPQMSRL	SQFSLLS

Angegeben sind alle in den ersten drei Selektionsrunden gefundenen Aminosäuresequenzen der Heptapeptide im Einbuchstabenkode sowie das genutzte Elutionsagenz.

Tabelle 3-6: Phagentiter und Aminosäuresequenzen präsentierter Peptide aus der 4. Bindungsrunde der linearen Peptidbibliothek.

Elution mit Allosamidin	Elution mit Chitotriose
Titer nach Elution: 2×10^2 pfu/ml (2×10^{-10} %)	Titer nach Elution: 2×10^2 pfu/ml (2×10^{-10} %)
FTWDAAR 2X	ALASVSI 4X
ALASVSI 2X	YPGNLTG 1X
APVLHLS 2X	WVTDQSP 2X
VTSTPLR 2X	APVLHLS 4X
TMYLTFE 2X	
QHLKTHI 1X	
HAPLLRY 1X	
SILPYPY 2X	

Angegeben sind die gefundenen Aminosäuresequenzen der Heptapeptide im Einbuchstabenkode, das genutzte Elutionsagens, die bestimmten Phagentiter, die Eluatkonzentrationen in Prozent des Ausgangstiter sowie gefundene Häufigkeiten der Sequenzen. Der Ausgangstiter betrug 2×10^{11} pfu (pfu = plaque-forming-units).

Die Phagen wurden amplifiziert und zur Quantifizierung der Affinität zu Chitinase in einem Phagen-ELISA wie beschrieben eingesetzt. Die Messwerte wurden kinetisch als Extinktionsanstieg pro Minute im Intervall linearer Intensitätszunahme ausgewertet, da so besser Bindungsaffinitäten abgeschätzt und Sättigungseffekte ausgeschlossen werden konnten. Es konnte gezeigt werden, dass individuelle Phagenklone mit unterschiedlicher Affinität an Chitinase binden (Abb. 3-7). Es bleibt zu bedenken, dass Affinität nicht gleichzusetzen ist mit Hemmpotenz.

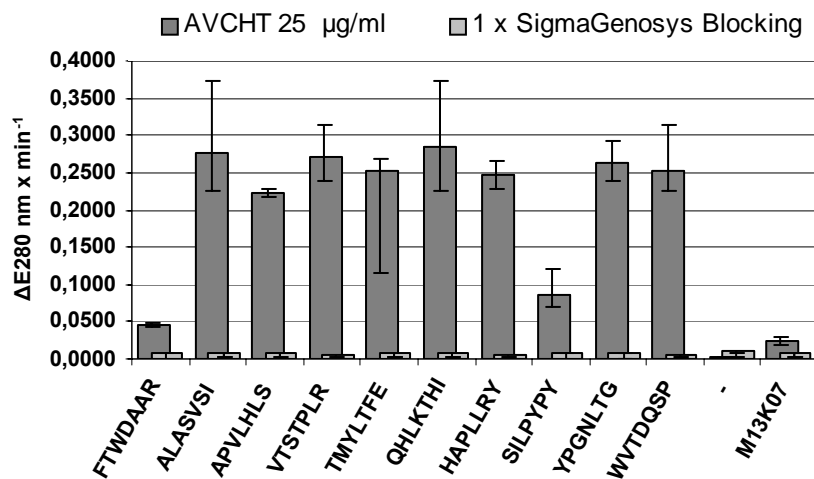


Abbildung 3-7: Phagen-ELISA einzelner Phagenklone. Wells wurden entweder mit 25 µg/ml *A. viteae* Chitinase (AVCHT1) beschichtet und anschließend 4 h bei 37°C mit 1 x Blocking Reagenz (Sigma) geblockt (dunkelgrau, s. Legende), oder als Kontrolle der Bindung von Phagen an Blocking oder Polystyrol nur geblockt (hellgrau, s. Legende). Auf der Abszisse angegeben sind die jeweiligen Phagenklone (Aminosäuresequenz des präsentierten Heptapeptids im Einbuchstabenkode; M13K07: Helferphagen als Kontrolle) bzw. keine Phagen als Negativkontrolle (-). Es wurden die gemittelten Extinktionsänderungen pro Minute und deren Streubreiten bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgetragen.

Da einerseits durch vorhergehende Versuche bekannt war, dass sich stark anreichernde, phagenpräsentierte Peptide nicht automatisch auch stark hemmend auf Chitinase wirken, und andererseits diese Hypothese weiter untersucht werden sollte, wurden – unabhängig vom Ergebnis des ELISAs – alle in der 4. Bindungsrunde gefundenen Heptapeptidsequenzen (ergänzt um zwei C-terminale Glycine des GGGS-Linkers) synthetisiert, HPLC gereinigt und mittels Massenspektrometrie überprüft (Dr. P. Henklein). Anschließend erfolgte ein Screening der Peptide auf etwaige Hemmung von *A. viteae* Chitinase (s. u.).

3.2.3 Phagen-Display mit Mischbibliothek

Durch Mischung einer Phagenbank, welche lineare Peptide auf pIII präsentiert, mit Phagen aus der zyklischen Peptidbibliothek wurde eine Mischbibliothek erzeugt. Die Selektionsrunden erfolgten einmal in der festen, zweimal in der flüssigen Phase. Bereits die Titerbestimmung mittels Plaque-Methode zeigte gegenüber den oben aufgeführten Selektionsversuchen deutliche Unterschiede (Tab. 3-7), auffällig war das völlige Fehlen des zu erwartenden Titerabfalls beim Phasenwechsel.

Tabelle 3-7: Anreicherung der Phagen pro Bindungsrunde gegen *A. viteae* Chitinase (Mischbibliothek).

Selektions-Runde	Eingesetzte Phagen	Phagentiter nach Elution mit Allosamidin	Elution (%)	Phagentiter nach Elution mit Chitotriose	Elution (%)
Festphasen-Panning	1×10^{12} pfu	2×10^5 pfu/ml	4×10^{-6}	4×10^5 pfu/ml	8×10^{-6}
1. Pulldown-Panning	2×10^{11} pfu	1×10^6 pfu/ml	1×10^{-4}	1×10^7 pfu/ml	1×10^{-3}
2. Pulldown-Panning	2×10^{11} pfu	7×10^6 pfu/ml	7×10^{-4}	7×10^7 pfu/ml	7×10^{-3}

Den drei Selektionsrunden sind die jeweils eingesetzten Phagenmengen (bezogen auf 200 μ l), die nach Elution mit Allosamidin bzw. Chitotriose bestimmten Titer und die Eluatkonzentrationen in Prozent des Ausgangstiters zugeordnet (pfu = plaque-forming-units).

Die nach den jeweiligen Bindungsrunden durchgeführte Sequenzierung einzelner Phagenklonkulturen bestätigte einerseits den heterogenen Charakter der verwendeten, gemischten Peptidbibliothek, andererseits die These der höheren Affinität konformationsstabiler, zyklisierter Peptidvarianten bei Bindung gegen *A. viteae* Chitinase (Tab. 3-8).

Tabelle 3-8: Aminosäuresequenz präsentierter Peptide von gegen *A. viteae* Chitinase selektierten Phagen der Mischbibliothek.

Elution mit Allosamidin		Elution mit Chitotriose	
1. Runde	2. Runde	1. Runde	2. Runde
CHPMAPKAC	CHPQFQSMC 5X	CHPMAPKAC	CHPQFQSMC 9X
CHPMYPMLC	AGPSHVP	QLPPSVP	QMPYILQ
CHPQFQSMC	ANSSLL	IPHTRTV	
LPALQLT	STFPVHA	SPESPIP	
LTASTSL	TELEPRK	VSSSPLP	
VDAVIPY		ALPSLGT	
TVIGHDS		YYTSPLP	
TLRTPWM	3. Runde	LQGPYPT	3. Runde
ADRWKSA	CHPQFQSMC 10X	TTLPLAL	CHPQFQSMC 10X

Angegeben sind alle in den jeweiligen Selektionsrunden gefundenen Aminosäuresequenzen der Heptapeptide inklusive etwaiger flankierender Aminosäuren im Einbuchstabenkode sowie das genutzte Elutionsagenz. Bei mehrfach gefundenen Sequenzen wurde die Anzahl mit angegeben.

Aufgrund der starken Reduktion der Sequenzen nach drei Panning-Runden wurde auf ein ELISA einzelner Phagenklonkulturen verzichtet. Da die nach der 3. Bindungsrunde gefundene Aminosäuresequenz mit einer bereits im Screening der zyklischen Bibliothek gegen *A. viteae* Chitinase gefundenen Sequenz übereinstimmt, wurden keine neuen Peptidsynthesen veranlasst.

Die gefundene Selektion vor allem bzw. nur zyklischer Peptide nach zwei bzw. drei Panning-Runden lässt die Frage zu, ob es sich wirklich um einen Selektionsvorteil durch bessere Bindung an Chitinase oder um einen Vorteil im Rahmen der Amplifizierung von Phagen, beispielsweise durch schnellere *E. coli*-Infektion oder Proteinassamblierung der Virionen, handelt. Zur Klärung dieser Frage erfolgte eine Amplifizierung aller in der Elution des 1. Pannings vorkommenden Phagen. Die anschließende Sequenzierung einzelner von der Titerplatte gepickter Klone (Tab. 3-9) zeigte, dass die im 1. Panning überwiegend vorhandenen Phagen der linearen Bibliothek keinen Amplifikationsnachteil zu haben scheinen. Der nach drei Panningrunden weitestgehend erfolgte Ausschluss von Phagen mit linearem Fusionsprotein scheint somit eher im Rahmen der Selektion zu erfolgen, und bestätigt die oben beschriebenen Vermutungen von auf unterschiedlichen Konformationsstabilitäten beruhenden Affinitätsunterschieden. Näheres bleibt zu diskutieren.

Tabelle 3-9: Aminosäuresequenzen präsentierter Peptide nach Amplifikation von Mischbibliothekseluat aus der 1. Panningrunde (Elution mit Allosamidin).

QWYWSPL	RGPSLPW
TLPWPDP	YVQPNSS
STVPKPN	THKITLG
GASPTAT	TFLPVWY
ESLVPRL	SSMNTNP
LFRRPPYS	HTYPPNS
GQMAFIL	HTASLVR
GPLPPTY	WSPYLMQ
TPWPRML	LPTAWYH
KTGTTPL	SFFHITT
HAIPGPP	QGAFVHH

Es konnten nach Amplifikation des Eluats nur Phagen der linearen Bibliothek aufgefunden werden. Dies spricht gegen einen Amplifikationsvorteil von Phagen mit zyklischem Fusionsprotein.

3.3 Kinetische Charakterisierung von *A. viteae* Chitinase

3.3.1 Bestimmung des K_M -Wertes

Für weitere Untersuchungen der mittels Phagendisplay aufgefundenen Peptide waren grundlegende kinetische Kenndaten des Enzyms von Interesse, darunter die Michaelis-Menten-Konstante (K_M). Letztere ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes und beschreibt jene Substratkonzentration, bei der halbmaximale Enzymaktivität zu erwarten ist. Die Bestimmung dieser enzymmengenunabhängigen, jedoch u. a. substratspezifischen Konstante erfolgt in der Regel über die Aufzeichnung initialer enzymatischer Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Aus so gewonnenen Wertepaaren kann dann entweder mittels linearisierter grafischer Darstellung, beispielsweise nach Lineweaver-Burk oder Hanes-Wilkinson, oder direkt durch nichtlineare Regression über die Michaelis-Menten-Gleichung ($v = V_{\max} \times S \times (K_M + S)^{-1}$) der K_M -Wert bestimmt werden. Bisher lag hinsichtlich der Chitinase I aus *A. viteae* kein publizierter Zahlenwert vor. In mehreren unabhängigen Messungen erfolgte daher eine fluorimetrische Bestimmung der initialen Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des Chitinasesubstrates UMB-Chitotriose. Mittels nichtlinearer Regression konnten K_M -Werte von $133 \pm 13 \mu\text{M}$ bzw. $128 \pm 23 \mu\text{M}$ Chitotriose bestimmt werden (Abb. 3-8).

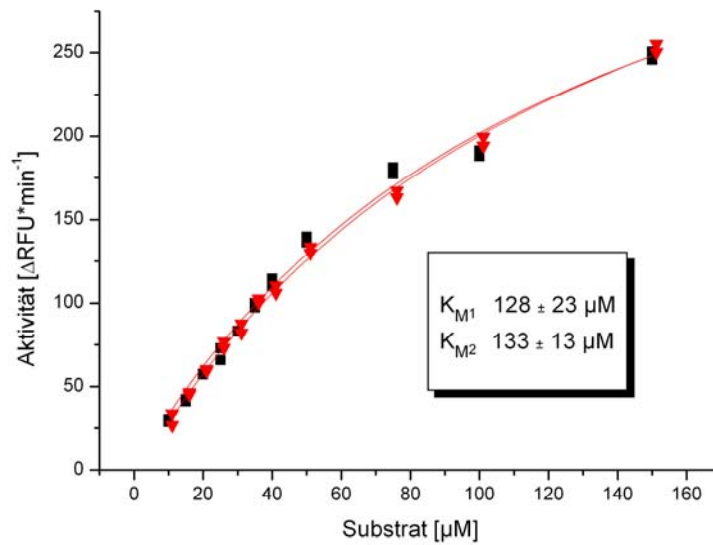


Abbildung 3-8: K_M -Wertbestimmung von *A. viteae* Chitinase mit UMB-Chitotriose. Die K_M -Werte wurden durch unabhängige Messungen der Enzymaktivität mit verschiedenen Konzentrationen des Fluoreszenzsubstrates UMB-Chitotriose und jeweils nichtlinearer Regression mittels Origin Pro 7.0E bestimmt. Schwarze Symbole bezeichnen gemittelte Messwerte, deren Regression zu K_{M1} geführt hat, rote Symbole sind entsprechend K_{M2} zuzuordnen (RFU = *Relative Fluorescence Units*).

3.3.2 Milieuabhängigkeit der Aktivität

Zur Definition optimaler Assaybedingungen wurden pH-, Temperatur- und Ionenkonzentrationsabhängigkeit der Enzymaktivität bestimmt.

Zur Aufzeichnung der Aktivität von Chitinase aus *A. viteae* mit UMB-Chitotriose bei verschiedenen pH-Werten wurden die Messungen in pH-Intervallen mit verschiedenen Puffern durchgeführt. Es konnte eine pH-Abhängigkeit mit einem Plateau hoher enzymatischer Aktivität im Intervall pH 7,25 – 8,1 gefunden werden (Abb. 3-9).

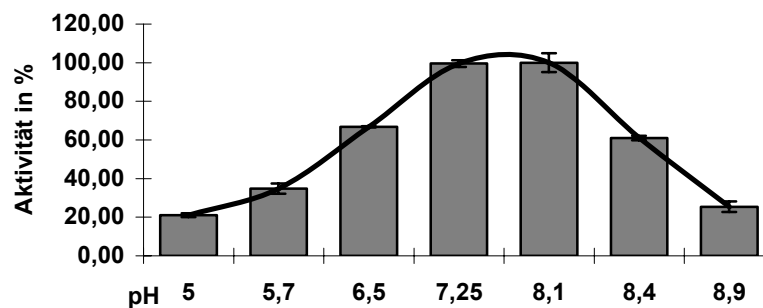


Abbildung 3-9: pH-Abhängigkeit der Aktivität von *A. viteae* Chitinase. Angegeben sind die Mittelwerte und Streubreiten der Enzymaktivität in Prozent. Es zeigt sich ein Aktivitätsplateau im Intervall pH 7,25 - 8,1 (entspricht $\approx 100\%$).

Bei der Messung der Enzymaktivität bei verschiedenen Temperaturen wurde nach Aufzeichnung der Aktivität stets ein Korrekturwert mitgeführt. Dieser hatte eine konstante Fluoreszenz, deren Änderung damit nur von der Änderung der Messbedingung, in diesem Fall der Temperatur, abhängig war. Bei der Auswertung der korrigierten Messwerte wurde deutlich, dass bei Temperaturen ab ca. 55 - 60°C durch Denaturierung Veränderungen in den für die enzymatische Aktivität wichtigen Tertiär- und Sekundärstruktur erfolgen, daraus ergab sich ein steiler Aktivitätsabfall ab ca. 55°C (Abb. 3-10). Letztere Temperatur stellt somit das sogenannte Temperaturoptimum dar – jene Temperatur, bei der einerseits der durch Arrhenius erkannte Zusammenhang zwischen steigender Temperatur und steigender Aktivität von Enzymen zum Tragen kommt, andererseits die Denaturierung noch nicht bzw. nicht in ausreichendem Maße eingesetzt hat.

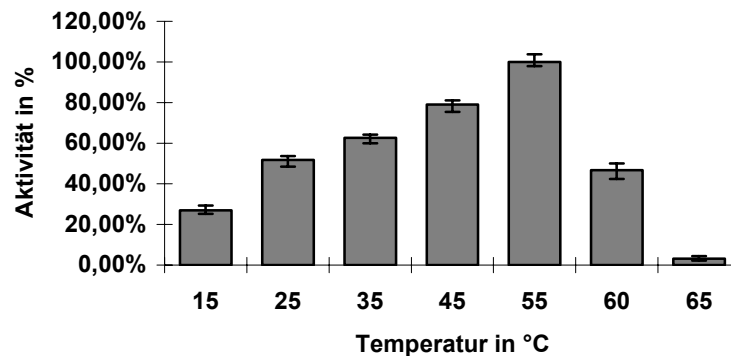


Abbildung 3-10: Temperaturabhängigkeit der Aktivität von *A. viteae* Chitinase. Angegeben sind die prozentualen Mittelwerte und Streubreiten der Chitinaseaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. 100 % Aktivität wurde der maximal gemessenen Aktivität gleichgesetzt. Ab 55°C ist ein Aktivitätsverlust zu beobachten, der auf die Denaturierung des Proteins zurückzuführen ist.

Der Einfluss von Salzzusätzen wie NaCl oder Trifluoressigsäure (TFE) auf die enzymatische Aktivität von Chitinase sollte durch Variation der Ionenkonzentration untersucht werden (Abb. 3-11). Dabei wurde deutlich, dass die hydrolytische Aktivität von Chitinase aus *A. viteae* bei höheren Konzentrationen von NaCl oder TFE (nicht gezeigt) stark vermindert wird, um schließlich gegen Null zu gehen (ab ca. 1,0 M NaCl).

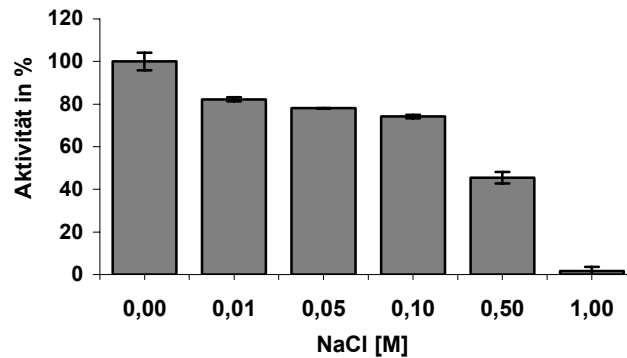


Abbildung 3-11: Einfluss der Ionenkonzentration auf die Aktivität von *A. viteae* Chitinase. Angegeben sind die prozentualen Mittelwerte und Streubreiten der Chitinaseaktivität in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration, wobei 100 % Aktivität bei Messung ohne NaCl-Zusätze als Referenz festgelegt wurde. Die enzymatische Aktivität verhält sich reziprok zur Ionenkonzentration.

3.3.3 Bestimmung der Substratspezifität

Die Substratspezifität der vorliegenden Chitinase aus *A. viteae* sollte zunächst durch Aktivitätsmessung mit dem Fluoreszenzsubstrat UMB-Chitobiose, einem Chitindiacetylbiosid, geprüft werden. Der Vergleich von Chitinaseaktivität mit Chitotriose bzw. Chitobiose als Substrat (Chitobioseaktivität betrug unter identischen Bedingungen und Substratkonzentrationen $8,2 \pm 1,3$ % der Chitotrioseaktivität) verdeutlicht die spezifische Affinität der Chitinase zum Substrat Chitotriose.

Zudem sollte die chitinolytische Aktivität der vorliegenden Filarien-chitinase, welche um die C-terminale Chitinbindungsdomäne verkürzt vorlag, mit hochmolekularem Substrat untersucht werden. Für die Chitinbindungsdomäne waren bereits dargestellte mögliche Funktionen bei der Katalyse u. a. von Chitin oder carboxymethyliertem Chitin bekannt. Letzteres wurde für Aktivitätsmessung von Chitinase wie beschrieben mit $0,1 - 0,4 \mu\text{g}$ *A. viteae* Chitinase eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde Chitinase C aus *S. marcescens* mitgeführt, die hydrolytische Funktionsfähigkeit beider Enzyme wurde mittels Fluoreszenzassays mit kurzkettigem Substrat zuvor geprüft. Es zeigte sich, dass bei nur geringer Hydrolyse des hochmolekularen Substrates durch das Chitinasefragement aus *A. viteae* keine eindeutige, von der Konzentration der Chitinase abhängige Aktivität ermittelt werden konnte (Tab. 3-10).

Tabelle 3-10: Aktivitäten von Chitinasen aus *A. viteae* und *S. marcescens* mit CM-Chitin.

Enzym\Enzymkonzentration	0,05 µg/ml	0,1 µg/ml	0,15 µg/ml
AvCHT1	0,0225 ± 0,007	0,0055 ± 0,002	0,0345 ± 0,011
SmCHTC	0,0350 ± 0,003	0,0800 ± 0,003	0,2835 ± 0,028

Angegeben sind Mittelwerte und Streubreiten absoluter Extinktionen ($\lambda = 520$ nm) nach Reaktion bei verschiedenen Chitinasekonzentrationen. Für das Filarien-chitinasefragment konnte, anders als für Chitinase C aus *S. marcescens*, keine Enzymkonzentrationsabhängigkeit der Aktivität bestimmt werden.

Die noch zu beschreibenden Ergebnisse der Allosamidin-Hemmung der Hydrolyse des gleichen hochmolekularen Substrates durch *A. viteae* Chitinase konnten jedoch zeigen, dass eine eindeutige Hemmung sehr wohl vorhanden ist. Daher sind zwar keine quantitativen Aussagen zum Charakter dieser Chitinolyse möglich, eine qualitative Bestätigung ihrer sicherlich geringfügigen Existenz stellt ihre Hemmbarkeit jedoch dar.

3.4 Charakterisierung und Optimierung von Chitinaseinhibitoren

Die Charakterisierung selektierter, potenzieller Inhibitoren sollte mittels verschiedener Methoden erfolgen. Dabei sollten Chitinase hemmende Peptide aufgefunden, diese Hemmung quantifiziert, entscheidende Aminosäurepositionen in der Peptidsequenz identifiziert und schließlich, wenn möglich, die Hemmstoffe hinsichtlich Inhibitionspotenz, Spezifität oder Stabilität optimiert werden. Der detaillierten Ergebnisbeschreibung für die peptidischen Inhibitoren sollen die Screening-Ergebnisse aller aufgefunderer Peptide auf etwaige Chitinasehemmung vorangestellt werden (Abb. 3-12 für Peptide aus der zyklischen Bibliothek, Abb. 3-13 für Peptide der linearen Bibliothek).

Dabei wird deutlich, dass von den im Fluoreszenzassay mit einer Konzentration von 75 µM eingesetzten Peptiden der zyklischen Phagenbank nur zwei eine Hemmung von *A. viteae* Chitinase verursachen. Die Restaktivität des Enzyms beträgt für Peptid ICAV1 (ACPHKAFSNCG) $34,48 \pm 0,05$ % sowie für ICAV2 (AYLQHPTKTCG) $38,67 \pm 1,67$ %.

Die Hemmung von Chitinase durch Peptide aus der linearen Bibliothek ist weniger ausgeprägt, beispielsweise betragen die Restaktivitäten des Enzyms nach 10 min Inkubation mit 75 µM der Peptide $73,84 \pm 0,82$ % (ALASVSIGG), $78,23 \pm 0,63$ % (VTSTPLRGG) bzw. $78,25 \pm 0,62$ % (HAPLLRYGG).

Zwei dieser hemmenden Peptide wurden nun detaillierter charakterisiert (siehe 3.4.2 bis 3.4.3).

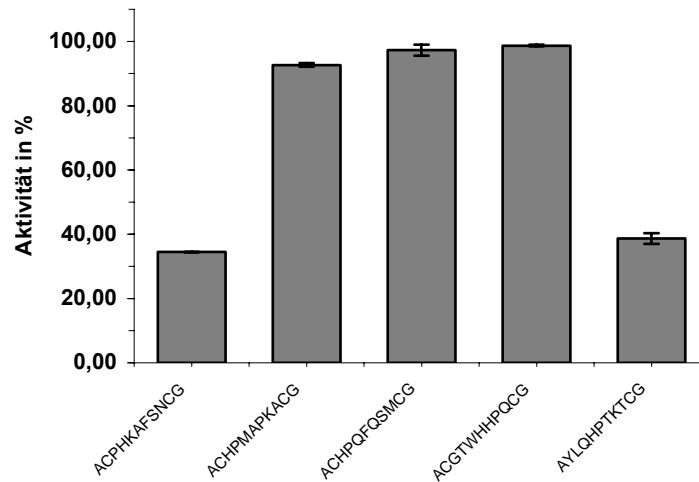


Abbildung 3-12: Screening von mittels Phagendisplay aus einer zyklisierten Heptapeptidbibliothek selektierten Peptiden. Dargestellt sind prozentuale Mittelwerte und Streubreiten von Restaktivitäten der Chitinase aus *A. viteae* im Fluoreszenzassay nach 10 min Inkubation mit 75 μ M Inhibitorpeptiden. Die Konzentration des Fluoreszenzsubstrats UMB-Chitotriose betrug 25 μ M. Deutliche Hemmungen zeigten nur Peptid 1 und 5.

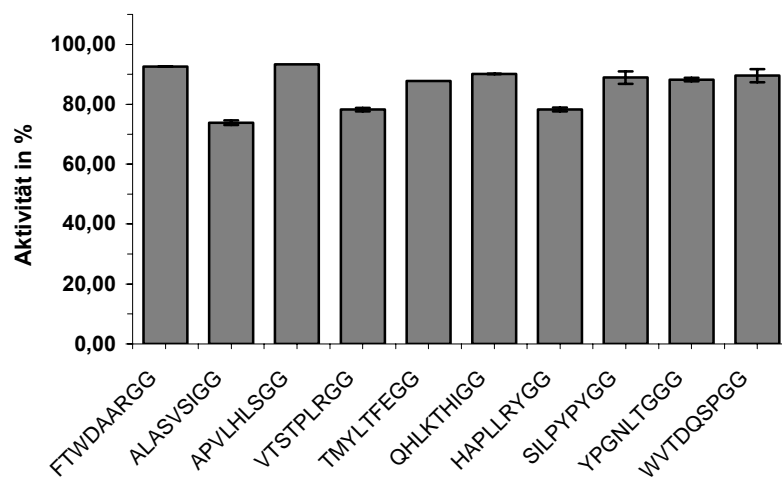


Abbildung 3-13: Screening selektierter Peptide aus einer linearen Heptapeptidbibliothek. Dargestellt sind prozentuale Mittelwerte und Streubreiten von Restaktivitäten der *A. viteae* Chitinase im Fluoreszenzassay nach 10 min Inkubation mit 75 μ M Inhibitorpeptiden. Die Konzentration des Fluoreszenzsubstrats UMB-Chitotriose betrug 25 μ M. Mehrere Peptide weisen inhibitorische Effekte gegenüber Chitinase auf, die Hemmungen sind dabei weniger ausgeprägt als im vorhergehenden Screen.

Daneben wurde auch eine kurze Charakterisierung der Hemmung von *A. viteae* Chitinase durch Allosamidin vorgenommen, da Allosamidin sowohl im Phagendisplay zur Elution genutzt wurde, als auch als Vergleichsinhibitor dienen sollte.

3.4.1 Allosamidin-Inhibition von *A. viteae* Chitinase

3.4.1.1 Spezifität von Allosamidin

Die These, peptidische Hemmer seien in ihrem Spezifitätsverhalten kohlenhydratanalogen Inhibitoren überlegen, kann nur im Vergleich beider Gruppen untersucht werden. Dazu sollte u. a. die Spezifitätsbestimmung der Chitinasehemmung durch Allosamidin dienen, wobei teilweise stark unterschiedliche Hemmkonstanten für verschiedene Chitinasen bekannt waren. Zur Untersuchung etwaiger enzymespezifischer Hemmungen, wie sie bei Allosamidin nicht erwartet wurden, kamen Chitinasen beider GH-Familien zum Einsatz: Neben Filarienchitinasen (aus *A. viteae*, *B. malayi*, *O. volvulus*) kamen bakterielle (*S. marcescens*), parasitäre (*P. falciparum*) sowie eine pflanzliche Chitinase (*C. ensiformis* Chitinase, GH-Familie 19) zum Einsatz. Die Konzentration von Allosamidin betrug 25 nM bzw. 680 nM für die Pflanzenchitinase. Die Messungen erfolgten nach 10 min Inkubation der Enzyme mit dem Hemmstoff in 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,25) bei 37°C. Als Substrate kamen UMB-Chitobiose bzw. -triose und CM-Chitin wie angegeben zum Einsatz. Abb. 3-14 bestätigt das bekannte Spezifitätsverhalten von Allosamidin gegenüber Chitinasen, wiewohl auch für GH-18 Chitinasen Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Allosamidin zu verzeichnen waren.

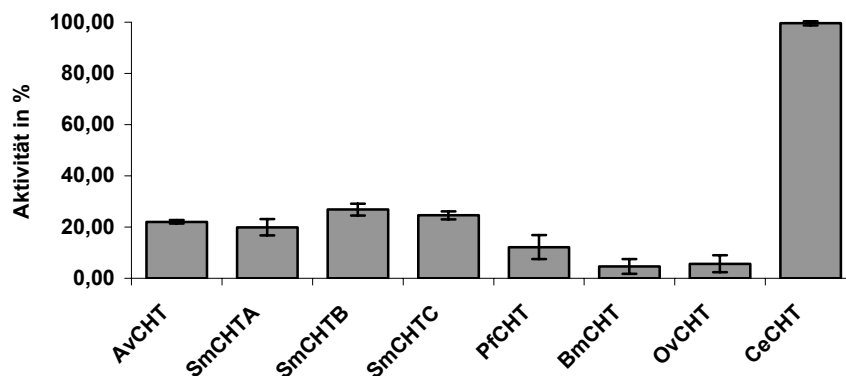


Abbildung 3-14: Spezifitätsverhalten der Chitinasehemmung durch Allosamidin. Angegeben sind die prozentualen Mittelwerte und Streubreiten der Restaktivität von Chitinasen nach 10 min Inkubation mit Allosamidin. Die Inhibitorkonzentration betrug 25 nM bzw. für CeCHT 680 nM. Für alle GH-Familie 18 Chitinasen sind deutliche inhibitorische Effekte durch Allosamidin zu beobachten. Die Chitinase aus der GH-19 Familie wird nicht durch Allosamidin gehemmt.

3.4.1.2 Bestimmung des K_i -Wertes

Zur quantitativen Bewertung der gefundenen Hemmung der Chitinase aus *A. viteae* durch Allosamidin und als Bezugswert für die Hemmpotenz anderer Inhibitoren erfolgte die Bestimmung des K_i -Wertes. Die Konzentration des in PBS gelösten Allosamidins betrug 0 bis 3 μ M. Die Messung bei verschiedenen Substratkonzentrationen diente der Verringerung des Fehlerwertes bei der nichtlinearen Regression mittels der Formel

$v=(V_{\max} \times S)/(S+K_M(1+(I/K_i)))$ +off, welche bei allen folgenden Regressionen angewendet wurde. Der ermittelte K_i -Wert lag mit $2,4 \pm 0,2$ nM im unteren nanomolaren Bereich, die Hemmung ist kompetitiv (Abb. 3-15).

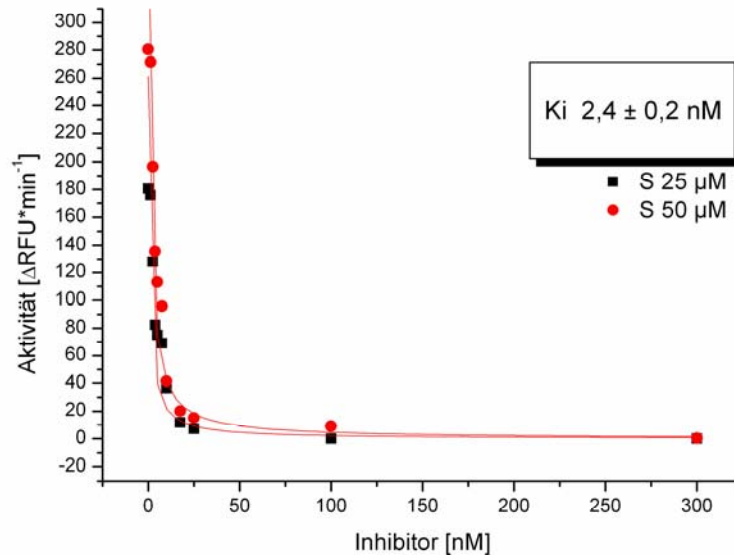


Abbildung 3-15: K_i -Wertbestimmung von Allosamidin mit *A. viteae* Chitinase. Das Fluoreszenzsubstrat UMB-Chitotriose wurde mit 25 bzw. 50 μ M Konzentration eingesetzt. Die Hemmung ist kompetitiv, der durch nichtlineare Regression unter Annahme eines K_M -Wertes von 130 μ M bestimmte K_i -Wert von ca. 2,4 nM liegt im unteren nanomolaren Bereich (RFU = *Relative Fluorescence Units*).

3.4.1.3 Hemmung der Hydrolyse von hochmolekularem Substrat

Auch die Hydrolyse hochmolekularen Substrates, z. B. carboxymethylierten Chitins, sollte durch Allosamidin zu hemmen sein. Angelehnt an das beschriebene Vorgehen zur Messung der Aktivität von Chitinase mit hochmolekularem Substrat wurden 0,4 μ g/ml Chitinase und 250 μ M Allosamidin 5 min vorinkubiert. Die Messung erfolgte mit 0,1 μ g Substrat. Vergleichend wurde ein Ansatz ohne Allosamidin mitgeführt. Die prozentuale Restaktivität nach Inkubation mit Allosamidin beträgt $1,4 \pm 1,38$ %, was einer vollständigen Hemmung der Chitinase nahe kommt. Die hohe Mittelwertabweichung ist der bereits geschilderten, in absoluten Messwerten geringen Aktivität geschuldet.

3.4.2 Charakterisierung und Optimierung von Peptid ICAV1

Von den mittels Phagendisplay selektierten Peptiden zeigte das Peptid mit der Sequenz ACPHKAFSNCG, im folgenden ICAV1 genannt, im dargestellten Screening die deutlichste inhibitorische Wirkung. Aufgrund dieser Tatsache erfolgten Versuche, das Peptid in seiner

Interaktion mit Chitinase aus *A. viteae* zu charakterisieren sowie durch Substitutionsanalysen möglichst optimierte Inhibitoren aufzufinden.

3.4.2.1 SH-Gruppenbestimmung mittels Ellmanns'-Reagenz (DTNB)

Die Bestimmung etwaiger freier SH-Gruppen diente der Kontrolle der vollständigen Zyklisierung des Peptids und erfolgte mittels Ellmanns'-Reagenz (DTNB), welches - zunächst farblos - unter reduzierenden Bedingungen 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (TNB) durch Abspaltung entlässt. Die intensive Gelbfärbung des TNBs, z.B. bei Reaktion mit der Positivkontrolle frisch gelösten Cysteins, ist bei 412 nm detektierbar. Das vorliegende Peptid ICAV1 lag vollständig zyklisiert vor (< 1 % nicht zyklisiertes Peptid).

3.4.2.2 Überprüfung der Spezifität

Die Überprüfung der Spezifität des Inhibitorpeptids erfolgte mittels Chitinasen der Glycosylhydrolase-Familien 18 (AvCHT1; SmCHT A,B,C; OvCHT1; PfCHT1; BmCHT1) sowie 19 (CeCHT). Das Peptid wurde in einer Konzentration von 75 μM (Familie 18 Chitinasen) bzw. 180 μM (Familie 19 Chitinase) eingesetzt und erwies sich dabei als weitgehend spezifisch für *A. viteae* Chitinase (Abb. 3-16). Für *B. malayi* Chitinase ist eine geringfügige Hemmung (Restaktivität $71 \pm 6 \%$) zu beobachten, die Hemmung der phylogenetisch ebenfalls eng verwandten Chitinase aus *O. volvulus* war nicht signifikant. Mögliche Ursachen für das beschriebene Spezifitätsverhalten der inhibitorischen Potenz von ICAV1 bleiben zu diskutieren.

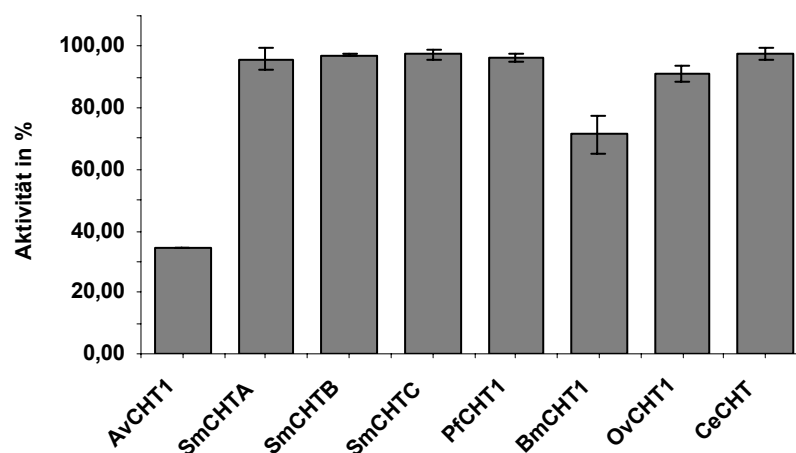


Abbildung 3-16: Spezifität des Inhibitors ICAV1. Die Spezifitätskontrolle erfolgte mit Chitinasen aus *A. viteae*, *S. marcescens*, *P. falciparum*, *B. malayi*, *O. volvulus* und *C. ensiformis* bei einer Inhibitorkonzentration von 75 μM bzw. 180 μM (für CeCHT). Angegeben sind die prozentualen arithmetischen Mittel und Streubreiten der Restaktivitäten der Chitinasen nach 10 min Inkubation mit dem Hemmstoff. Die Substratkonzentration betrug 25 μM .

3.4.2.3 Einfluss von Salzzusätzen auf die Hemmung von Chitinase durch ICAV1

Die Synthese von Peptiden am Harz führt zu lyophilisierten Peptidmengen, denen teilweise Zusätze, u. a. Trifluoressigsäure (TFE), beigemischt sein können. Der Einfluss solcher Salze auf die Chitinasehemmung durch ICAV1 sollte untersucht werden, in dem Chitinaserestaktivitäten nach Inkubation mit Peptidinhibitoren bei verschiedenen Konzentrationen von TFE gemessen würden. Abb. 3-17 zeigt, dass TFE in Konzentrationen von 1 bis 5 mM die Hemmung von Chitinase durch ICAV1 deutlich vermindert. Ähnliches wurde auch für ICAV2 mit NaCl-Zusätzen beobachtet (nicht gezeigt). Bei höheren Ionenkonzentrationen nimmt die hydrolytische Aktivität der Chitinase an sich ab, wobei pH-Wertschwankungen als Ursache dieser Aktivitätsabnahme ausgeschlossen werden konnten (siehe auch Kapitel 3.3.2)

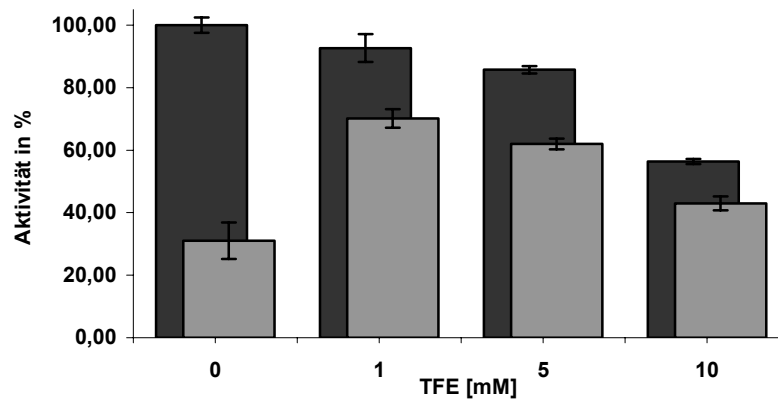


Abbildung 3-17: Einfluss von Trifluoressigsäure (TFE) auf die Hemmung von *A. viteae* Chitinase durch ICAV1. Dargestellt sind prozentuale arithmetische Mittel und Streubreiten der Restaktivitäten nach 10 min Inkubation mit (hellgrau) und ohne (dunkelgrau) 75 µM Peptidzusatz bei Trifluoressigsäurekonzentrationen von 0 - 10 mM. Eingesetzt wurden 25 µM Chitotriosesubstrat. Die Hemmung von Chitinase durch ICAV1 wird mit steigender TFE-Konzentrationen deutlich verringert, in geringerem Maße gilt dies auch für die Chitinaseaktivität selbst. Der messbare Hemmeffekt sinkt TFE-konzentrationsabhängig.

3.4.2.4 Bestimmung des K_i -Wertes mit *A. viteae* Chitinase

Die Bestimmung des K_i -Wertes erfolgte bei Inhibitorkonzentrationen von 5 bis 180 µM, zur Verringerung des Fehlerwertes bei der nichtlinearen Regression wurde bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen. Der kalkulierte K_i -Wert lag mit $9,8 \pm 0,8$ µM im unteren mikromolaren Bereich, die Hemmung war kompetitiv (Abb. 3-18).

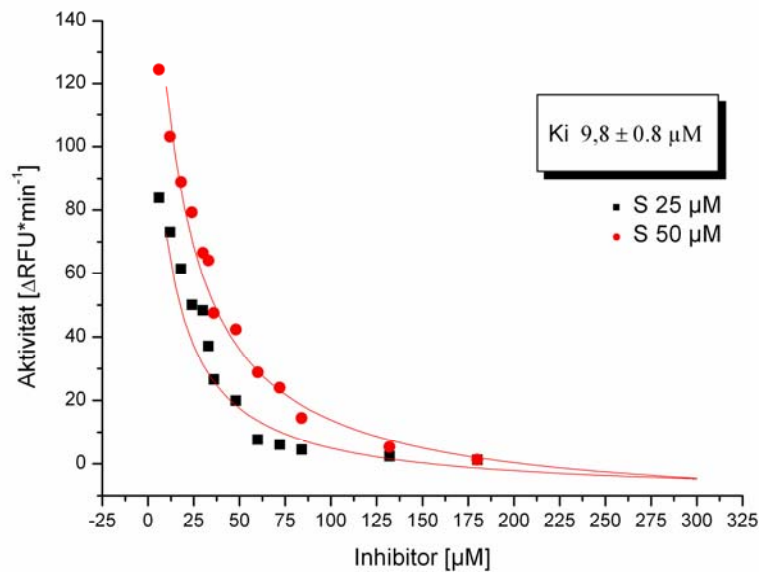


Abbildung 3-18: K_i -Wertbestimmung von ICAV1 mit *A. viteae* Chitinase. Das Fluoreszenzsubstrat UMB-Chitotriose wurde mit 25 bzw. 50 μM Konzentration eingesetzt. Die Hemmung ist kompetitiv, der durch nichtlineare Regression unter Annahme eines K_M -Wertes von 130 μM bestimmte Wert lag im unteren mikromolaren Bereich (RFU = *Relative Fluorescence Units*).

3.4.2.5 Substitutionsanalyse mittels Alanin-walk

Die Bestimmung inhibitorischer Schlüsselpositionen einzelner Aminosäuren innerhalb eines Peptides sollte durch einen Alanin-walk erfolgen. Dabei sollten alle Aminosäuren einzeln gegen Alanin ausgetauscht und die resultierenden Hemmaktivität der Peptide gemessen werden. Starker Verlust von Hemmungspotential sollte für die Hemmung bedeutsame Aminosäuren aufzeigen. Positionen, deren Austausch - verglichen mit dem Wildtyppeptid - zu gleicher oder besserer Hemmung führen, wären möglicherweise noch optimierbar. Die SPOT-synthetisierten Peptidmutanten (Synthese: Dr. R. Volkmer, Institut für Immunologie, HU Berlin) wurden dafür von Zellulosemembranen abgelöst und mit 25 μM Substrat in fluorimetrischen Messungen auf ihre Hemmungsaktivität hin untersucht (Abb. 3-19). Dabei wurde deutlich, dass es nur beim Austausch von Prolin in Position 3 und Lysin in Position 5 zu Alanin (P3A bzw. K5A) nicht zu einem deutlichen Anstieg der Restaktivität kam. Wie erwartet führte die Linearisierung des Peptides durch Substitution der flankierenden Cysteine durch Alanin zu einem völligen Verlust der Hemmung.

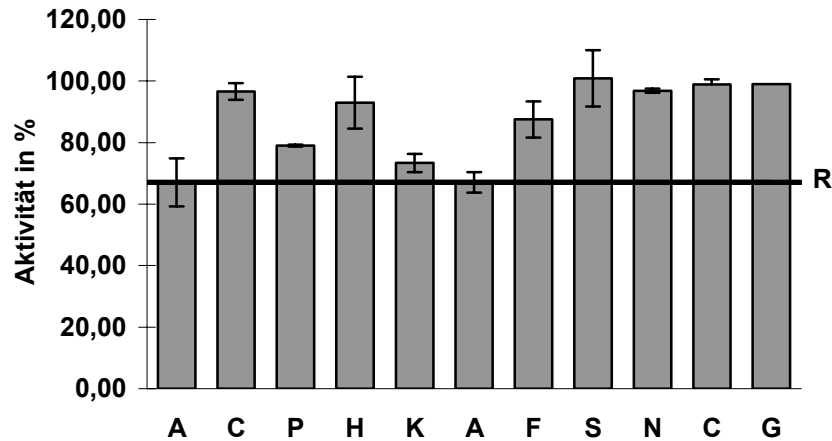


Abbildung 3-19: Alanin-walk von ICAV1 mit *A. viteae* Chitinase. Dargestellt sind prozentuale arithmetische Mittel und Streubreiten der Chitinase-Restaktivität nach 10 min Inkubation mit 25 µM Peptiden. Die durch Alanin substituierten Aminosäuren wurden im Einbuchstabenkode, das Wildtyppeptid als Referenzlinie (R) angegeben.

3.4.2.6 Komplexe Substitutionanalyse mittels membrangebundener Peptid-SPOTS

Eine Möglichkeit, auf Zellulosemembranen fixierte peptidische Substitutionsbibliotheken gegen ein Zielmolekül zu screenen, besteht in der Erfassung der Affinität der einzelnen Peptid-SPOTS zum Enzym. Die vorliegende chemische Bibliothek war als komplexe Substitution aller 11 Aminosäuren von ICAV1 gegen alle anderen jeweils 19 Aminosäuren angelegt worden, es ergaben sich also $11 \times 20 - 10 = 210$ Peptidvarianten (inkl. Wildtyp). Zum Studium der Bindung von Chitinase an Peptide sollte die peptidtragende, geblockte Zellulosemembran mit Chitinase inkubiert werden, nicht gebundenes Enzym abgewaschen und die Membran anschließend mit Peroxidase-gekoppelten α -poly-Histidin-Antikörper (Seramun) inkubiert werden. Die Detektion der mit einem Hexahistidin-Tag versehenen Chitinase sollte sekundär mittels Peroxidasesubstrat (TMB prec) erfolgen. Nun sollten semiquantitativ Interaktionsmechanismen von Inhibitorpeptid und *A. viteae* Chitinase analysiert und einzelne Aminosäurepositionen auf ihre Bedeutung für die Hemmung untersucht werden. Da jedoch das Chitinasefragment trotz fehlender Chitin-Bindungsdomäne stark an die Trägermembran aus Zellulose gebunden wurde, konnte aufgrund des zu hohen Hintergrundsignals keine eigentliche Bindung detektiert werden. Eine Bindung des Antikörpers an die Membran konnte durch eine Negativkontrolle ohne Enzymzugabe ausgeschlossen werden.

3.4.2.7 Peptid-Arrays

Die Fortsetzung des beschriebenen Weges der komplexen Substitution, nun unter Ausschluss des Störfaktors „Zellulosemembran“, sollte durch eine Analyse von Hemmungseffekten abgelöster

Peptid-SPOTS erfolgen. Die Ablösung der Peptide und die Messungen mit UMB-Chitotriose erfolgten wie beschrieben im 96-well-Format in einer Glasplatte. Die gefundenen Messwerte identischer Peptidansätze wiesen starke Streuungen der Aktivitätsangaben auf. Daraufhin wurden sowohl das Pipettierschema und die benutzten Pipetten (Mehrkanal- bzw. Einzelpipetten) variiert als auch die Inkubationszeit und die zyklischen Schüttelungen während der Messung verändert. Eine signifikante Bestimmung etwaiger Hemmungen war durch weiterhin zu starke Streuungen der Mehrfachwerte nicht möglich. Abschließend konnten mittels der komplexen Substitutionsanalyse keine verwertbaren Ergebnisse gewonnen werden.

3.4.2.8 Arginin-walk

Da mittels komplexer Substitutionsanalyse keine eindeutigen Aussagen zu für die Hemmung wichtigen oder optimierbaren Aminosäurepositionen möglich waren, wurde ein Arginin-walk -schrittweiser Austausch aller Aminosäuren der Peptidsequenz gegen Arginin – durchgeführt. Die Substitution gegen Arginin wurde gewählt, da peptidische Chitinaseinhibitoren häufig Arginin, meist in strukturell nachgewiesenen wichtigen Positionen, aufweisen (Izumida et al., 1996a; Houston et al., 2002a, 2004). Es wurden dafür Peptid-SPOTS wie beschrieben von einer Zellulosemembran eluiert und 25 μM in Fluoreszenzassays unter Verwendung von 25 μM UMB-Chitotriose und 0,0375 $\mu\text{g/ml}$ *A. viteae* Chitinase eingesetzt. Bei der Auswertung konnte kein Austausch zu einer verstärkten Hemmung führen (Abb. 3-20); auch der Austausch von Lysin durch Arginin führte – anders als erwartet – zur Abnahme der Hemmung.

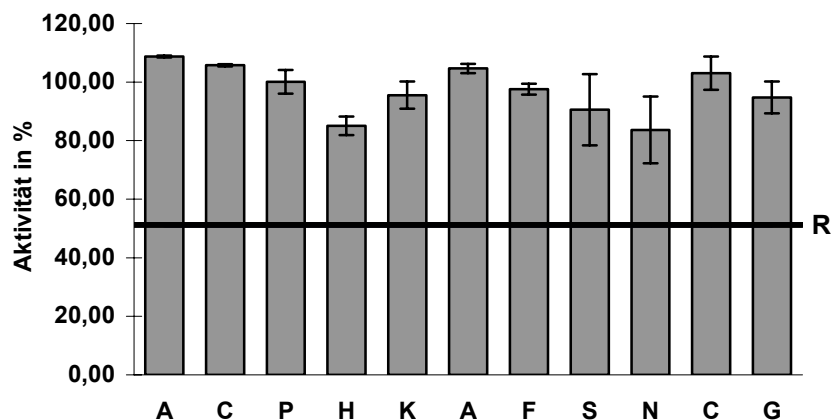


Abbildung 3-20: Arginin-walk von ICAV1 mit Chitinase aus *A. viteae*. Dargestellt sind prozentuale arithmetische Mittel und Mittelwertabweichungen der Chitinase-Restaktivitäten nach 10 min Inkubation mit 25 μM Peptiden. Die durch Alanin substituierten Aminosäuren wurden im Einbuchstabenkode, das Wildtypepeptid als Referenzlinie (R) angegeben. Kein Austausch konnte die Hemmung von Chitinase verstärken.

3.4.2.9 Weitere Substitutionen und Hybrid-Squash-Inhibitor

Um möglicherweise doch zu Aussagen über die Bedeutung einzelner Aminosäurepositionen von ICAV1 zu gelangen und daraus einen optimierten peptidischen Chitinaseinhibitor ableiten zu können, wurden einzelne Aminosäurepositionen gegen andere, den Charakter der Wildtypamino­säure entweder verstärkende oder umkehrende Aminosäuren ausgetauscht. Die notwendigen Peptide wurden von der sie tragenden Zellulosemembran wie beschrieben abgelöst und in 25 µM Konzentration wie dargestellt in fluorimetrischen Einzelaktivitätsuntersuchungen eingesetzt. Abb. 3-21 zeigt zusammenfassend eine komplexe Substitutionsmatrix des Peptides, wobei nicht alle Mutanten im Fluorimeter gemessen wurden.

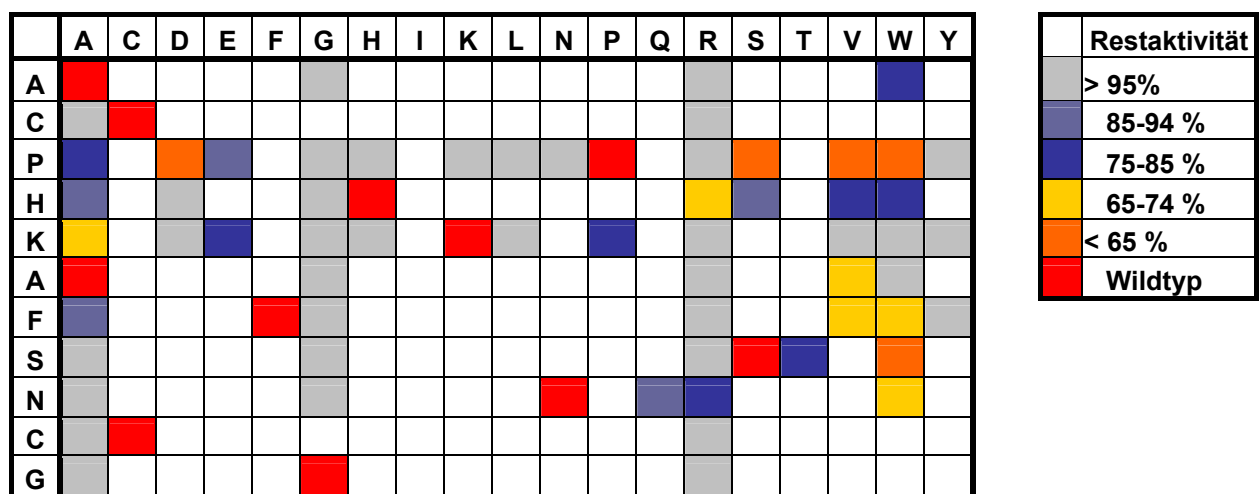


Abbildung 3-21: Komplexe Substitution von ICAV1. Schematische Darstellung der gemittelten Restaktivitäten von Chitinase aus *A. viteae* nach 10 min Inkubation mit 25 µM der einzelnen Peptide. Die Substitution erfolgte schrittweise, wobei die Wildtypamino­säure in Spalte 1 und die jeweils substituierte Aminosäure in Zeile 1 der Matrix zu finden sind. In der Legende ist die Farbkodierung der Restaktivitäten zu finden. Nicht auf ihre Hemmung untersuchte Mutanten sind weiß dargestellt. Die Konzentration von Chitotriosesubstrat betrug 25 µM.

Es konnte kein Austausch gefunden werden, der zur Verbesserung der Chitinaseinhibition führte, gleichwohl hemmten einige Mutanten die Chitinase in ähnlichem Ausmaß (orange) wie das Wildtyppeptid ICAV1 (rot). Dies trifft insbesondere auf Mutanten mit Substitution des Pro3 und Substitutionen gegen hydrophobe Aminosäuren wie Tryptophan oder Valin zu. Mögliche strukturelle Hinweise zu Ursachen der gefundenen Ergebnisse bleiben zu diskutieren.

Desweiteren wurde ein synthetisiertes Fusionspeptid aus ICAV1 und einem *Squash*-Inhibitor auf seine Hemmfähigkeit hin untersucht. *Squash*-Inhibitoren gehören zu einer Familie von mehr als 40 Proteaseinhibitoren aus dem Samen von *Curcubitaceae* (engl. *squash*), die nur 27–34 Aminosäuren lang sind und durch drei Disulfidbrücken verknüpft werden. Sie gelten als

proteaseresistent und hitze- sowie säurefest (Otlewski & Krowarsch, 1996) und enthalten einen variierbaren *loop* (Hilpert et al., 2003).

Der Inhibitor EETI II aus der Gurke *Ecballium elaterium* (Originalsequenz: **GCPRILMRC** KQSDCLAGCVCGPNGFCG) wurde mit ICAV1 fusioniert, in dem der den *loop* bildende Sequenzanteil des Inhibitor (**fett** dargestellt) durch ICAV1 ersetzt worden war. Dieses Hybridpeptid wurde mit 75 μM im Aktivitätstest eingesetzt, es konnte jedoch keinerlei Aktivitätsverlust der Chitinase beobachtet werden konnte.

3.4.3 Charakterisierung und Optimierung von Peptid ICAV2

Das Screening der zyklischen Heptapeptidbibliothek mittels Phagendisplay erbrachte neben ICAV1 die Sequenz eines weiteren, im Vorversuch hemmenden Peptides, ICAV2, welches durch Mutation eines der Cysteine des Peptides zu Tyrosin keine zyklische Struktur aufweist. Mögliche Ursachen für diese Mutation bleiben zu diskutieren. Die Sequenz des Gesamtpeptides lautete AYLQHPTKTCG.

3.4.3.1 SH-Gruppenbestimmung mittels Ellmanns'-Reagenz (DTNB)

Zur Kontrolle des Peptides auf etwaige intermolekulare Disulfidbrückenbildung erfolgte mittels Ellmanns'-Reagenz (DTNB) eine Bestimmung freier SH-Gruppen. Die reduzierende Wirkung freien SHs von ICAV2 konnte dabei wie berechnet nachgewiesen werden (> 99 % reduzierendes Peptid).

3.4.3.2 Überprüfung der Spezifität

Die Kontrolle der Spezifität des gefundenen Inhibitorpeptides erfolgte mittels Chitinasen der Glycosylhydrolase-Familien 18 (AvCHT1; SmCHT A,B,C, OvCHT1, PfCHT1, BmCHT1) sowie 19 (CeCHT). Das Peptid wurde in einer Konzentration von 75 μM (Familie 18 Chitinasen) bzw. 180 μM (Familie 19 Chitinase) eingesetzt. Die Spezifitätsuntersuchung zeigte, dass nicht nur *A. viteae* Chitinase, sondern auch Chitinase aus *B. malayi* durch ICAV2 gehemmt werden konnte (Abb. 3-22), wobei die Hemmung deutlich geringer ($64,34 \pm 0,82 \%$) ausfiel. Für alle weiteren untersuchten Enzyme konnte keine eindeutige Hemmung beobachtet werden.

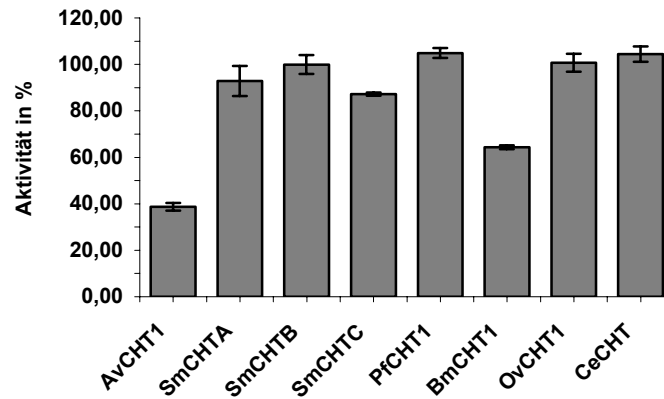


Abbildung 3-22: Spezifität des Inhibitors ICAV2. Die Spezifitätskontrolle erfolgte mit Chitinasen aus *A. viteae*, *S. marcescens*, *P. falciparum*, *B. malayi*, *O. volvulus* und *C. ensiformis* bei einer Inhibitorkonzentration von 75 μM bzw. 180 μM (für CeCHT). Angegeben sind die prozentualen arithmetischen Mittel und Streubreiten der Restaktivitäten der Chitinasen nach 10 min Inkubation mit dem Hemmstoff.

3.4.3.3 Bestimmung des K_i -Wertes mit *A. viteae* Chitinase

Die Bestimmung des K_i -Wertes erfolgte bei Inhibitorkonzentrationen von 5 bis 180 μM , die Konzentration des Chitinasefragment betrug 0,02 $\mu\text{g/ml}$. Auch hier wurde zur Verringerung des Fehlerwertes bei der nichtlinearen Regression mit 25 bzw. 50 μM UMB-Chitotriose gemessen. Der kalkulierte K_i -Wert lag mit $12,7 \pm 2,4$ μM im Grenzbereich unterer mikromolarer Konzentration, die Hemmung war kompetitiv (Abb. 3-23).

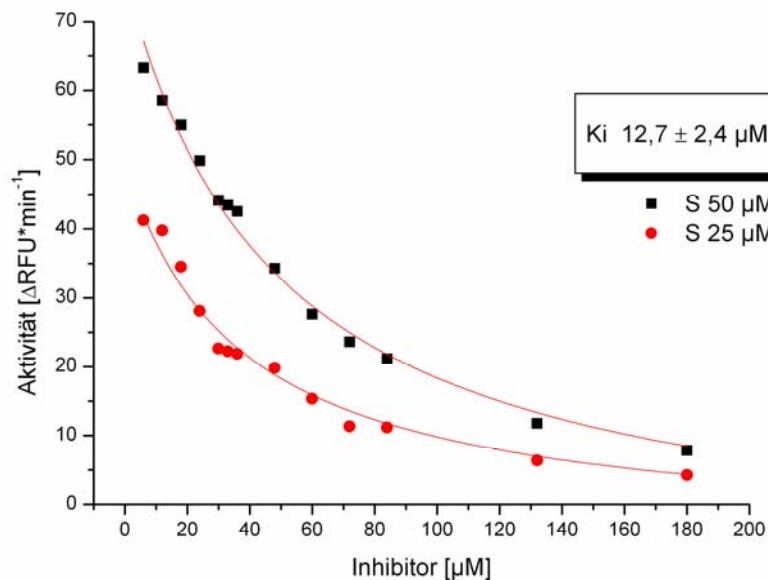


Abbildung 3-23: K_i -Wertbestimmung von ICAV2 mit *A. viteae* Chitinase. Das Fluoreszenzsubstrat UMB-Chitotriose wurde mit 25 bzw. 50 μM , das Enzym mit 0,02 $\mu\text{g/ml}$ Konzentration eingesetzt. Die Hemmung ist kompetitiv, der durch nichtlineare Regression unter Annahme eines K_M -Wertes von 130 μM bestimmte Wert betrug ca. 13 μM (RFU = *Relative Fluorescence Units*).

3.4.3.4 Bestimmung des K_i -Wertes mit *B. malayi* Chitinase

Das aufgefundene inhibitorische Peptid hatte im Spezifitätstest eine mäßig ausgeprägte Hemmung von Chitinase aus *B. malayi* gezeigt. Zur Quantifizierung dieser inhibitorischen Potenz erfolgte eine K_i -Wertbestimmung. ICAV2 wurde dabei in einer Konzentration von 6 - 150 μM und *B. malayi* Chitinase I mit 12,5 U/l eingesetzt. Die UMB-Chitotriosekonzentration betrug 12,5 bzw 25 μM , der Einsatz verschiedener Substratkonzentrationen diente wiederum einer korrekteren nichtlinearen Regression. Der aufgefundene K_i -Wert beträgt $60 \pm 5 \mu\text{M}$; die Hemmung war kompetitiv (Abb. 3-24).

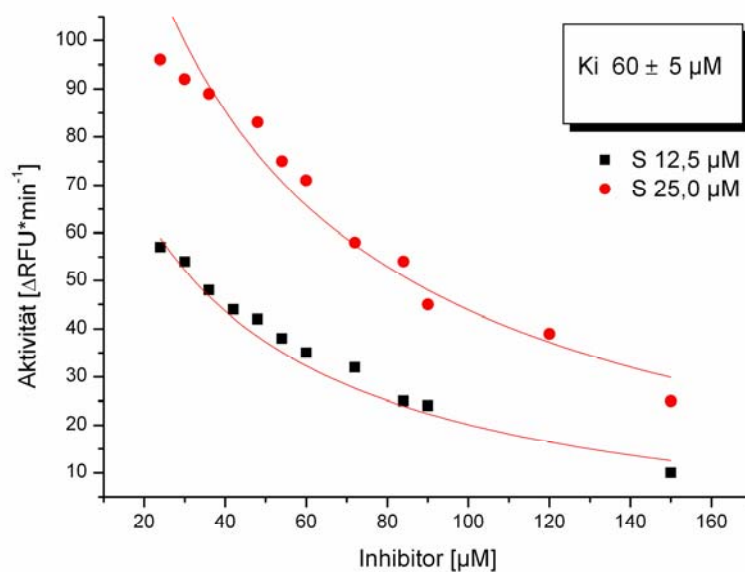


Abbildung 3-24: K_i -Wertbestimmung von ICAV2 mit *B. malayi* Chitinase. UMB-Chitotriose wurde mit 12,5 bzw. 25 μM Konzentration eingesetzt, die Chitinasekonzentration betrug 12,5 U/l. Die Hemmung war kompetitiv, der durch nichtlineare Regression bestimmte Wert betrug ca. 60 μM (RFU = *Relative Fluorescence Units*).

3.4.3.5 Substitutionsanalyse mittels Alanin-walk

Auch für ICAV2 sollten durch schrittweisen Austausch aller Aminosäuren der Peptidsequenz durch Alanin Schlüsselpositionen für die Hemmung von Chitinase aus *A. viteae* bestimmt werden. Die Konzentration der auf ihre Hemmungsaktivität im Fluoreszenzassay untersuchten Inhibitoren betrug 75 μM . Es konnte gezeigt werden, dass alle Austausche zur deutlichen Abnahme der Hemmung führten (Abb. 3-25).

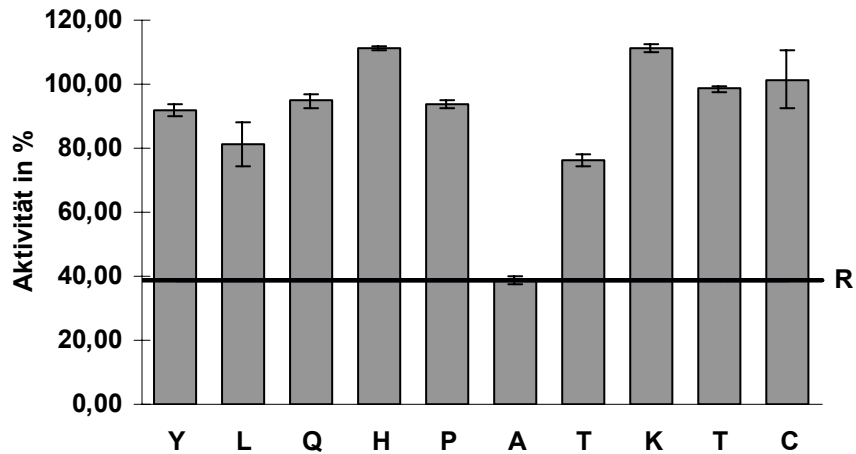


Abbildung 3-25: Alanin-walk von ICAV2 mit *A. viteae* Chitinase. Dargestellt sind prozentuale arithmetische Mittel und Streubreiten der Restaktivitäten nach 10 min Inkubation mit 75 μ M Peptid, wobei die jeweils durch Alanin substituierte Aminosäuren im Einbuchstabenkode sowie das Wildtypepeptid als Referenz (R-Linie) angegeben sind. Die Chitotriosekonzentration betrug 25 μ M.

Um die Charakterisierung der Wirkung des Peptids ICAV2 auf Chitinase aus *B. malayi* fortzuführen, wurde auch hier ein Alanin-walk durchgeführt (Abb. 3-26). Die Konzentration von ICAV2 betrug dabei 75 μ M, UMB-Chitotriose wurde mit 25 μ M eingesetzt. Die Chitinasekonzentration betrug 12,5 U/l. Auch hier führten alle Austausch zu deutlichen Abnahme der Hemmung.

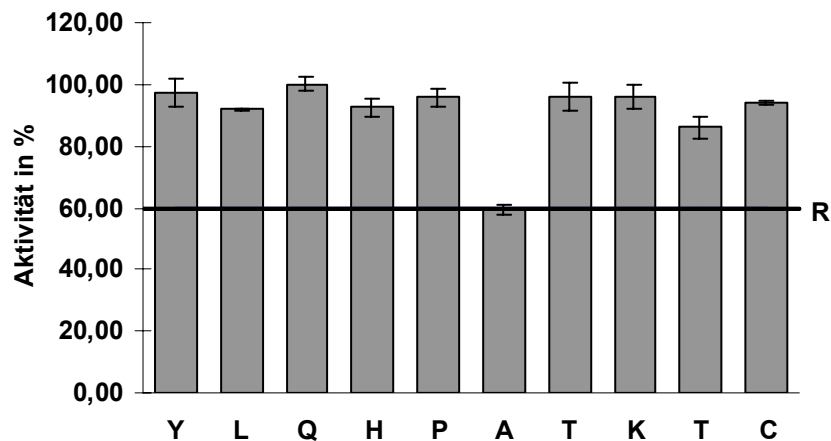


Abbildung 3-26: Alanin-walk von ICAV2 mit *B. malayi* Chitinase I. Dargestellt sind prozentuale Mittelwerte und Streubreiten verbleibender Chitinaseaktivitäten nach 10 min Inkubation mit 75 μ M Peptiden. Die durch Alanin substituierte Aminosäure wurde im Einbuchstabenkode sowie das Wildtypepeptid als Referenz (R-Linie) angegeben. Die Konzentration des Substrat bzw. Chitinase aus *B. malayi* betrug 25 μ M bzw. 12,5 U/l.

4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit gliederte sich vornehmlich in drei Versuchskomplexe:

- (a) Zunächst sollte Chitinase aus *A. viteae* rekombinant exprimiert, präpariert und gereinigt werden, um anschließend wichtige kinetische Parameter charakterisieren zu können.
- (b) Um peptidische Inhibitoren dieser Chitinase aufzufinden, sollten aus verschiedenen molekularen Bibliotheken mittels Phagendisplay Binder gegen das Enzym selektiert werden. Durch kompetitive Elution mittels spezifisch am aktiven Zentrum angreifender Substanzen (Substrate und substratanaloge Hemmstoffe) sollten nur Peptide, welche ebenso am aktiven Zentrum binden, aufgefunden werden. Dadurch sollte einerseits eine mögliche Hemmwirkung, andererseits eine hohe Spezifität der Peptide für *A. viteae* Chitinase abgesichert werden. Zudem sollten durch spezifische Elution und dem Selektionsprozess vorgeschaltete Prepannings Phagen, welche an Kunststoffoberflächen oder an das u. a. verwendete Streptavidin binden, ausgeschlossen werden. Auf der Grundlage der durch Phagendisplay und anschließende Sequenzierungen gefundenen Aminosäuresequenzen sollten isolierte Peptide synthetisiert und auf mögliche Hemmwirkungen gegenüber *A. viteae* Chitinase überprüft werden.
- (c) Aufgefundene Inhibitoren sollten schließlich in Inhibitionsquantität (K_i) und –qualität (Spezifität) charakterisiert werden. Insbesondere letzteres (spezifische Hemmung einer bestimmten Chitinase) war hinsichtlich der teilweise bereits geschilderten, weit verbreiteten Bedeutung von Chitinasen, u. a. auch im menschlichen Organismus, ein entscheidendes Kriterium. Anschließend sollten Analysen zur Bedeutung einzelner Aminosäuren innerhalb des Peptides stattfinden, wobei gleichzeitig höheraffine Inhibitoren (so vorhanden) aufgefunden worden wären. Dazu sollte zunächst ein Alanin-walk durchgeführt werden, d. h. ein schrittweiser Austausch aller Aminosäuren des jeweiligen Peptides durch Alanin und Analyse dieser Substitutionspeptide auf Hemmung. Desweiteren sollten komplexe Substitutionsuntersuchungen stattfinden, wobei nacheinander alle Peptidaminosäuren gegen alle natürlichen Aminosäuren ausgetauscht würden, und diese permutierten Peptide ebenso auf Hemmung von Chitinase untersucht würden. Letzteres Verfahren sollte auf der Basis von SPOT-synthetisierten Peptiden, welche auf Zellulosemembranen fixiert wurden, stattfinden.

Zur Diskussion der genutzten Methodiken und aufgefundener Ergebnisse sollen diese drei Komplexe beibehalten werden.

4.1 Expression und Charakterisierung von *A. viteae* Chitinase

Chitinasen der GH-18 Familie, zu der sequenzanalytisch auch die Chitinase aus *A. viteae* gehört, sind Mitglieder der erwähnten TIM-barrel-Proteinfamilie, welche vor allem bei Enzymen, überwiegend Hydrolasen wie Amylasen oder Glycosylhydrolasen, gefunden wird (Nagano et al. 2001). Für die in dieser Arbeit verwendete Chitinase ist bisher keine experimentell ermittelte Struktur bekannt, ausgehend von der Aminosäuresequenz ist jedoch die anfangs beschriebene Domänenstruktur vorauszusetzen (Tachu, 2006).

Zur Gewinnung von Chitinase stehen grundsätzlich zwei Wege zur Verfügung - entweder die direkte Isolierung nativen Enzymproteins aus dem Produzenten (*A. viteae*) oder eine rekombinante Expression des Chitinasegens. Ersterer Weg war aufgrund des problematischen Zuganges zu Filarien und der nur geringen gewinnbaren Menge nicht gangbar. Daher fiel die Entscheidung zugunsten einer rekombinanten Expression, wobei als Expressionsvektor *E. coli* vorgesehen war. Da Bakterien teilweise über eigene Chitinase oder chitinaseähnliche Enzyme verfügen, kann die Überexpression bakterienfremder Chitinaseproteine zu Interferenzen zwischen Produkt und Produzent führen. Insgesamt gilt die heterologe Expression löslicher parasitärer (Nematoden, Leishmanien) Chitinasen in Bakterien als schwierig (Southworth et al., 1996; Razek-Desoukey et al., 2001, Tachu, 2006). Die bekannten Konzepte zur Erhöhung der löslichen Gesamtexpressionsmenge, u. a. Temperaturreduktion (Razek-Desoukey et al., 2001), Variation der Expressionsvektoren (Vinetz et al., 1999) und Expression von Proteinfragmenten (Southworth et al. 1996), speziell der Verzicht auf die disulfidhaltige Chitinbindungsdomäne, die auf die Katalyse niedermolekularen Substrates keinen Einfluss hat, wurden bei der vorliegenden Arbeit genutzt. Alternativ dazu wären z. B. Hefezellsysteme oder Expression in Insektenzellen mittels Bakuloviren in Frage gekommen.

Die Chitinase I aus *A. viteae* sollte unter Nutzung eines durch Prof. Dr. R. Lucius (Institut für Parasitologie, HU Berlin) freundlichst überlassenen Konstruktes als enzymatisch aktives und um die Chitinbindungsdomäne verkürztes Fragment im periplasmatischen Kompartiment exprimiert werden. Das dort herrschende oxidative Milieu begünstigt die Ausbildung von Disulfidbrücken, wodurch ein höherer Anteil nativ gefalteter und somit enzymatisch aktiver Chitinaseproteine realisiert werden soll (Tachu, 2006). Die Unabhängigkeit der N-terminalen katalytischen Domäne hinsichtlich Faltung und hydrolytischer Funktion ist bekannt (Arakane et al., 2003; Synstad et al., 2004). Eine Isolierung von Chitinase aus der periplasmatischen Proteinfraction

war mittels Affinitätsreinigung unter Nutzung des C-terminalen His-tags des Enzyms möglich. Die gewonnene Gesamtmenge enzymatisch aktiven, löslichen Proteins genügte für die geplanten Versuche, ist jedoch für Kristallisationsversuche und anschließende Röntgenkristallanalyse nicht ausreichend. Die genannten, für Chitinase optimierten Expressionssysteme könnte hier Fortschritte bringen.

Zusammenfassend sollen Daten von Chitinasen aus *A. viteae*, *S. marcescens*, der Humanen Chitotriosidase und einer pflanzlichen Chitinase aus der Süßkartoffel, *Dioscorea opposita*, hinsichtlich Molekulargewicht, Substratspezifität, Kinetik und Allosamidineinfluss in tabellarischer Form verglichen werden (Tab. 4-1). Die verwendete Filarien Chitinase liegt hinsichtlich des Molekulargewichtes (ca. 44 kDa) sowie der für kurzkettige *N*-Acetylzuckersubstrate ermittelten Michaelis-Menten-Konstante ($K_M \approx 130 \mu\text{M}$) innerhalb der erwarteten Größenordnungen. Die nur geringe beobachtete Hydrolyse hochmolekularen Substrates wie carboxymethyliertes Chitin ist wahrscheinlich auf die nicht vorhandene Chitinbindungsdomäne zurückzuführen. Die für die Filarien Chitinase gezeigte relativ hohe Spezifität für UMB-Chitotriose im Vergleich zur Katalyse von UMB-Chitobiose findet sich so nur bei der Chitinase aus der Süßkartoffel wieder, ist aber auch für andere Chitinasen festgestellt worden (Vinetz et al., 1999). Die bakteriellen Chitinasen zeigen ebenso wie die humane Chitotriosidase ein deutlich geringeres Spezifitätsverhalten, was wahrscheinlich auf sterische Effekte zurückzuführen ist. Die möglicherweise zugrundeliegenden, räumlichen Strukturmerkmale der Enzyme lassen sich klassifizieren, sind aber nicht für alle unten aufgeführten Chitinase untersucht worden, und sollen an anderer Stelle diskutiert werden.

Tabelle 4-1: Vergleichende Darstellung enzymologischer Daten verschiedener Chitinasen. Verglichen wurden verschiedene Chitinasen (siehe Text) hinsichtlich GH-Familie, Molekulargewicht, Chitobiosid-/triosidspezifität, Hydrolyse hochmolekularen Substrates, K_M und k_{cat} sowie Allosamidineinfluss auf die katalytische Aktivität.

Enzym	GH-Fam.	MW (kDa)	pH-Optimum	Ratio* Bio/Triosid	Chitin* [§] - hydrolyse	K_M (μM)	k_{cat} (sec^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{sec}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$)	K_i Allosamidin*	Referenz
AVCHT1	18	44	7,0-8,0	0,08	+	130 [‡]	8,74 [‡]	14,87	2,38 nM	diese Arbeit
SMCHTA	18	60	5,0-6,0	1,0	+++	59 [Ⓛ]	35 [Ⓛ]	1,68	n.b.	[1], [2], [3], [8]
SMCHTB	18	50	4,0-5,0	n.b.	+++	30 [Ⓛ]	14,9 [Ⓛ]	2,01	340 nM	[4]; [5]; [6] [7]
HCHT	18	50	7,0	0,7	++	50 [#]	n.b.	n.b.	0,4 μM	[3], [5], [7]]
DOCHTE	19	n.b.	4,0; 7,5	0	n.b.	880 [‡]	0,044 [‡]	200.000	n.b.	[9]

* variable Bedingungen; [§] bzw. Chitosan/CM-Chitin usw.; [‡] UMB-Chitotriose, pH $\approx 7,25$ [Ⓛ] UMB-Chitobiose, pH 6; [#] UMB-deoxy-Chitobiose, pH $\approx 5,6$; n.b. nicht bestimmt; [1] Vaaje-Kolstad et al., 2004 [2] Brurberg et al., 1996; [3] Renkema et al., 1995; [4] Houston et al., 2002a; [5] Rao et al., 2003; 2005; [6] Suzuki et al., 2002; ; [7] Boot et al., 2001; [7] Synstad et al., 2004; [8] Honda et al., 2004; [9] Koga et al., 1989

4.2 Auffinden potentieller Chitinaseinhibitoren aus molekularen Bibliotheken

Die vorliegende Arbeit stützte sich bei der Auffindung einzelner inhibitorischer Peptide aus molekularen Bibliotheken auf zwei Methodiken, denen ein gemeinsames Ziel, aber unterschiedliche Prinzipien zugrunde liegen: Zum einen sollten mittels Phagendisplay bindende Peptide aus einem Pool selektiert werden, zum anderen sollten mittels verschiedener Screens solche individuellen Peptide auf Hemmwirkungen gegenüber Chitinase getestet und optimiert werden. Das biologische *Selektions*system wird somit durch das chemische *Screenings*system ergänzt.

Selektion mittels Phagendisplay

Warum wurde gerade mittels Phagendisplay versucht, peptidische Inhibitoren von Chitinase aufzufinden, und weshalb kamen die hier beschriebenen Phagenbibliotheken zum Einsatz?

Zum einen waren zurückliegende Versuche, Chitinasehemmstoffe auf Basis von Strukturvoraussagen zu finden, oftmals nicht erfolgreich (Petter, 2006). Es war zudem bekannt, dass Inhibitoren ihre Enzymhemmung durch teilweise stark unterschiedliche Mechanismen realisieren (Hyde-DeRuyscher et al., 2000). Die strukturell denkbaren Möglichkeiten von Peptid-Enzyminteraktionen sind demnach immens vielfältig. Die Methodik des Phagendisplay ist gerade deshalb geeignet, Binder und potentielle Inhibitoren aufzufinden, weil sie durch ihre enorme Bibliotheksgröße viele dieser Möglichkeiten nachbilden kann, und dabei auf *a priori* Aussagen über Sequenz oder dreidimensionale Struktur der Liganden oder des Zielmoleküls verzichtet. So wird es möglich, die Plastizität von Binder und *Target* ebenso wie viele topologische Variabilitäten zu nutzen.

Die Vorteile bei der Nutzung eines Fusionssystems mit dem Oberflächenprotein pIII des Phagen sind bereits zur Sprache gekommen. Stark polyvalent präsentierte Peptide, beispielsweise durch Fusion mit pVIII, können höhere Affinitäten durch „Aviditätseffekte“ vortäuschen (Cwirla et al., 1990). Typischerweise zeigen Peptide, welche aus pIII-Bibliotheken isoliert wurden, Dissoziationskonstanten im unteren mikromolaren Bereich, wohingegen Peptide, isoliert aus pVIII-Bibliotheken, oftmals Dissoziationskonstanten zwischen 10-100 μM aufweisen. (Kay et al., 2001).

Die Nutzung zweier verschiedener Peptidvarianten (disulfidzyklisiert und linear) sollte zeigen, ob die dargestellte These zum Selektionsvorteil zyklisierter Peptide zutrifft. Als Ursache für die

oftmals beobachteten höheren Affinitäten inflexiblerer, zyklisierter Peptide wird folgendes diskutiert: Peptide, die nur durch Interaktion mit einem Zielmolekül in eine bestimmte Form „gezwungen“ werden, tendieren thermodynamisch eher zur entropisch günstigeren, ungebundenen Form – ihre Affinität sinkt. Lineare Peptide sind deutlich flexibler in ihrer Konformation, die Bindung dieser Peptide an vorgegebene Strukturen führt somit zu diesem ungünstigen Entropieeffekt durch Einschränkung der Konformationsflexibilität. Zyklische Peptide weisen diesen Nachteil durch ihre primär höhere Konformationsstabilität nicht auf. Zum „Ausgleich“ dieses Nachteiles wird bei linearen Binder häufig Prolin (Weber et al., 1992, Clackson & Wells, 1994), aber auch (weniger häufig) Valin oder Isoleucin angereichert (Ladner, 1995), da diese Aminosäuren flexibilitätsvermindernd wirken. Als weitere Vorteile zyklischer Binder werden ihre vom Bakteriophagen unabhängige Struktur, ihre Stabilität unter verschiedenen Umweltbedingungen und ihr besser vorherzusagendes Bindungsverhalten am Zielmolekül gezählt (Ladner, 1995; Cunningham et al., 1994).

Um eine Wertung der gefundenen Ergebnisse hinsichtlich der aufgezeigten Diskussionspunkte sowie eine Beurteilung der genutzten Elutionsmethoden zu ermöglichen, wurden die nach der letzten Panning-Runde aufgefundenen Sequenzen hinsichtlich Aminosäurehäufigkeiten analysiert und dargestellt (Abb. 4-1 und 4-2 für Peptide aus der disulfidzyklisierten Phagenbank, Abb. 4-3 und 4-4 für Peptide aus der linearen Bibliothek).

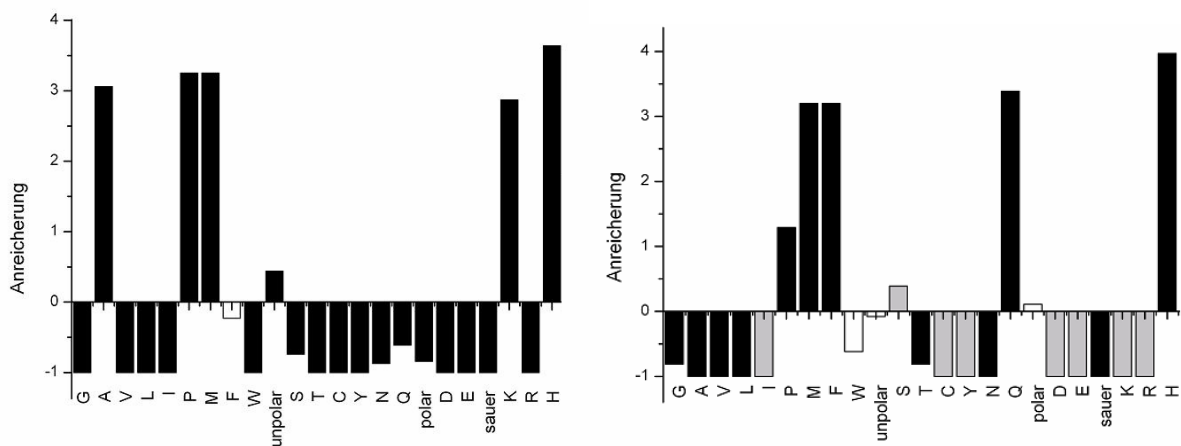


Abbildung 4-1 und 4-2: Anreicherung einzelner Aminosäuren und -gruppen aus der zyklischen Heptapeptidbibliothek nach 3 Selektionsrunden gegen Chitinase und Elution mit Allosamidin (li.) bzw. Chitotriose (re.). Die gefundenen Häufigkeiten wurden mit den erwarteten Aminosäurehäufigkeiten (Herstellerangaben) ins Verhältnis gesetzt und die Abweichungen dargestellt, wobei 0 die erwartete Häufigkeit der jeweiligen Aminosäure präsentiert. Positive Zahlen bedeuten Anreicherung um den Faktor x, negative Zahlen zeigen verringerte Häufigkeiten gegenüber dem erwarteten Vorkommen an (-1 bedeutet demnach, die Aminosäure wurde gar nicht aufgefunden). Der χ^2 -Unabhängigkeitstest wurde zur Ermittlung des Signifikanzniveaus genutzt. Schwarze, graue und weiße Balken repräsentieren >93 %, 75-93 % bzw. <75 % Wahrscheinlichkeit unabhängiger Selektion. Für die zyklische Bibliothek konnte Anreicherung einzelner Aminosäuren, weniger von Aminosäuregruppen gefunden werden. Diese erfolgte in einem überwiegend höheren Signifikanzniveau.

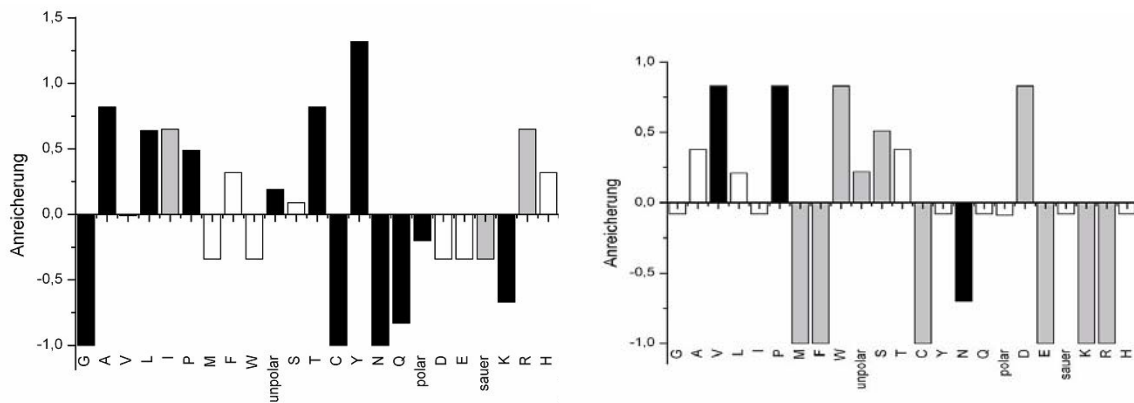


Abbildung 4-3 und 4-4: Anreicherung einzelner Aminosäuren und -gruppen aus der linearen Heptapeptidbibliothek nach 4 Selektionsrunden gegen Chitinase und Elution mit Allosamidin (li.) bzw. Chitotriose (re.). Gefundene Häufigkeiten wurden mit den erwarteten Aminosäurehäufigkeiten (Herstellerangaben) ins Verhältnis gesetzt und die Abweichungen dargestellt, wobei 0 wiederum die erwartete Häufigkeit der jeweiligen Aminosäure präsentiert, deren Anreicherung oder Verringerung gegenüber dieser erwarteten Häufigkeit auf der Ordinate als Faktor angegeben ist. Auch hier wurde der χ^2 -Test zur Ermittlung des Signifikanzniveaus genutzt. Schwarze, graue und weiße Balken repräsentieren >93 %, 75-93 % bzw. <75 % Wahrscheinlichkeit. Die Anreicherung ist weniger ausgeprägt und weniger signifikant als bei der zyklischen Bibliothek.

Zwei Effekte sind deutlich erkennbar: Zum einen sind in zyklischen Peptiden *wenige* Aminosäuren *stark* angereichert worden, was sich u. a. in gezeigten Konsensusmotiven niederschlägt. Zum zweiten sind die beobachteten Häufungseffekte statistisch signifikanter. Die geringere Anreicherung linearer Peptide konnte bereits durch Phagentiterbestimmungen beider Eluate gezeigt werden: Für die zyklische Phagenbank zeigten sich nach einer Festphasenselektion und einem Pulldown-Panning zunächst geringe Regenerationsraten (eluierte Phageneinheiten/ingesetzte Phageneinheiten in Prozent). Für die 3. Bindungsrunde konnte aber durch Anreicherung bereits selektierter Phagen eine höhere Regeneration (8×10^{-4} bzw. 5×10^{-7} %) realisiert werden. Für lineare Peptide war dieser Anreicherungseffekt nicht zu beobachten (Regeneration nach der 4. Runde jeweils 2×10^{-10} %). Die deutlich geringere Anreicherung von Konsensusmotiven in linearen Peptidsequenzen, wie sie in der vorliegenden Arbeit aufgefunden wurde, ist z. B. auch bei phagenbasiertem Display linearer Dodekapeptide gegen bakterielle Muraminsäureligasen dokumentiert worden (Zoeiby et al., 2003). Eine Vorhersage zur Bedeutung etwaiger Disulfidbrückenbildner in peptidischen Proteinbindern ist nicht generell möglich (Hilpert et al, 2003; Sanschagrín & Levesque, 2005) – für Chitinaseinhibitoren scheint aber eine Zyklisierung hinsichtlich gewünschter Konsensusmotive erfolgsversprechender (siehe auch Petter, 2006). Auch die Durchsetzung nur zyklisierter Peptide in der Mischbibliothek unterstützt diesen Befund.

Auffällig ist bei beiden Bibliotheken die Anreicherung von einzelnen Aminosäuren, nicht aber von Aminosäuregruppen. Dies spricht für einen hohen Selektionsdruck, der nicht nur eine bestimmte Eigenschaft, z. B. „Polarität“, sondern eine ganz spezifische, polare Struktur selektiert. Mögliche Ursachen für die Häufung von Prolin in allen, Alanin in fast allen sowie Methionin und Histidin nur in den aus der zyklischen Bank ausgewählten Peptiden sollen z.T. an späterer Stelle diskutiert werden, wobei für Prolin auf die geschilderte Flexibilitätsverminderung hingewiesen sei, welche insbesondere bei linearen Peptiden zur Steigerung der Affinität führen könnte.

Interessant ist das Auffinden eines nicht zyklisierten Binders aus der zyklischen C7C-Bibliothek in der ersten Bindungsrunde, eluiert mit Allosamidin. Hierbei war ein nicht zur randomisierten Sequenz gehöriges Cystein durch ein Tyrosin permutiert worden – laut Herstellerangaben und den gezeigten Kontrollsequenzierungsergebnissen ein seltenes Ereignis. Als Ursache kommen PCR-Fehler in Frage. Dass dieser spezielle Klon aus mehr als 10^9 Varianten ausgewählt wurde, spricht abermals für den hohen Selektionsdruck. In den weiteren Bindungsrunden wurde die Sequenz nicht wieder gefunden – dies muss aber nicht unbedingt ein Ergebnis der Bindungsselektion sein, sondern kann phagenspezifisch geschehen: Einzelne Cysteine werden insgesamt selten selektiert, wenn die Genfusion mit gIII stattfand. Ursächlich dafür sind wahrscheinlich 8 Cysteinreste im pIII-Protein, die mit unpaaren Cysteinen des Displaypeptides Disulfidbrücken bilden können, wodurch Struktur und Infektivität dieser Phagen gestört würde (Kay et al., 1993). Dass dieses gefundene Peptid, anders als die meisten nach 3 oder 4 Bindungsrunden gefundenen Peptide, die Chitinase hemmt, ist ein Hinweis, dass eine Selektion auf Bindung nicht unbedingt die besten Inhibitoren zu Tage fördern muss. Die durchgeführten Untersuchungen zu Bindung mittels Phagen-ELISA und Hemmung mittels Enzymaktivitätstests unterstreichen diese Vermutung – zwischen Affinität und Hemmungswirkung herrscht nicht zwingend ein Zusammenhang.

Die durch die gewählten Elutionsverfahren – einerseits mit Allosamidin, andererseits mit Chitotriose – aufgefundenen Sequenzen zeigen deutlich Unterschiede – möglicherweise, weil Allosamidin und Chitotriose nicht identisch an Chitinase binden und somit auch nicht identische Binder eluieren (Zoeiby et al., 2003). Eine weitere denkbare Ursache wäre die gezeigte, unterschiedlich ausgeprägte Affinität der Moleküle zu Chitinase. Zudem ist für Substrat-basierte Elution eine Hydrolyse des Eluenten denkbar. Dafür spricht, dass mittels Chitotrioseelution

sowohl weniger Phagen angereichert wurden, als auch geringere und weniger signifikante Aminosäurehäufungen erfolgten. Zudem konnte mittels Chitotriose kein Hemmstoff aufgefunden werden.

Screening von SPOT-synthetisierten Substitutionsbibliotheken

Zur Untersuchung gefundener Peptide auf Hemmung von Chitinasen und Bedeutung einzelner Aminosäuren dieser Peptide für die Hemmung wurden Einzelaktivitätsmessungen mit Chitinasen unter Peptideinfluss durchgeführt, z. B. der beschriebene Alanin-walk. Daneben sollten SPOT-synthetisierte Peptide zum Einsatz kommen: Hierbei werden hochparallel Peptide unter Nutzung der Fmoc-Chemie, beginnend mit einem C-terminalen β -Alanin, auf eine Zellulosemembran synthetisiert. Je nach Programmierung des Syntheseautomaten ist dabei z. B. auch die Herstellung einer Peptidmatrix möglich, in der alle Aminosäuren einer bestimmten Sequenz nacheinander durch alle anderen, in diesem Fall natürlichen Aminosäuren ausgetauscht werden. Somit sollten nicht nur für die Hemmung wichtige Positionen der Peptidsequenz identifiziert, sondern auch die Wirkung bestimmter anderer, an diese Positionen gestellten Aminosäuren untersucht werden. Zur Sicherstellung reproduzierbarer Versuchsbedingungen hinsichtlich Peptidcharakter (linear/disulfidzyklisiert) und -konzentration sind Analysen zum Zyklisierungsgrad der Peptide mittels DTNB sowie Konzentrationskontrollen von abgelösten Peptid-SPOTS möglich.

Zur Untersuchung solcher SPOT-synthetisierter Peptide kamen diese einerseits an die Trägermembran gebunden zum Einsatz, andererseits wurden sie wie beschrieben von der Zellulose abgelöst und in Aktivitätsmessungen mit Chitinase eingesetzt. Ersteres Verfahren ist technisch weniger anspruchsvoll, liefert jedoch nur Aussagen über die Bindung von Peptiden an Chitinase. Das Auffinden bindender Peptide führt, wie oben beschrieben, nicht zwingend zu Inhibitoren. Gleichwohl kann auch diese Versuchsanordnung dem Auffinden hemmender Peptide dienen, wie Versuche mit Proteaseinhibitoren zeigen konnten (Hilpert et al., 2000, 2005). Die Verwendung löslicher Proteine gestattet die direkte Untersuchung von Hemmwirkungen, ist jedoch beispielsweise aufgrund des notwendigen Elutionsschrittes fehleranfälliger.

Die Anwendung der SPOT-Peptide gestaltete sich sowohl bei Bindungsuntersuchungen als auch bei Aktivitätsmessungen mit abgelösten Peptiden als schwierig. Eine Ursache dafür waren die

peptidtragenden Zellulosemembranen selbst. Es konnte gezeigt werden, dass Chitinase unspezifisch an der Zellulosemembran haftet. Letztere hat gegenüber anderen Trägermaterialien bestimmte Vorteile, u. a. hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Lösungsmitteln und Säuren während der Peptidsynthese, Haltbarkeit in wässrigen Lösungen, eine (z. B. im Vergleich mit Glasträgern) hohe Peptiddichte und den geringen Herstellungspreis (Hilpert et al., 2007). Die Nachteile solcher Polysaccharidmembranen, wie eben die gefundene unspezifische Bindung von Chitinasen, könnten durch alternative Materialien wie acrylbeschichtetes PTFE oder polystyrenversetztes Polyethylen umgangen werden (Frank, 2002). Auch eine Optimierung der Blockierungsreaktion der Zellulose oder das Aufbringen von verlängerten Alanin-*Linkern* wären möglich. Für die in dieser Arbeit viel wichtigere Untersuchung von Hemmeffekten der Peptide sind diese Optimierungen jedoch nicht zielführend.

Die beschriebene, direkte parallele Aktivitätsuntersuchungen von Chitinasen im Mikrotiterplatten-Photometer führte jedoch ebenfalls nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen. Dafür könnten bekannte Unzulänglichkeiten der Methodik verantwortlich sein, u. a. Inhomogenitäten der Membran (Weiser et al., 2005), verschieden starkes Verdunsten der Flüssigkeit während der 48-stündigen Elution, unterschiedliche Adsorption der gelösten Peptide an die Gefäß- und Pipettenwände und Unterschiede der Peptiddichten auf der Membran. Versuche zur Verwendung chromogener statt fluoreszierender Substrate im Aktivitätsscreen waren ebenso nicht erfolgreich. Als Alternative wurden in der vorliegenden Arbeit wiederum SPOT-synthetisierte Peptide von Membranen abgelöst, zyklisiert und in Einzelmessungen auf etwaige Hemmwirkungen gegenüber Chitinase getestet. Ausgehend vom Alanin-*walk* wurden ausgedehntere Substitutionsuntersuchungen in jenen Positionen vorgenommen, deren Austausch eine Optimierung der Hemmwirkung erwarten ließ. Weiterhin wurden verschiedene Aminosäurepositionen der Peptide durch jene Aminosäuren ersetzt, deren Bedeutung für eine verbesserte Enzyminhibition bekannt oder zu vermuten war. Der beschrittene Weg war methodisch deutlich aufwändiger als die ursprünglich geplante parallele Analyse vieler, konnte diese jedoch hinsichtlich der Ergebnisfindung ersetzen.

Zusammenfassend kann die gewählte Versuchsanordnung – zunächst phagendisplaybasierte Peptidselektion auf Bindung, anschließend Untersuchung gefundener Peptide im Aktivitätsassay auf hemmende Wirkung – als zielführend hinsichtlich der Auffindung peptidischer Chitinaseinhibitoren bezeichnet werden. Die Verwendung disulfidzyklisierter Displaypeptide ist

dabei empfehlenswert. Ein kompetitiver Elutionsmechanismus unter Nutzung von Bindern mit hoher Affinität zum aktiven Zentrum kann Peptide zu Tage fördern, die - ebenfalls mit großer Affinität - im aktiven Zentrum des Enzyms binden und somit durch spezifische und/oder unspezifische Interaktion eine Enzymhemmung ermöglichen.

4.3 Peptidische Inhibitoren einer Filarienchitinase

Inhibition von Chitinasen und zugrunde liegende Mechanismen

Chitinasen sind Enzyme der Glycosylhydrolase- (Synonym:Glycosidase-) Familie. Inhibitoren einzelner Mitglieder dieser Familie haben jüngst größere Bekanntheit erlangt, darunter die Neuraminidase-Hemmer Relenza und Tamiflu. Beide ahmen Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen nach (Williams & Davies, 2001). Inhibitoren chitinolytischer Glycosylhydrolasen können als ebenso viel versprechend bezeichnet werden: Da Chitinasen ubiquitär verbreitet sind, scheint ein weitreichender Einsatz von Chitinaseinhibitoren möglich, z. B. gegen Pilze, Insekten oder Parasiten wie Plasmodien, Leishmanien, Trypanosomen oder Filarien (Shahabuddin et al., 1993; Shahabuddin & Vinetz, 1999). Die klinische Wirksamkeit diverser Chitinaseinhibitoren konnte für den Malariaerreger *P. falciparum* (Shahabuddin et al., 1993; Bathanagar et al., 2003) oder im Einsatz gegen Pilze wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Candida albicans* gezeigt werden (Izumida et al., 1996b). Entscheidend für den therapeutischen Einsatz solcher Hemmstoffe ist die Spezifität der Präparate auf bestimmte Zielchitinasen. Die dargestellte Bedeutung humaner Chitinasen, u. a. bei der Abwehr von Nematoden (Choi et al., 2001) oder Plasmodien (Malaguarnera et al., 2003), und die weiterhin unklare Wirkung von humanen Chitinasen bei chronischen Entzündungsvorgängen gebieten, das Spezifitätskriterium an erste Stelle bei der Auswahl der Hemmstoffe zu erheben.

Die bekannten Inhibitoren von Chitinasen werden unter Nutzung von teilweise unterschiedlichsten Bindungsmodi und -lokalitäten an das Enzym gebunden. Analog zur Bindung von Substrat sind bei der Inhibitorbindung neben Wasserstoffbrücken- und van-der-Waals-Bindungen vor allem hydrophobe Wechselwirkungen aliphatischer Kohlenhydratketten oder aromatischer Reste peptidischer Inhibitoren wichtig (Fusetti et al., 2002; Synstad et al., 2004). An dieser Stelle sei auf einige Inhibitoren von Chitinasen der GH-18 Familie und ihre Hemmmechanismen genauer eingegangen.

Der bekannteste Chitinaseinhibitor ist das bereits dargestellte Pseudotrisaccharid Allosamidin, welches durch den fehlenden Pyranosering-Sauerstoff nicht hydrolysierbar ist (Tews et al., 1997). Allosamidin lagert sich in die -3 bis -1 Bindungstaschen ein, mit dem Allosamizolin in der -1 Position. Die starke Bindung an das Enzym wird, wie auch bei Chitinasesubstraten, durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen mit aromatischen Resten ermöglicht (Rao et al., 2003). Letztere formen beispielsweise bei der humanen Chitotriosidase (HCHT) eine hydrophobe Tasche, an der vor allem Phe58, Gly97, Ala183, Met210 und Trp358 beteiligt sind. Diese Aminosäuren sind überwiegend hochkonserviert in der katalytischen Domäne vieler GH-18-Chitinasen vorhanden, ähnliches gilt für die Wasserstoffbrückenbildner Trp99, Asp136 und Tyr212 (Rao et al., 2003).

Das zyklische Dipeptid Cl-4 ahmt mit seinem Peptidrückgrat ebenfalls den Pyranosering des Substrates nach und passt sich (ähnlich wie das Oxazoliniumintermediat) in die hydrophoben Taschen des Enzyms ein. Am Beispiel der Chitinase B aus *S. marcescens* konnten Houston et al. zeigen, dass Arginin die *N*-Acetylkette des Zuckers strukturell nachahmt. Dabei sollen Wasserstoffbrückenbindungen – ausgehend von Glu144, Trp97, Tyr214 und Asp215 – sowie hydrophobe Wechselwirkungen des Dipeptides mit Trp403, Met212 und Ala184 den Inhibitor im aktiven Zentrum fixieren (Houston et al., 2002b).

Auch die zyklischen Pentapeptide Argifin und Argadin hemmen eine Vielzahl von Chitinasen. Dazu bilden sich z. B. bei der Hemmung von Chitinase B aus *S. marcescens* durch Argifin Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Glu144, Asp142, Tyr214 und der untypischen Argininseitenkette des Hemmstoffs: Die Oxazolininstabilisierung durch Asp142 sowie die Interaktion zwischen Tyr214 und der *N*-Acetylgruppe des Substrats werden durch Bindung dieser Reste an die Carbamoylgruppe des Hemmstoffs nachgeahmt. Das katalytische Glu144 bindet an die Guanidiniumgruppe des Argifins, anstatt mit dem zu spaltenden Sauerstoff zu interagieren (Houston et al., 2002a). Sowohl das Argifinrückgrat als auch die Seitenketten besetzen Positionen, die denen des Zuckersubstrates entsprechen (Houston et al., 2002a; Rao et al., 2005). Die Weiterentwicklung dieser Chitinaseinhibitoren scheint aufgrund ihrer teilweise ausgeprägten inhibitorischen Wirkung sinnvoll, zudem konnten vor kurzem effektivere Verfahren zur Synthese von Argifin und mehrerer, hinsichtlich Chitinasehemmung teilweise potenterer Derivate vorgestellt werden (Dixon et al., 2005, 2007). Die (noch) fehlende Spezifität dieser Hemmstoffe bleibt ein entscheidender Nachteil.

Chitinase-Inhibition durch ICAV1

Inhibitoren, welche durch enzyspezifische Auswahlprozesse aufgefunden wurden, sind oftmals nicht nur hochaffin, sondern weisen zudem die gewünschte Spezifität auf. Entsprechende Beispiele sind nicht nur für Chitinaseinhibitoren (Petter, 2006), sondern z. B. auch für Hemmstoffe von Proteasen, Alkoholdehydrogenase oder Hexokinase bekannt (Hilpert et al., 2003, 2005; Hyde-deRuyscher et al., 2000). Neben der kinetischen Charakterisierung solcher Hemmstoffe, bei der Affinitäten beurteilt und Schlüsselreste (nicht oder nur konservativ austauschbare Reste) identifiziert werden können, bleiben zur definitiven Aufklärung der Wirkmechanismen solcher Inhibitoren Röntgenkristallstrukturanalysen unerlässlich. Für die gefundenen peptidischen Hemmstoffe für Chitinase I aus *A. viteae*, ICAV1 (ACPHKAFSNCG) und ICAV2 (AYLQHPTKTCG), liegen solche Strukturuntersuchungen bislang nicht vor. Alternativ zur strukturbasierten Charakterisierung der Interaktionen zwischen Peptid und Enzym sind rechnerbasierte Strukturmodellierungen denkbar, wobei die Modellierung flexibler Strukturen, beispielsweise linearer Peptide, fehleranfällig ist. Die folgenden Ausführungen stützen sich daher maßgeblich auf die durchgeführten Substitutionsanalysen. Tab. 4-2 fasst die Ergebnisse dieser Substitutionsuntersuchungen zusammen.

Tabelle 4-2: Restaktivitäten von AvCHT bei Substitutionsanalysen von ICAV1

wt ($\approx 60\%$)	< 65 %	65 – 74 %	75 – 84	> 84 %
A			W	G, R
C				A , R
P	D, S, V, W		A	G, E, H, K, L, N, R, Y
H		R	V, W	G, A , D, S
K		A	E, P	G, D, H, L, R, V, W, Y
A		V		G, R, W
F		V, W		G, A , F, R, Y
S	W		T	G, A , R
N		W	R	G, A , Q
C				A , R
G				A , R

Die in Spalte 1 angegebene Wildtypsequenz des Peptides ist in allen Aminosäurepositionen durch verschiedene Substitutionen modifiziert worden. Den jeweiligen Wildtypamino-säuren sind die Substituenten sowie die beobachteten Effekte dieser modifizierten Peptide auf die Aktivität von Chitinase aus *A. viteae* (AvCHT) zugeordnet worden. In Zeile 1 sind dazu die jeweiligen gemittelten Restaktivitäten des Enzyms mit Chitotriosesubstrat nach 10 min Inkubation mit 25 μM Peptid angegeben. Nur wenige Substitutionen führten zu Peptiden mit einer dem Wildtyp ähnlichen Hemmwirkung (ca. 60 % Restaktivität). Die Substitutionsanalyse erbrachte keinen Vorschlag für eine hinsichtlich der Affinität bessere Aminosäuresequenz (wt: Wildtyp, **fett**: Alanin-walk).

Die Inhibitionskonstanten der Peptide lagen für Chitinase aus *A. viteae* und dem Substrat UMB-Chitotriose im niedrigen mikromolaren Bereich ($K_i \approx 10 \mu\text{M}$ für ICAV1 und $13 \mu\text{M}$ für ICAV2)

und damit in bereits beobachteten Größenordnung für peptidische Chitinaseinhibitoren diesen Ursprungs (siehe auch: Petter, 2006). Im Vergleich mit anderen Chitinaseinhibitoren kann die Affinität als gut bezeichnet werden. Für Allosamidin und natürliche zyklische Pentapeptide sind mitunter Inhibitionskonstanten im nanomolaren Bereich bekannt (siehe Kapitel 4.1 sowie Houston et al., 2002a bzw. Rao et al., 2005), für Cl-4 oder kohlenhydratanaloge Hemmstoffe bewegen sich die K_i -Werte eher in oberen mikromolaren Dimensionen (Izumida et al., 1996a, b; Spindler & Spindler-Barth, 1999; Vaaje-Kolstadt et al., 2003, Rao et al., 2005). Die beobachtete Hemmung von Chitinase aus *A. viteae* wies für beide Peptide einen kompetitiven Mechanismus auf, d. h. die Bindungsorte von Substrat und Inhibitor sind identisch bzw. überlappend. Dementsprechend vermochte eine Erhöhung der Substratkonzentration die Hemmeffekte jeweils zu vermindern. Diese Konkurrenz zwischen Inhibitor und Substrat ist wahrscheinlich durch die gewählte Elutionsmethodik vorgegeben, da die peptidtragenden Phagen mit dem substratanalogen, ebenfalls kompetitiv wirkenden Inhibitor Allosamidin eluiert worden waren.

Bei der Auswahl der Bibliothek war davon ausgegangen worden, dass zyklisierte Peptide im Vergleich mit linearen Verwandten höhere Affinitäten für Chitinaseprotein aufweisen und damit hemmende Effekte des Peptides auf die enzymatische Aktivität wahrscheinlicher würden. Die Substituierung der flankierenden Cysteine von ICAV1 bestätigt nun die Rolle der Disulfidzyklisierung zumindest für dieses Inhibitorpeptid. Die hemmende Wirkung wird bei aufeinanderfolgender Substitution der Cysteine durch Alanin vollständig aufgehoben, gleiches gilt für die schrittweise Substitution beider Cysteine durch Arginin.

Für den N-terminalen Alaninrest in Position 1 von ICAV1 konnte durch Austausch zu Glycin ebenfalls eine Bedeutung gezeigt werden; der Austausch führte zum Verlust der hemmenden Wirkung. Dieser Alaninrest ist nicht Teil der eigentlichen Peptidsequenz, sondern wird als *Linker* zum Oberflächenprotein pIII bei der genutzten Phagenbank mitgeführt. Die These, dass dieses Alanin, welches während des Phagendisplays auch „mitselektiert“ worden war, eine mögliche Bedeutung für die Hemmung hat, konnte also untermauert werden.

Im Alanin-*walk* wurden für den Austausch des Prolins durch Alanin nur geringe Abnahmen der Hemmwirkung beobachtet. Bei weiteren Substitutionen wurde deutlich, dass Austausche von Prolin durch Glutamat, Serin, Valin und Tryptophan nur mäßige Verringerung der Hemmung zeigten, jedoch Austausche durch Histidin, Lysin, Leucin und Glutamin für die Inhibition stark

negativ wirkten. Für den Histidinrest waren Austausche problematischer, gleichwohl konnte hier ein eindeutigeres Muster beobachtet werden. Es wurden Arginin-, Valin- und Tryptophansubstitutionen, also der Austausch zu eher unpolaren Resten, besser akzeptiert als Austausche zu polaren Resten wie Glutamat, Glycin und Serin, welche zum Verlust der Hemmwirkung führten.

Unerwartet war das völlige Fehlen von Argininresten in beiden aufgefundenen Inhibitoren: Arginin übt in mehreren peptidischen Chitinasehemmstoffen eine wichtige Funktion aus (Houston et al., 2002a, 2002b, 2004; Izumida et al., 1996a; Petter, 2006). Von Bedeutung scheint dabei das Stickstoffatom der Guanidiniumgruppe zu sein: Sowohl für *N*-Acetylzucker, als auch für Allosamidin oder zyklische Pentapeptidinhibitoren kann die Wechselwirkung mit Chitinase durch Interaktion zwischen einem Stickstoff und dem katalytisch wichtigen Aspartat des aktiven Zentrums stabilisiert werden (Houston et al., 2002a). Im Peptid ICAV1 konnte statt Arginin nun Lysin als wichtiger Rest identifiziert werden – Austausch zu Alanin, aber auch zu Arginin führten zu einem Verlust an Hemmung. Möglicherweise konnte sich lysinhaltiges Peptid im Selektionsprozess des Phagendisplays behaupten, weil Arginin – wiewohl mit ähnlichen Eigenschaften ausgestattet – aus nur spekulierbaren Ursachen (z.B. größerer Rest = sterische Behinderung) ausgeschlossen wurde.

Konservative Substitutionen des Phenylalaninrestes in ICAV1 durch andere hydrophobe Aminosäuren wie Valin und Tryptophan führten zu mäßigem Verlust der hemmenden Wirkung des Peptides. Dies lässt eine hydrophobe Wechselwirkung an dieser Position des Peptides mit dem Enzym vermuten. Der konservative Austausch des Serins zu Threonin führt ebenfalls zu nur geringen Einbußen der Affinität des Inhibitors zu Chitinase, was auf eine mögliche Wasserstoffbrückenbildungsfunktion dieser Aminosäuren hinweist. Der Austausch zu Tryptophan wurde ebenfalls gut akzeptiert, was nur erneut mit möglichen hydrophoben Wechselwirkungen erklärt werden kann. Die Ursache der Variabilität hinsichtlich der Enzym-Inhibitor-Interaktion an dieser Position ist im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen nicht zu identifizieren.

Zur weiteren Analyse des Wirkungsmechanismus von ICAV1 fanden rechnergestützte Docking-Untersuchungen von ICAV1 und einem auf Kristallstrukturuntersuchungen der Humanen Chitotriosidase (pdb: 1HKK) basierenden Strukturmodell der *A. viteae* Chitinase statt (Docking:

A. Ulrich, FU Berlin). Dabei konnte für das Docking des Inhibitors an der Chitinase nur ein definiertes *Cluster* gefunden werden. Als *Cluster* ist dabei eine Gruppe von Strukturen ähnlicher Energie und Lokalisation definiert, wobei eine geringe Zahl definierter *Cluster* für eine hohe Wahrscheinlichkeit spezifischer Positionierung spricht. Abb. 4-5 und Abb. 4-6 zeigen die als Kontaktpositionen identifizierten Aminosäurereste der *A. viteae* Chitinase sowie den modellierten Inhibitor (ACPHKAFSNCG) bzw. die Positionierung des Inhibitors in die oberflächenmodellerte Kontaktregion des Enzyms.

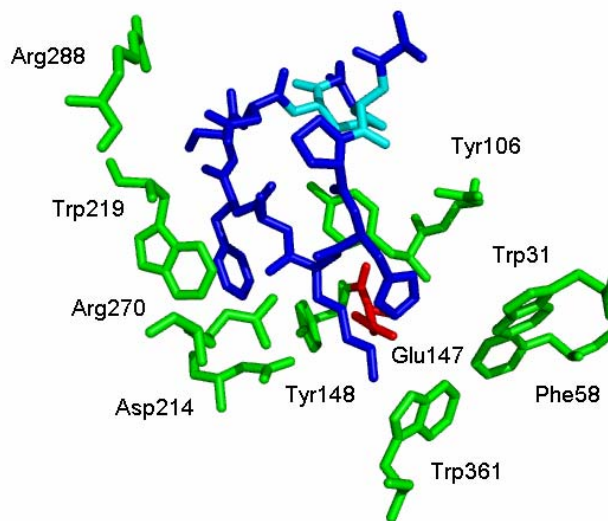


Abbildung 4-5: Positionierung von ICAV1 in der Chitinase I aus *A. viteae*. Strukturmodellierung und rechnergestütztes Docking von Enzym und Inhibitor. Angegeben sind die Kontaktamino-säuren der Chitinase (grün) sowie das katalytische Glutamat (rot). Der zyklische Hemmstoff ist in blau dargestellt, die die Disulfidbrücke bildenden Cysteine in ziano. Docking und Inhibitormodellierung: A. Ulrich, FU Berlin.

Folgende Wechselwirkungen konnten mit günstigen Energiekalkulationen modelliert werden (Tab. 4-3):

Tabelle 4-3: Kontaktbeziehungen von ICAV1 und AvCHT

ICAV1	AvCHT	Kontakt
His4	Phe 58; Tyr106; Trp361	Hydrophobe Wechselwirkung
Lys5	Trp31; Phe58; Tyr148; Trp361 Glu147; Asp214	Hydrophobe Wechselwirkung Ionische Wechselwirkungen
Phe7	Tyr148; Trp219	Hydrophobe Wechselwirkung
Asn9	Arg288	van-der-Waals-Kontakt

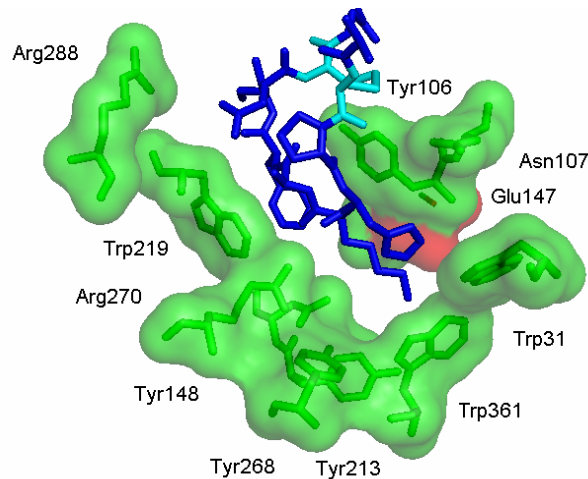


Abbildung 4-6: Oberflächenmodell des Kontaktbereiches zwischen Chitinase aus *A. viteae* und ICAV1. Der Inhibitor passt sich mit seinen zwei Raumebenen (siehe Text) in die für die Substratkatalyse entscheidende Kontaktregion ein. Farbdarstellung wie in Abb. 4.5.

Die gefundenen Kontaktpositionen zwischen Enzym und Inhibitor zeigen Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der Substitutionsanalysen. So wurde für den Rest His4 von ICAV1 eine hydrophobe Wechselwirkung vermutet, die Modellierung bestätigt dies. Gleiches gilt für den Rest Phe7. Für den als bedeutsam für die Hemmung identifizierten Lysinrest des Inhibitors können zwei sich ergänzende Kontaktmöglichkeiten gezeigt werden: Der Inhibitor passt sich mit dem Lysin in die aus den Resten Trp31, Phe58, Tyr148 und Trp361 gebildete hydrophobe Tasche ein, welche bei den GH-18 Chitinasen strukturell konserviert ist, um gleichzeitig ionische Wechselwirkungen zum katalytischen Rest Glu147 bzw. zu Asp214 einzugehen. Bei der genaueren Analyse der räumlichen Beziehung zwischen Lysin und den Kontaktresten des Enzyms wird deutlich, warum Argininsubstitutionen nicht akzeptiert worden waren: Der Raum zwischen den Resten Glu147, Phe58, Trp31 und Trp361 wird vom Lysinrest des Inhibitors exakt und unter Ausbildung beschriebener Wechselwirkungen ausgenutzt (Abb. 4-7). Eine Vergrößerung des Restes, z. B. beim Austausch zu Arginin, würde zu sterischer Behinderung führen (Abb. 4-8), was Bindung und demnach auch Hemmung der Katalyse ausschließen könnte.

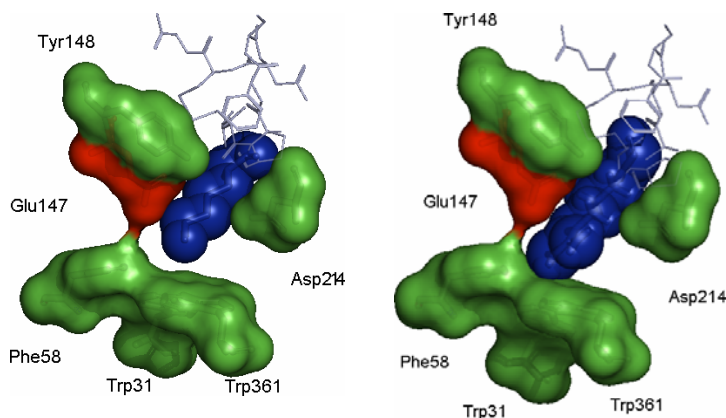


Abbildung 4-7 und 4-8: Optimale Ausnutzung des begrenzten Kontaktraumes durch ICAV1. Der vorhandene Raum wird durch Lysin nahezu optimal ausgenutzt. Eine Substitution zu Arginin führt zu sterischen Behinderungen, z. B. zwischen der Guanidiniumgruppe des Arginins und den Resten Trp361 und Phe58 des Enzyms. Dies könnte den Ausschluss des Arginins beim Selektionsprozess sowie die Substitutionsergebnisse erklären. Beide Reste sind in sphärischer Ausdehnung modelliert.

Interessant ist die mögliche Interaktion des Asparaginrestes von ICAV1 mit dem Arg288 des Enzyms. Die gefundenen Substitutionsanalysen zeigen, dass hier zu große oder hydrophobe Reste (Arginin, Tryptophan) störend wirken. Die mittels der Substitutionsanalyse gezeigte Bedeutung des N-terminalen Alanins sowie des Restes Ser8 war durch das Docking nicht erklärbar. Zusammenfassend können große Übereinstimmungen zwischen den aus der Strukturmodelluntersuchung abgeleiteten Erkenntnissen und den Ergebnissen der Substitutionsanalysen festgestellt werden.

Die identifizierten Kontaktamino-säuren des Enzyms sind größtenteils (Phe58; Tyr106; Glu147; Asp214; Arg270; Trp361) in homologer Weise bei anderen Chitinasen an der Bindung von Inhibitoren beteiligt (Houston et al., 2002a, 2002b; Rao et al., 2003, 2005; Petter, 2006). Der modellierte Inhibitor ICAV1 passt sich mit einer aus den Aminosäuren Phe-His-Lys-Ala gebildeten „Ebene“ in den Spalt des aktiven Zentrums (s.u.) ein. Die aus der C-C-Brücke, dem Asparaginrest und dem terminalen Glycin gebildete zweite Raumebene „ragt“ aus dem Spaltbereich des aktiven Zentrums heraus. Der Inhibitor besetzt in räumlich fixierter Weise die für die Katalyse entscheidende Aminosäureregion des aktiven Zentrums und verhindert somit sowohl die Bindung von Substrat als auch die Katalyse der hydrolytischen Spaltung der *N*-Acetylglucosaminpolymersubstrate.

Chitinase-Inhibition durch ICAV2

Für den Inhibitor ICAV2 konnten durch Positionsaustausche von Peptidamino-säuren keine klaren Aussagen zu Schlüsselresten des Peptides oder möglichen optimierbaren Positionen gewonnen werden. Eine Dockinganalyse, wie sie für ICAV1 erfolgte, war durch die flexible Struktur des nicht mittels Zyklisierung konformationsstabilisierten Inhibitors ICAV2 nicht möglich. Da die Sequenz des Peptides (**AYLQHPTKTCG**) Homologien zu einem bekannten peptidischen Inhibitor der Chitinase B aus *S. marcescens* aufweist (**ACRGLSHACGG**; **fett:** homologe Reste; Inhibitor aus: Petter, 2006), sollten Analogien zwischen der Interaktion dieses Peptides mit Chitinase B sowie von ICAV2 mit *A. viteae*-Chitinase untersucht werden. Durch Superpositionierung des Strukturmodells der Filarien-chitinase mit der Struktur des Chitinase-B-Inhibitor-komplexes (Petter, 2006) und dem dazugehörigen Peptidhemmstoff konnten mögliche Kontaktamino-säuren des Enzyms identifiziert werden (Abb. 4-9; Superpositionierung mittels www.swissmodel.expasy.org). Da die angenommene Homologie äußerst begrenzt ist, müssen die durchgeführte Struktursuperpositionierung und die abgeleiteten Schlussfolgerungen als spekulativ bezeichnet werden.

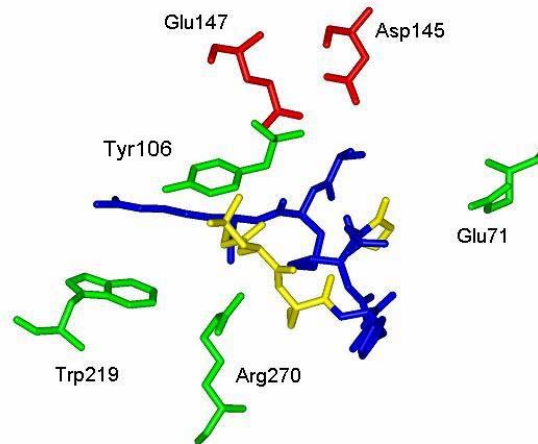


Abbildung 4-9: Mögliche Kontaktaminosäuren von *A. viteae* Chitinase mit dem zu ICAV2 homologen Inhibitor der Chitinase B aus *S. marcescens* (ICB). Die Kontaktaminosäuren der Chitinase (Strukturmodellierung) sind in grün dargestellt, die katalytischen Reste des Enzyms in rot. Der Inhibitor ist blau gekennzeichnet, wobei die zu ICAV2 homologen und für die Bindung an das Enzym wichtigen Reste gelb dargestellt sind (außer Alanin). Details s. Text.

Folgende Wechselwirkungen konnten aus dem Homologiemodell abgeleitet werden (Tab. 4-4):

Tabelle 4-4: Kontaktbeziehungen von ICAV2 und AvCHT.

In Spalte 2 sind die zu ICAV2 homologen Reste von ICB angegeben.

ICAV2	(ICB)	AvCHT	Kontaktbeziehung
Ala1	(Arg3)	Trp219	Hydrophobe Wechselwirkung
Tyr2	(Gly4)	Trp219	Hydrophobe Wechselwirkung
Leu3	(Leu5)	Tyr106	Hydrophobe Wechselwirkung
Gln4	(Ser6)	Arg270	Ionische Wechselwirkung
Lys8	(Gly10)	Glu71	Ionische Wechselwirkung

Unter Annahme der dargestellten Homologien sind also einerseits hydrophobe Wechselwirkungen, andererseits ionische Wechselwirkungen für die Bindung des Inhibitors verantwortlich. So interagiert der Rest Trp219 über hydrophobe Wechselwirkung vermutlich mit dem Alanin- und Tyrosinrest des Inhibitors. Der in *A. viteae* Chitinase dem Trp97-Rest von Chitinase B homologe Rest Tyr106 könnte ähnliche Bindungsbeziehungen zu Leucin in ICAV2 eingehen. Entsprechende Interaktionen sind z.B. für Argifin und Chitinase B aus *S. marcescens* bekannt (Houston et al., 2002a). Entscheidend für die Hemmung der Filarien-chitinase könnten zudem ionische Kontakte zwischen dem Lysinrest von ICAV2 und Glu71 sein. Ähnliches gilt für den Glutaminrest des Peptides und Arg270 der Chitinase. Eine Interaktion des Lysins von ICAV2 und den für die Katalyse entscheidenden Enzymaminosäuren Asp145 und Glu147 scheint unter Annahme der gezeigten Peptidpositionierung nicht stattzufinden.

Die Analyse der Struktursuperpositionierung lieferte zudem einen Hinweis, warum das auf Chitinase B hemmend wirkende Peptid nicht auch die Chitinase aus *A. viteae* hemmt: Das C-terminale Glycin des Peptides würde mit seinen, die Peptidbindung bildenden Atomen C_α und N in zu große räumliche Nähe zum Rest Phe70 der Filarienchitinase kommen. Die resultierende, mögliche sterische Behinderung kann somit beispielhaft für den der Spezifität solcher Inhibitoren zugrundeliegenden Mechanismus genannt werden.

Optimierung peptidischer Hemmstoffe

Insgesamt bleibt für beide Peptidinhibitoren festzustellen, dass die durchgeführten Substitutionsanalysen Aussagen zur möglichen Bedeutung einzelner Sequenzamino­säuren ermöglicht haben, jedoch keinen Vorschlag für eine hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung verbesserten Sequenz machen konnten. Dafür kommen verschiedene potentielle Ursachen in Frage:

Zum einen ist denkbar, dass bereits die optimalen Inhibitoren des gewählten Sequenzraumes (Sequenzlänge, Nutzung nur natürlicher Aminosäuren) mittels des so durchgeführten Phagendisplays (Selektionsbedingungen, Zweiphasenpanning, Elutionsmethodik) selektiert wurden. Somit besteht jedoch die Möglichkeit, dass z.B. eine Sequenzverlängerung der Peptide zu noch wirkungsvolleren Hemmstoffen führen könnte. Ebenso wäre es möglich, dass mittels unspezifischer Elution (z.B. durch pH-Verschiebung) oder durch proteolytische „Elution“ unter Nutzung einer Proteaseschnittstelle zwischen pIII und dem Peptid noch affinere Binder und Hemmer aufgefunden worden wären. Beide Ansätze müssten jedoch auf den Vorteil eines spezifischen Elutionsverfahrens verzichten.

Zum anderen ist nicht auszuschließen, dass die durchgeführte sekundäre Optimierung nicht zu Verbesserungen kommen konnte, da die oben aufgeführten Bedingungen hinsichtlich Peptidsequenz und Aminosäurespektrum beibehalten worden sind. Zudem können kombinatorische Effekte (z.B. Wirkung der *gleichzeitigen* Substitution zweier oder mehr Aminosäuren) nur schwierig nachgebildet werden.

Es ist bekannt, dass das Auffinden peptidischer Inhibitoren für Chitinasen teilweise große Schwierigkeiten bereit hält. So konnten bisher sowohl für Chitinase C aus *S. marcescens* als auch für Chitinase aus *O. volvulus* weder mittels Phagendisplay noch durch andere Methoden

(rechnerbasierte Modellierung, Ableitung von Peptidderivaten des Argadins und Argifins, statistisches Screening bekannter chitinasehemmender Peptidinhibitoren) hemmende Peptide aufgefunden werden (Petter, 2006). Beide in dieser Arbeit beschriebenen peptidischen Inhibitoren sind also mit einem K_i von 10 μM bzw. 13 μM und ihrer noch zu diskutierenden Enzymspezifität lohnenswerte Ziele für weitere Untersuchungen.

Spezifitätsmechanismen peptidischer Chitinaseinhibitoren

Sowohl ICAV1 als auch ICAV2 wirken spezifisch auf Chitinase aus Filarien, mit deutlicher Bevorzugung von Chitinase I aus *A. viteae*. Die beobachtete Hemmung von Chitinase aus *B. malayi* Mikrofilarien durch ICAV2 weist mit 60 μM einen (verglichen mit der Hemmung von *A. viteae*-Chitinase) ca. fünfmal höheren K_i -Wert auf. Für die gefundene Überschneidung des Inhibitionseffektes kommen Sequenzhomologien beider Chitinasen als Ursache in Frage, da diese die räumliche Struktur und damit sowohl den Zugang zu bestimmten Resten im aktiven Zentrum der Enzyme als auch die Wechselwirkungen der Peptidaminosäuren mit diesen Enzymresten bestimmen. Sowohl die domänenhaft organisierte Genstruktur beider Enzyme als auch die Aminosäuresequenzen der Exons D und E sind weitestgehend homolog (vollständige Alignments in: Tachu, 2006).

Für die spezifische Wirkung der Peptide auf nur zwei der untersuchten Chitinasen könnte sterische Behinderung, ausgehend von Strukturdifferenzen im aktiven Zentrum und seinem Zugangsbereich verantwortlich sein. Hinsichtlich der dreidimensionalen Struktur weisen die genannten Strukturregionen von Glycosylhydrolasen überwiegend eine der drei folgenden Topologien auf:

- Taschen- oder Kraterformationen finden sich oft bei Exopolysaccharidasen, üblicherweise ist die Katalyse hochmolekularen Substrates ineffizient.
- Spaltformationen sind günstiger für stark polymerisiertes Substrat und finden sich eher bei Endopolysaccharidasen.
- Tunnel entstehen, wenn Spalten durch *loops* o.ä. bedeckt werden, die Zugänglichkeit ist dann nur von den Tunnelenden möglich. Letzteres soll für die Hydrolyse kristallinen, unlöslichen Substrates günstig sein, da „prozessive“ Katalyse, also schrittweises Abspalten von Produkten bei konstanter Bindung des Substrates an das Enzym, ermöglicht wird (Davies & Henrissat, 1995).

Wie Strukturuntersuchungen zu Chitinasen aus *Serratia marcescens* und der Humanen Chitotriosidase sowie durchgeführte Strukturmodellierungen zeigen, weisen die im Spezifitätsversuch eingesetzten Enzyme der GH-18-Klasse verschiedene Topologien des aktiven Zentrums auf (Abb. 4-10).

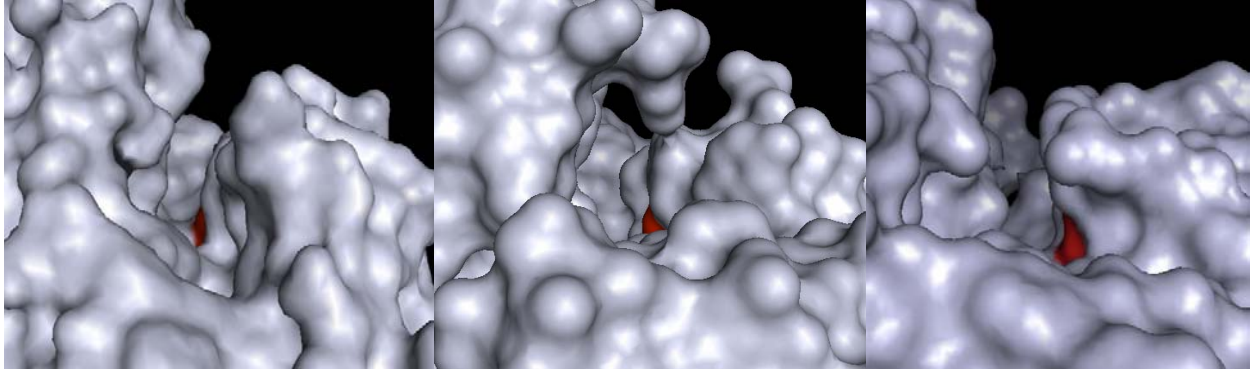


Abbildung 4-10: Topologien der aktiven Zentren verschiedener GH-18-Chitinasen: Dargestellt sind Oberflächen von aktiven Zentren und deren Zugangsbereiche von Chitinase A und B aus *S. marcescens* (SmCHTA und SmCHTB) sowie der Humanen Chitotriosidase, HCHT (von links nach rechts). Es finden sich sowohl die Spaltformation (SmCHTA, pdb: 1CTN) als auch ausgeprägte (SMCHTB, pdb: 1ER6) oder mäßige (HCHT, pdb: 1HKK) Tunnelbildungen. Der katalytische Glutamatrest ist jeweils rot hervorgehoben.

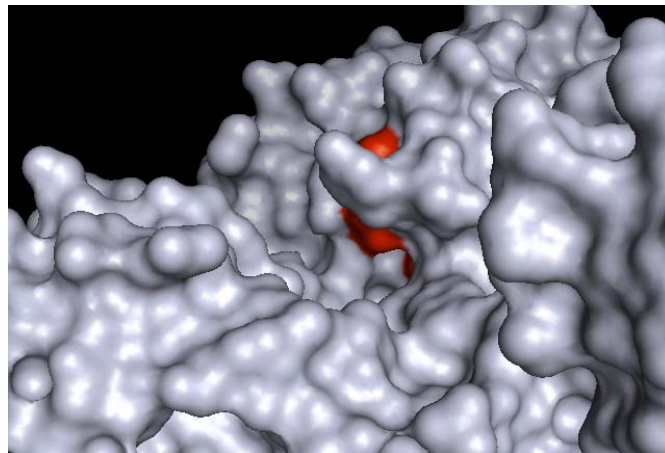


Abbildung 4-11: Oberflächenmodellierung der Chitinase I aus *A. viteae*. Dargestellt sind das aktive Zentrum und der zugehörige, spaltförmige Zugangsbereich. Der katalytische Glutamatrest (Glu147) ist rot hervorgehoben. Im Vordergrund rechts ist die modellierte Chitinbindungsdomäne sichtbar (Modellierung der CBD: A. Ulrich, FU Berlin).

Die Chitinase aus *A. viteae* kann, basierend auf Superpositionierungsanalysen, der Spaltformation zugeordnet werden (Abb. 4-11). Bei dem Versuch, bekannte unspezifische (z.B. Allosamidin) und spezifische Hemmstoffe (ICAV1, ICAV2, Inhibitoren der Chitinase A und B aus *S. marcescens*, letztere in: Petter, 2006) hinsichtlich ihrer Spezifitätsmuster solchen topologischen Klassen zuzuordnen, sind bisher keine Erfolge erzielt worden. So wird Chitinase aus *B. malayi* zwar durch ICAV2 gehemmt, nicht aber die topologisch äußerst ähnliche Chitinase aus *O. volvulus*. Peptidische Hemmstoffe der Chitinasen aus *S. marcescens* hemmen nur

höchstspezifisch „ihre“ Chitinase. Allosamidin wiederum vermag (bei gleicher Zugänglichkeit des aktiven Zentrums) alle genannten Chitinasen zu hemmen.

Der Zugang von Inhibitoren zu den aktiven Zentrum der Chitinasen scheint demnach nicht ursächlich für die gefundenen Affinitätsunterschiede zu sein. Ebenso können grundlegende Differenzen in der Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne, welche bei den GH-18-Chitinasen weitestgehend konserviert ist, ausgeschlossen werden. Entscheidend dürften einerseits minimale Differenzen des Strukturarrangements des aktiven Zentrums sein, welche durch Sequenzunterschiede mit größerer Entfernung vom aktiven Zentrum bedingt sind, was z. B. zu Kettendrehungen führen kann. Andererseits sind Aminosäuredifferenzen in der Umgebung von für die Hemmung wichtigen Kontaktpositionen des Enzyms denkbar. Beide Effekte könnten additiv zum Tragen kommen und sterische Behinderung verursachen.

Um die Bedeutung von Sequenzdifferenzen in typischen Kontaktregionen der Chitinasen mit Hemmstoffen zu untersuchen, wurde ein Sequenzalignment verschiedener GH-18-Chitinasen durchgeführt (Abb. 4-12).

Aminosäurepos.	27	31	58	100	136	
Allos-Kontakt	*	*	*	*	**	
HCHT (22)	AKLV	CYFTNWAQYRQ	GEARFLP-[]	HLIYAFAGMTN-[]	AIGGWNFGTQK-[]	SFDGLLDWEYFGS-[]
AvCHT (22)	YVRG	CYYTNWAQYRQ	GEGKFLP-[]	HILYAFAKVDE-[]	SYGGYNFGSST-[]	KFDGFLDWEYFTG-[]
BmCHT (23)	YVRG	CYYTNWAQYRD	GEGKFLP-[]	HILYAFAKVDE-[]	SYGGYNFGSAI-[]	NFDGFLDWEYFVG-[]
OvCHT (22)	YVRG	CYYTNWAQYRQ	GEGKFLP-[]	HILYAFAKVDQ-[]	SYGGYNFGSST-[]	KFDGFLDWEYFIG-[]
SmCHTA (155)	NSGK	VVGSYFVEWGVYGRNFTV-[]	HLLYGEIPICG-[]	SIGGWTLSDPF-[]	FFDGVLDWEYFPGG-[]	
SmCHTB (12)	FIFT	NQINNYTETDTSVVFPV-[]	QLTHINFSFLD-[]	SIGGWYYSNDL-[]	FFDGVLDWEYFQA-[]	
SmCHTC (66)	FMKG	QGIPTFKPYNLSDAEERR-[]	RAVLISLGGAD-[]	KKVKDYAAQG-[]	YFDGLDLEQAAL-[]	
PfCHT (53)	GIIQ	GYPSWVSYNHNKDLNF-[]	AKMDLSYDSIE-[]	SLGGETYHPS-[]	GFDGLVDYFNGS-[]	

Aminosäurepos	210	267	297	358	
Allos-Kontakt	**	*	*	*	
HCHT	DFVNL	MAYDFHGSW-[]	LGMPTYGRSFT-[]	GFPTKEGGMLA-[]	LGGAMVWALDDLDDFA
AvCHT	DLLFL	MSYDLHGSW-[]	IGIPANSRGWT-[]	STINPAGGTAA-[]	YGSAFMWTLDFDDEK
BmCHT	DLLFL	MSYDLHGSW-[]	IGIPMYAQGWT-[]	SKTNPAGGTAS-[]	YGSAFIHALDFDDF-
OvCHT	DLLSL	MSYDFHGSW-[]	IGIPTYGRGWT-[]	STINPAGGTAA-[]	YGSAFIHWTLDFDDEK
SmCHTA	DHIFL	MSYDFYGGPF-[]	VGTAMYGRGWT-[]	KGTWKNGIVDY-[]	LGGLESWEIDAN--
SmCHTB	DYINL	MITYDLAGPW-[]	MGVFFYGRAFK-[]	PYPSTDYWLVG-[]	DPSAPEWQNNRSYKA
SmCHTC	VLDKQ	AVYNAAFARL-[]	ENAPTALTVAE-[]	ASYTVYRNGNP-[]	DPSAPEWQNNRSYKA
PfCHT	NDPKK	ICMDEAPY-[]	VFVQTFNYTNS-[]	YDYVIIMGFTL-[]	ADGFGLWSLSSDNA

Abbildung 4-12: Aminosäuresequenzvergleich von GH-18-Chitinasen. Zur Analyse des Sequenzraumes in der Umgebung von für die Hemmung wichtigen Kontaktpositionen wurden verschiedene Chitinasesequenzen verglichen. Ausgehend von bekannten Kontaktaminoaciden bei der Hemmung der Humanen Chitotriosidase (HCHT) durch Allosamidin (pdb: 1HKK) wurden Alignmentblöcke von isolierten Chitinasesequenzbereichen erstellt. Dargestellt sind die jeweiligen Kontaktaminoacide in HCHT (mit * und Positionsangabe gekennzeichnet) sowie angrenzende Sequenzbereiche im Einbuchstaben-Aminosäurekode. Durch die vergleichende Darstellung dieser Sequenzregionen sind Analysen zu möglichen Spezifitätsursachen möglich. Bereits ein Austausch in der Umgebung dieser (oftmals konservierten) Kontaktreste kann zu sterischen Behinderungen bei der Kontaktaufnahme zu Inhibitoren führen. In allen Sequenzen identische Aminosäuren sind gelb unterlegt, blaue Unterlegungen markieren teilidentische Aminosäuren oder konservative Austausche. (HCHT: Rao et al., 2003 ; AvCHT : Wu et al., 1996 ; BmCHT : Fuhrman et al., 1992 ; OvCHT :Wu et al., 1996 ; SmCHTA : Perrakis et al., 1994 ; SmCHTB : van Aalten et al., 2001; SmCHTC: Ningaraju et al., 2006; PfCHT: Vinez et al., 1999)

Bei der vergleichenden Analyse der für den Kontakt mit Allosamidin in Frage kommenden Chitinaseaminosäuren und ihrer Sequenzumgebung können fünf Sachverhalte festgehalten werden:

- 1.) Die für den Kontakt entscheidenden Aminosäuren der Humanen Chitotriosidase sind bis auf eine Ausnahme (Glu297) in allen drei Filarienchitinasen in identischer Weise vorhanden.
- 2.) Es existieren Kontaktregionen mit großer Ähnlichkeit zwischen *A. viteae* Chitinase und *B. malayi* Chitinase.
- 3.) Es existieren Kontaktregionen mit großer Ähnlichkeit zwischen *A. viteae* Chitinase und *O. volvulus* Chitinase.

Daraus ist abzuleiten, dass die direkt für den Kontakt zu Allosamidin als Musterinhibitor verantwortlichen Aminosäuren nicht für die beobachteten Spezifitätsunterschiede peptidischer Inhibitoren verantwortlich sind. Der Sequenzvergleich der Umgebungsregionen dieser Kontaktreste liefert ebenfalls keine Erklärung für die Hemmung von *A. viteae* und *B. malayi* Chitinase, nicht aber von *O. volvulus* Chitinase durch die Peptide. Somit muss auf ausstehende Untersuchungen von Kristallstrukturen verwiesen werden.

- 4.) Die Humane Chitotriosidase zeigt, verglichen mit den angegebenen bakteriellen Chitinasen, eine höhere Homologie zur Chitinase aus *A. viteae*. Dies rechtfertigt ihre Nutzung als Modell für Superpositionierungsuntersuchungen.
- 5.) Letztere Homologien sind wiederum deutlich geringer als die der Filarienchitinasen untereinander, was wiederum eine Hemmung der Humanen Chitotriosidase durch ICAV1 und ICAV2 höchst unwahrscheinlich macht.

Zusammenfassend scheinen weder Strukturabweichungen der Zugangsregion zum aktiven Zentrum noch Unterschiede in den für den Kontakt zu Hemmstoffen wichtigen Sequenzregionen die Ursache für die Spezifität der Inhibitoren zu sein. Geringfügige Abweichungen im Arrangement des aktiven Zentrums des Enzyms durch Aminosäuredifferenzen in der Peripherie des Moleküls könnten nur durch noch ausstehende Strukturuntersuchungen als Ursache des spezifischen Verhaltens bestätigt werden.

Peptide als Pharmaka

Der Peptidcharakter der aufzufindenden und zu analysierenden Inhibitoren war bei der Planung und Umsetzung der vorliegenden Arbeit eine entscheidende Komponente, die insbesondere für die mögliche Verwendung der (weiterentwickelten) Hemmstoffe im Rahmen therapeutischer Anwendungen bedeutsam war. Kleine peptidische Biopharmaka haben einige Vorteile gegenüber anderen, teilweise hochmolekularen und überwiegend *non-protein-drugs*: Neben der unerlässlichen Affinität und Spezifität weisen Peptide beispielsweise eine gute Haltbarkeit bei Raumtemperatur oder eine günstige Gewebspenetration in Folge ihrer geringen Größe auf. Nachteile von Peptiden oder Proteinen im therapeutischen Einsatz sind ihre ungünstige Pharmakokinetik bei Gabe *per os* (geringe orale Bioverfügbarkeit), mangelnde *in vivo* Stabilität durch proteolytische Degradation, eine für Peptide mit einem Molekulargewicht unter 5 kDa durch schnelle renale Elimination verursachte geringe Plasmahalbwertszeit, schlechter Zugang zum Intrazellulärraum sowie ihre potentielle Zytotoxizität.

Die aufgezeigten Vorteile peptidischer Pharmaka haben allgemein zur verstärkten Suche nach therapeutischen Peptiden geführt. Durch anschließende Modifizierung der gefundenen Peptide können oftmals die möglichen Nachteile gemindert oder umgangen werden. So dient z. B. eine Konjugation der Peptide mit Polyethylenglykol der Verringerung der renalen Elimination, dem Schutz vor Exo- oder Endopeptidasen sowie der Verringerung der immunogenen Potenz der Moleküle (Sato et al., 2006). Die Verwendung unnatürlicher Aminosäuren (D-Amino- oder α -Trifluormethylaminosäuren) bzw. Modifikationen am N-Terminus (Acetylierung, Glykosylierungen) oder C-Terminus (Amidierung) sowie der Ersatz der Peptidylbindung, z. B. durch Verwendung thioamidierter Aminosäuren, sollen die proteolytische Resistenz der Peptide erhöhen. Die Fusion mit sogenannten *cell-penetrating-proteins* (CPPs), z. B. Penetratin oder Transportan (Ladner et al., 2004; Sato et al., 2006), kann der Verbesserung der intrazellulären Bioverfügbarkeit peptidischer Pharmaka dienen. Diese Möglichkeiten zur Optimierung der gefundenen Inhibitoren stehen zur Verfügung, sollte eine therapeutische Anwendung schließlich tatsächlich geplant sein.

4.4 Ausblick

In den durchgeführten Untersuchungen konnten zwei peptidische Inhibitoren für Chitinase aus der als Modellorganismus für Filariosen geeigneten Nagerfilarie *A. viteae* aufgefunden und charakterisiert werden. Für beide Peptidinhibitoren sollte eine Weiterentwicklung unter optimierter Nutzung chemischer Substitutionsbibliotheken möglich sein. In ihrer Affinität zu Chitinase verbesserte Peptide sollten sowohl quantitativ (K_i -Wertbestimmung) als auch qualitativ (Spezifitätsanalysen) charakterisiert werden.

Für alle inhibitorischen Peptide sind Versuche zur Wirkung flankierender D-Alanine einerseits auf Hemmungseffekte, andererseits auf Proteasestabilität möglich. Die Optimierung der Stabilität der Peptide kann beispielsweise auch durch Substitution aller Peptidpositionen gegen D-Aminosäuren im SPOT-Format oder durch Konjugation der Peptide mit Polyethylenglykol erfolgen. Es sollten sowohl Versuche unter Simulation von Plasmamilieu als auch Untersuchungen mit Gesamtlängenzym durchgeführt werden. Letzteres würde durch die vorhandene C-terminale Chitinbindungsdomäne den Einsatz hochmolekularen Substrates erlauben. Es wäre weiterhin möglich, Versuche im Mikrotiermodell, beispielsweise mit Mikrofilarien von *A. viteae* oder *B. malayi* durchzuführen. Dabei wären neben der prinzipiellen Erprobung der Inhibitoren auch Verbesserungen des Wirkungsgrades (u. a. hinsichtlich Gewebepenetration) möglich. Schlussendlich wären Untersuchung zur Wirkung der Peptide auf Filarieninfektivität, -mobilität und -fertilität in genannten Tiermodellen (z. B. *Meriones unguiculatus*/*A. viteae*) denkbar. Sollten die therapeutischen Effekte der Moleküle nicht in Form peptidischer Pharmaka umgesetzt werden, können die aufgefundenen Peptidstrukturen als Grundgerüst für peptidomimetische Weiterentwicklungen dienen.

Schließlich sollte die Strukturaufklärung einer Filarienchitinase, z. B. aus *A. viteae*, oder eines Enzym-Inhibitor-Komplexes einer solchen Chitinase mit einem Peptidhemmstoff vorangetrieben werden. Bisher liegen für Filarienchitinase keine Röntgenkristallstrukturanalysen vor. Die Bedeutung von Filarien und die den Chitinasen zugeschriebene Rolle einerseits in der Pathogenese der Filariosen, andererseits im Rahmen der dargestellten therapeutischen Konzepte, machen die Gruppe der Filarienchitinase zu einem lohnenswerten Ziel solcher Strukturuntersuchungen. Die Aufklärung der strukturellen Grundlage der Hemmung solcher Chitinasen durch Peptidinhibitoren kann zudem entscheidend zum Verständnis der enzymatischen Funktionsweise parasitärer Chitinasen beitragen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Chitinasen sind weitverbreitete Enzyme, welche die Hydrolyse von *N*-Acetylglucosamin-Homopolymeren katalysieren. Sie stellen potentielle Zielmoleküle für Inhibitoren mit chemotherapeutischer Wirkung z. B. gegen Bakterien, Pilze oder Parasiten dar. Bekannte Chitinaseinhibitoren bedienen sich überwiegend eines nicht enzyspezifischen, kompetitiven Wirkmechanismus durch Nachahmung von Substraten oder Reaktionsintermediaten.

In der vorliegenden Arbeit sollten peptidische Hemmstoffe für Chitinase aus der Nagerfilarie *Acanthocheilonema viteae* mittels Phagendisplay selektiert und anschließend charakterisiert werden. *A. viteae* gilt als Modellorganismus für *Onchocerca volvulus*, den Erreger der Flussblindheit, einer weitverbreiteten Infektionserkrankung durch humanpathogene Fadenwürmer. Vorhandene Therapien gegen Filariosen zeigen verschiedene, mitunter schwere Nebenwirkungen und sind überwiegend unwirksam gegen adulte Fadenwürmer. Chitinasen sind bedeutsam im Rahmen der Entwicklung und Transmission der Parasiten, die Entwicklung von spezifischen Hemmstoffen dient somit der Etablierung neuer Therapiekonzepte.

Chitinase aus *A. viteae* wurde rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert, gereinigt und kinetisch charakterisiert. Unter Nutzung zweier Phagendisplay-Peptidbibliotheken konnten lineare bzw. disulfidzyklisierte Peptide aufgefunden werden, welche *A. viteae*-Chitinase mit K_i -Werten im unteren mikromolaren Bereich kompetitiv hemmten. Die Peptide erwiesen sich als spezifisch für Chitinase aus *A. viteae* und eng verwandten Filarien. Unter Nutzung von Substitutionsanalysen, zunächst im Rahmen eines Alanin-walks, anschließend mit Hilfe zellulosebasierter Substitutionsbibliotheken, konnten für die Hemmung wichtige Aminosäuren in der Peptidsequenz identifiziert und Hinweise zur Interaktion zwischen Peptiden und Enzym gewonnen werden.

Die aufgefundenen Inhibitoren binden vermutlich über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen an überwiegend konservierte Aminosäurereste der Chitinase. Mittels Strukturmodellierungen und Sequenzanalysen konnten die Ergebnisse der Substitutionsanalysen untermauert und mögliche Mechanismen der beobachteten Spezifität diskutiert werden. Weitere Untersuchungen zur Wirkung der Peptide auf Filarien sowie zur strukturellen Grundlage der gefundenen Chitinasehemmung sind als sinnvoll anzusehen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abdel-Rahman H, Kimura T, Hidaka K, Kiso A, Nezami A, Freire E, Hayashi Y und Kiso Y (2004): Design of inhibitors against HIV, HTLV-I, and *Plasmodium falciparum* aspartic proteases. *Biol Chem*, 385(11):1035-9.

Abraham D, Lucius R und Trees A (2002): Immunity to *Onchocerca* spp. in animal hosts. *Trends Parasitol*, 18(4):164-71.

Adam R, Kaltmann B, Rudin W, Friedrichi T, Marti T und Lucius R (1996): Identification of Chitinase as the Immunodominant Filarial Antigen Recognized by Sera of Vaccinated Rodents. *J Biol Chem*, 271(3):1441-47.

Adams DJ (2004): Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, 150:2029-35.

Anderson RC und Bain O (1976): Keys to genera of the order Spirurida. Part 3: Diplostriaenoidea, Aproctoidea and Filarioidea. In: R. C. Anderson, A. G. Chabaud und S. Willmott (eds.). CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Commonwealth Agricultural Bureaux. Farnham Royal.

Anderson R (2000): Nematode Parasites of Vertebrates—Their Development and transmission. *CAB International*, 1-650.

Arai N, Shiomi K, Yamaguchi Y, Masuma R, Iwai Y, Turberg A, Koelbl H und Omura S (2000): Argadin, a new chitinase inhibitor, produced by *Clonostachys* sp.. *Chem Pharm Bull*, 48:1442-46.

Arakane Y, Zhu Q, Matsumiya M, Muthukrishnan S und Kramer KJ (2003): Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(6):631-48.

Araujo A, Souto-Padrón T und de Souza W (1993): Cytochemical localization of carbohydrate residues in microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. *J Histochem Cytochem*, 41(4):571-8.

Awadzi K, Addy E, Opoku N, Plenge-Bönig A und Büttner D (1995): The chemotherapy of onchocerciasis XX: ivermectin in combination with albendazole. *Trop Med Parasitol*, 46:213-20.

Awadzi K, Attah S, Addy E, Opoku N, Quartey B, Lazdins-Helds J, Ahmed K, Boatin B, Boakye D und Edwards G (2004): Thirty-month follow-up of sub-optimal responders to multiple treatments with ivermectin, in two onchocerciasis-endemic foci in Ghana. *Ann of Trop Med and Parasitol*, 98(4): 359-70.

Azzazy HM und Highsmith WE (2002): Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem*, 35:425-45.

Bain O, Baker M und Chabaud A (1982): New data on the *Dipetalonema* lineage (Filarioidea, Nematoda). *Ann Parasitol Hum Comp*, 57(6):593-620.

Bain O und Babayan S (2003): Behaviour of filariae: morphological and anatomical signatures of their life style within the arthropod and vertebrate host. *Filarial Journal*, 2(1):16.

Bakkers J, Kijne J und Spaink H (1999): Function of chitin oligosaccharides in plant and animal development. *EXS*, 87:71-83.

Bandi C, Anderson T, Genchi C und Blaxter M (1998): Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 265:2407-13.

- Barbas CF** (2001): Bacteriophages -- Laboratory manuals. In: T Kuhlman, D deBruin und P Baker (eds.). Phage Display: a laboratory manual. Carlos F Barbas. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Bazzocchi C, Ceciliani F, McCall JW, Ricci I, Genchi C und Bandi C** (2000): Antigenic role of the endosymbionts of filarial nematodes: IgG response against the *Wolbachia* surface protein in cats infected with *Dirofilaria immitis*. *Proc Biol Sci*, 267(1461):2511–16.
- Behm CA, Bendig MM, McCarter JP und Sluder AE** (2005): RNAi-based discovery and validation of new drug targets in filarial nematodes. *Trends in Parasitology*, 21(3):97-100.
- Bereciba A, Grandjean C und Siriwardena A** (1999): Synthesis and Biological Activity of Natural Aminocyclopentitol Glycosidase Inhibitors: Mannostatins, Trehazolin, Allosamidins, and Their Analogues. *Chem Rev*, 99:779-844.
- Bernet J, Mullick J, Singh A und Sahu A** (2003): Viral mimicry of the complement system. *J Biosci*, 28(3):249-64.
- Bhatnagar R, Arora N, Sachidanand S, Shahabuddin M, Keister D und Chauhan V** (2003): Synthetic propeptide inhibits mosquito midgut chitinase and blocks sporogonic development of malaria parasite. *Biochem Biophys Res Commun*, 304(4):783-7.
- Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel A, Powell B, Carlton R und Merrill C** (2002): Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*, 70(3):204-10.
- Blattner R, Furneaux R und Lynch G** (1996): Synthesis of allosamidin analogues. *Carbohydr Res*, 294:29-39.
- Bleiss W, Oberlander U, Hartmann S, Adam R, Marko A, Schonemeyer A und Lucius R** (2002): Protective immunity induced by irradiated third-stage larvae of the filaria *Acanthocheilonema viteae* is directed against challenge third-stage larvae before molting. *J Parasitol.*, 88(2):264-70.
- Boot RG, Renkema GH, Strijland A, van Zonneveld AJ und Aerts JMFG** (1995): Cloning of a cDNA Encoding Chitotriosidase, a Human Chitinase Produced by Macrophages. *J Biol Chem*, 270:26252-56.
- Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Blik J, de Meulemeester TMAMO, Mannens MMAM und Aerts JMFG** (1998): The Human Chitotriosidase Gene. Nature of Inherited Enzyme Deficiency. *J Biol Chem*, 273:25680-85.
- Boot RG, van Achterberg TAE, van Aken BE, Renkema GH, Jacobs MJHM, Aerts JMFG und de Vries CJM** (1999): Strong Induction of Members of the Chitinase Family of Proteins in Atherosclerosis : Chitotriosidase and Human Cartilage gp-39 Expressed in Lesion Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19:687-94.
- Boot RG, Blommaart EFC, Swart E, Ghauharali-van der Vlugt K, Bijl N, Moe C, Place A und Aerts JMFG** (2001): Identification of a Novel Acidic Mammalian Chitinase Distinct from Chitotriosidase. *J Biol Chem*, 276:6770-78.
- Bortone K, Monzingo AF, Ernst S und Robertus JD** (2002): The Structure of an Allosamidin Complex with the *Coccidioides immitis* Chitinase Defines a Role for a Second Acid Residue in Substrate-assisted Mechanism. *J Mol Biol*, 320:293-302.

- Böttger V, Peters L und Micheel B** (1999): Identification of peptide mimotopes for the fluorescein hapten binding of monoclonal antibody B13-DE1. *J Mol Recognit*, 12(3):191-7.
- Brattig N, Buttner D und Hörauf A** (2001): Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia* endobacteria. *Microbes Infect*, 3:439-46.
- Brurberg M, Nes I und Eijsink V** (1996): Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 142(7):1581-89.
- Brydon L, Gooday G, Chappell L und King T** (1987): Chitin in egg shells of *Onchocerca gibsoni* and *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol Res*, 25:267-72.
- Burritt J, Bond C, Doss K und Jesaitis A** (1996): Filamentous phage display of oligopeptide libraries. *Anal Biochem*, 238(1):1-13.
- Casali P und Notkins A** (1989): Probing the human B-cell repertoire with EBV: polyreactive antibodies and CD5+ B lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 7:513-35.
- Chandrashekar R, Rao U und Subrahmanyam D** (1990): Immune response to *Acanthocheilonema viteae* infection in multimammate rats (*Mastomys natalensis*). *Immunol Cell Biol*, 68:21-26.
- Chet I und Inbar J** (1994): Biological control of fungal pathogens. *Appl Biochem Biotechnol*, 48:37-43.
- Choi E, Zimmerman P, Foster C, Zhu S, Kumaraswami V, Nutman T und Chanock S** (2001): Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. *Genes Immun*, 2(5):248-53.
- Cintin C, Johansen J, Christensen I, Sørensen PPS und Nielsen H** (1999): Serum YKL-40 and colorectal cancer. *Br J Cancer*, 79(9-10):1494-9.
- Clackson T und Wells JA** (1994): In vitro selection from protein and peptide libraries. *Trends in Biotechnology*, 12(5):173-84.
- Cohen-Kupiec R und Chet I** (1998): The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnol*, 9:270-77.
- Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ und Henrissat B** (2003): An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, 328(2):307-17.
- Cunningham B, Lowe D, Li B, Bennett B und Wells J** (1994): Production of an atrial natriuretic peptide variant that is specific for type A receptor. *EMBO J*, 13(11):2508-15.
- Cunningham MW** (2000): Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev*, 13:470-511.
- Cwirla S, Peters E, Barrett R und Dower W** (1990): Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(16):6378-82.
- Davies G und Henrissat B** (1995): Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9):853-9.
- Deegan P, Moran M, McFarlane I, Schofield J, Boot R, Aerts J und Cox T** (2005): Clinical evaluation of chemokine and enzymatic biomarkers of Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*, 35(2):259-67.

- Dennett D** (1995): Darwin's dangerous idea. Evolution and the meanings of life. In: Simon und Schuster (eds.). New York.
- Dixon M, Andersen O, van Aalten D und Eggleston I** (2005): An efficient synthesis of argifin: a natural product chitinase inhibitor with chemotherapeutic potential. *Bioorg Med Chem Lett*, 15(21):4717-21.
- Dixon M, Saint André A, van Aalten DM und Eggleston I** (2007): SPPS the Natural Product Chitinase Inhibitor Argifin: Library Generation and Biological Evaluation. Posterpräsentation im Rahmen des 100jährigen Jubiläums der Universität Bath.
- Dotto G, Enea V und Zinder N** (1981): Functional analysis of bacteriophage fl intergenic region. *Virology*, 114(2):463-73.
- Duo-Chuan L** (2006): Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, 161(6):345-60.
- Elias J, Lee C, Zheng T, Ma B, Homer R und Zhu Z** (2003): New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest*, 111:291-7.
- Elias JA, Homer RJ, Hamid Q und Lee CG** (2005): Chitinases and chitinase-like proteins in TH2 inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 116:497-500.
- Ellis D, Rogers R, Bianco A und Denham D** (1978): Intrauterine development of the microfilariae of *Dipetalonema viteae*. *J Helminthol*, 52(1):7-10.
- Fae K, Oshiro SE, Tanaka AC, Pomerantzeff PMA, Kalil J und Guilherme L** (2006): T cell molecular mimicry and rheumatic heart disease. *International Congress Series*, 1289:293– 95.
- Fan Y, Fan W, Xiao Y, Yang X, Zhang Y, Bidochka M und Pei Y** (2007): Directed evolution for increased chitinase activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76:135-39.
- Felse P und Panda T** (1999): Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51(2):141-51.
- Flach J, Pilet PE und Jolles P** (1992): What's new in chitinase research? *EXS*, 48:701–16.
- Frank R** (2002): The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *Journal of Immunological Methods*, 267(1):13-26.
- Fuhrman J, Lane W, Smith R, Piessens W und Perler F** (1992): Transmission-blocking antibodies recognize microfilarial chitinase in brugian lymphatic filariasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 1548-1552
- Fuhrman J** (1995): Filarial Chitinases. *Parasitology Today*, 11(7):259-61).
- Fujii R, Morihara F, Oku T, Hifumi E und Uda T** (2004): Epitope mapping and features of the epitope for monoclonal antibodies inhibiting enzymatic activity of *Helicobacter pylori* urease. *Biotechnol Bioengl*, 86(4):434-44.
- Fukamizo T** (2000): Chitinolytic Enzymes: Catalysis, Substrate Binding, and their Application. *Current Protein and Peptide Science*, 1:105-24.
- Fusetti F, von Moeller H, Houston D, Rozeboom H, Dijkstra BW, Boot RG, Aerts JM und van Aalten DM** (2002): Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem*, 277(2):25537-44.

- Geiger S, Hoffmann W, Rapp J, Schulz-Key H und Eisenbeiss W** (1996): Filariidae: cross-protection in filarial infections. *Exp Parasitol*, 83(3):352-56.
- Gevorkian G, Segura E, Acero G, Palma J, Espitia C, Manoutcharian K und López-Marín L** (2005): Peptide mimotopes of *Mycobacterium tuberculosis* carbohydrate immunodeterminants. *Biochem J*, 387(2):411-7.
- Gooday G** (1999): Aggressive and defensive roles for chitinases. In: P. Jollès und R. A. A. Muzzarelli (eds.). Chitin and Chitinases (EXS 87). Birkhäuser Verlag. Basel - Boston - Berlin, 157-70.
- Graham LS und Sticklen MB** (1994): Plant chitinases. *Can J Bot*, 72:1057-83.
- Grenfell BT, Michaela E und Denhamb DA** (1991): A model for the dynamics of human lymphatic filariasis. *Parasitology Today*, 7(11):318-23.
- Gupta S und Srivastava AK** (2006): Glutathione metabolism of filarial worms: A vulnerable target for the design and synthesis of new antifilarial agents. *Med Sci Monit*, 12(3):1-9.
- Hahn M, Hennig M, Schlesier B und Höhne W** (2000): Structure of jack bean chitinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 56(9):1096-9.
- Hakala B, White C und Recklies A** (1993): Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem*, 268(34):25803-10.
- Hart PJ, Pfluger HD, Monzingo AF, Hollis T und Robertus JD** (1995): The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* seeds at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 248:402-13.
- Hawtin R, Arnold K, Ayres M, Zanotto P, Howard S, Gooday G, Chappell L, Kitts P, King L und Possee R** (1995): Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology*, 212(2):673-85.
- Henderson C, Bromek K, Mullin N, Smith B, Uhrín D und Barlow P** (2001): Solution structure and dynamics of the central CCP module pair of a poxvirus complement control protein. *J Mol Biol*, 307(1):323-39.
- Henrissat B** (1991): A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 280:309-16.
- Henrissat B und Bairoch A** (1993): New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 293:781-88.
- Henrissat B** (1999): Classification of chitinase modules. In: P. Jollès und R. A. A. Muzzarelli (eds.). Chitin and Chitinases (EXS 87). Birkhäuser Verlag. Basel - Boston - Berlin, 137-57.
- Herrera-Estrello A und Chet I** (1999): Chitinases in biological control. In: P. Jollès und R. A. A. Muzzarelli (eds.). Chitin and Chitinases (EXS 87). Birkhäuser Verlag. Basel - Boston - Berlin, 171-84.
- Hilpert K, Hansen G, Wessner H, Schneider-Mergener J und Höhne W** (2000): Characterizing and optimizing protease/peptide inhibitor interactions, a new application for spot synthesis. *J Biochem (Tokyo)*, 128(6):1051-57.
- Hilpert K, Wessner H, Schneider-Mergener J, Welfle K, Misselwitz R, Welfle H, Hocke AC, Hippenstiel S und Höhne W** (2003): Design and Characterization of a Hybrid Miniprotein That Specifically Inhibits Porcine Pancreatic Elastase. *J Biol Chem*, 278:24986-93.

- Hilpert K, Hansen G, Wessner H, Volkmer-Engert R und Höhne W** (2005): Complete Substitutional Analysis of a Sunflower Trypsin Inhibitor with Different Serine Proteases. *Journal of Biochemistry*, 138(4):383-90.
- Hilpert K, Winkler DF und Hancock RE** (2007): Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nature Protocols*, 2:1333-49.
- Hodge A, Gooday G und Alexander I** (1996): Inhibition of chitinolytic activities from tree species and associated fungi. *Phytochemistry*, 41(1):77-84.
- Hoess R, Mack A, Walton H und Reilly T** (1994): Identification of a structural epitope by using a peptide library displayed on filamentous bacteriophage. *J Immunol Methods*, 153(2):724-9.
- Hollak C, Oers Mv, Weely Sv und Aerts JM** (1994): Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest*, 93(3):1288-92.
- Hollis T, Mozingo A, K Bortone K, Ernst S, Cox R und Robertus JD** (2000): The X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Protein Science*, 9:544-51.
- Honda Y, Kitaoka M und Hayashi K** (2004): Kinetic evidence related to substrate-assisted catalysis of family 18 chitinases. *FEBS Letters*, 567(2-3):307-10.
- Houston DR, Shiomi K, Arai N, Omura S, Peter MG, Turberg A, Synstad B, Eijsink VGH und van Aalten DMF** (2002): High-resolution structures of a chitinase complexed with natural product cyclopentapeptide inhibitors: Mimicry of carbohydrate substrate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(14):
- Houston DR, Eggleston I, Synstad B, Eijsink VGH und van Aalten DMF** (2002): The cyclic dipeptide CI-4 [cyclo-(L-Arg-D-Pro)] inhibits family 18 chitinases by structural mimicry of a reaction intermediate. *Biochem J*, 368:23-27.
- Houston DR, Synstad B, Eijsink VGH, Stark MJR, Eggleston IM und van Aalten DMF** (2004): Structure-Based Exploration of Cyclic Dipeptide Chitinase Inhibitors. *J Med Chem*, 47:5713-20.
- Hyde-DeRuyscher R, Paige L, Christensen D, Hyde-DeRuyscher N, Lim A, Fredericks Z, Kranz J, Gallant P, Zhang J, Rocklage S, Fowlkes D, Wendler P und Hamilton P** (2000): Detection of small-molecule enzyme inhibitors with peptides isolated from phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Chemistry & Biology*, 7:17-25.
- Isaacs S, Kotwal G und Moss B** (1992): Vaccinia virus complement-control protein prevents antibody-dependent complement-enhanced neutralization of infectivity and contributes to virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(2):628-32.
- Izumida H, Imamura N und Sano H** (1996): A novel chitinase inhibitor from marine bacterium *Pseudomonas* sp. *J Antibiot*, 49:76-80.
- Izumida H, Nishijima M, Takadera T, Nomoto A und Sano H** (1996): The effect of chitinase inhibitors, cyclo (Arg-Pro) against cell separation of *Saccharomyces cerevisiae* and the morphological change of *Candida albicans*. *J Antibiot*, 49:829-31.
- Jacobsson K und Frykberg L** (1996): Phage display shot-gun cloning of ligand-binding domains of prokaryotic receptors approaches 100% correct clones. *Biotechniques*, 20(6):1070-6, 78, 80-1.

- James JA, Neas BR, Moser KL, Hall T, Bruner GR, Sestak AL und Harley JB** (2001): Systemic Lupus Erythematosus in Adults Is Associated With Previous Epstein-Barr Virus Exposure. *Arthritis and Rheumatism*, 44(5):1122–26.
- Johansen J, Hvolris J, Hansen M, Backer V, Lorenzen I und Price P** (1996): Serum YKL-40 levels in healthy children and adults. Comparison with serum and synovial fluid levels of YKL-40 in patients with osteoarthritis or trauma of the knee joint. *Br J Rheumatol*, 35:553-9.
- Kato Y, Onishi H und Machida Y** (2003): Application of Chitin and Chitosan Derivatives in the Pharmaceutical Field. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 4(5):303-09.
- Katouno F, Taguchi M, Sakurai K, Uchiyama T, Nikaidou N, Nonaka T, Sugiyama J und Watanabe T** (2004): Importance of Exposed Aromatic Residues in Chitinase B from *Serratia marcescens* 2170 for Crystalline Chitin Hydrolysis. *J Biochem (Tokyo)*, 136:163-68.
- Kawada M, Hachiya Y, Arihiro A und Mizoguchi E** (2007): Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *Keio J Med*, 56(1):21-7.
- Kay B, Adey N, He Y, Manfredi J, Mataragnon A und Fowlkes D** (1993): An M13 phage library displaying random 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets. *Gene*, 128(1):59-65.
- Kay BK, Kasanov J und Yamabhai M** (2001): Screening Phage-Displayed Combinatorial Peptide Libraries. *Methods*, 24(3):240-46.
- Kay B und Kehoe J** (2005): Filamentous phage display in the new millennium. *Chem Rev*, 105(11):4056-72.
- Keitel T, Kramer A, Wessner H, Scholz C, Schneider-Mergener J und Höhne W** (1997): Crystallographic analysis of anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody cross reactivity and polyspecificity. *Cell*, 91:
- Kelly K, Nahrendorf M, Yu A, Reynolds F und Weissleder R** (2006): In vivo phage display selection yields atherosclerotic plaque targeted peptides for imaging. *Mol Imaging Biol*, 8(4):201-7.
- Koga D, Tsukamoto T, Sueshige N, Utsumi T und Ide A** (1989): Kinetics of Chitinase from Yam, *Dioscorea opposita* Thunb. *ric Biol Chem*, 53(12):3121-26.
- Kovvali G und Das K** (2005): Molecular mimicry may contribute to pathogenesis of ulcerative colitis. *FEBS Lett*, 579(11):2261-6.
- Kramer K und Muthukrishnan S** (1997): Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem Mol Biol*, 27:887–900.
- Labadaridis I, Dimitriou E, Theodorakis M, Kafalidis G, Velegraki A und Michelakakis H** (2005): Chitotriosidase in neonates with fungal and bacterial infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 90:531-32.
- Ladner RC** (1995): Constrained peptides as binding entities. *Trends in Biotechnology*, 13(10):426-30.
- Ladner R, Sato A, Gorzelany J und de Souza M** (2004): Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today*, 9(12):525-9.
- Lamla T** (2002): *In vitro* Selektion streptavidinbindender Peptide. Dissertationsschrift zur Erlangung der Doktorwürde. Freie Universität Berlin.

- Lancet D, Sadovsky E und Seidemann E** (1993): Probability model for molecular recognition in biological receptor repertoires: significance to the olfactory system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:3715-19.
- Langer R und Vinetz J** (2001): *Plasmodium* ookinete-secreted chitinase and parasite penetration of the mosquito peritrophic matrix. *Trends Parasitol*, 17(6):269-72.
- Lasters I, Wodak S, Alard P und van Cutsem E** (1988): Structural principles of parallel beta-barrels in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(10):3338-42.
- Libbey JE, McCoy LL und Fujinami R** (2007): Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Intern Rev of Neurobiol*, 127-47.
- Linder M und Terri T** (1997): The roles and function of cellulose-binding domains. *J Biotechnol*, 57:15-28.
- Ling H und Recklies A** (2004): The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Biochem J*, 380(3):651-9.
- Lipovsek D und Plückthun A** (2004): In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J Immunol Methods*, 294(1-2):51-67.
- Lorito M, Woo S, Garcia I, Colucci G, Harman G, Pintor-Toro J, Filippone E, Muccifora S, Lawrence C, Zoina A und Scala F** (1998): Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(14):7860-5.
- Lucius R und Textor G** (1995): *Acanthocheilonema viteae*: Rational design of the life cycle to increase production of parasite material using less experimental animals. *Appl Parasitol*, 36:22-33.
- Luisi P** (2007): Chemical aspects of synthetic biology. *Chem Biodivers*, 4(4):603-21.
- Malaguarnera L, Simporè J, Prodi D, Angius A, Sassu A, Persico I, Barone R und Musumeci S** (2003): A 24-bp duplication in exon 10 of human chitotriosidase gene from the sub-Saharan to the Mediterranean area: role of parasitic diseases and environmental conditions. *Genes Immun*, 4(8):570-4.
- Matsuura T und Yomo T** (2006): In vitro evolution of proteins. *J Biosci Bioeng*, 101(6):449-56.
- Merzendorfer H und Zimoch L** (2003): Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol*, 206:4393-412.
- Merzlyak A und Lee S** (2006): Phage as templates for hybrid materials and mediators for nanomaterial synthesis. *Curr Opin Chem Biol.*, 10(3):246-52.
- Meyer C, Gallin M, Erttmann K, Brattig N, Schnittger L, Gelhaus A, Tannich E, Begovich A, Ehrlich H und Horstmann R** (1994): HLA-D alleles associated with generalized disease, localized disease, and putative immunity in *Onchocerca volvulus* infection. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 91:7515-9.
- Miller C, Shchelkunov S und Kotwal G** (1997): The cowpox virus-encoded homolog of the vaccinia virus complement control protein is an inflammation modulatory protein. *Virology*, 229(1):126-33.
- Morris M, Gros E, Aldrian-Herrada G, Choob M, Archdeacon J, Heitz F und Divita G** (2007): A non-covalent peptide-based carrier for in vivo delivery of DNA mimics. *Nucleic Acids Res*, 35(7):49.
- Mössinger J und Barthold E** (1987): Fecundity and localization of *Dipetalonema viteae* (Nematoda, Filarioidea) in the jird *Meriones unguiculatus*. *Parasitol res*, 74(1):84-87.

- Murdoch M** (1992): The skin and the immune response in onchocerciasis. *Trop Doctor*, 22 (Suppl.1):44-55; 61-62.
- Muzzarelli RAA** (1999): Native, industrial and fossil chitins. In: P. Jollès und R. A. A. Muzzarelli (eds.). Chitin and Chitinases (EXS 87). Birkhäuser Verlag. Basel - Boston - Berlin, 1-8.
- Muzzarelli RAA** (1999): Analytical biochemistry and clinical significance of N-acetyl-D-glucosaminidases and related enzymes. In: P. Jollès und R. A. A. Muzzarelli (eds.). Chitin and Chitinases (EXS 87). Birkhäuser Verlag. Basel - Boston - Berlin, 235-51.
- Müller HA und Zahner H** (2005): Lethal LPS-independent side effects after microfilaricidal treatment in *Acanthocheilonema viteae*-infected rodents. *Parasitol Res*, 97:201-08.
- Nagano N, Porter CT und Thornton JM** (2001): The (alpha-beta)₈ glycosidases: sequence and structure analyses suggest distant evolutionary relationships. *Protein Eng*, 14:845-55.
- Nakamura T, Takasugi H, Aizawa T, Yoshida M, Mizuguchi M, Mori Y, Shinoda H, Hayakawa Y und Kawano K** (2005): Peptide mimics of epidermal growth factor (EGF) with antagonistic activity. *J Biotechn*, 116:211-19.
- Nam K, Kim D, Yoo P, Chiang C, Meethong N, Hammond P, Chiang Y und Belcher A** (2006): Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes. *Science*, 312(5775):885-8.
- Nanduri V, Bhunia A, Tu S, Paoli G und Brewster J** (2007): SPR biosensor for the detection of *L. monocytogenes* using phage-displayed antibody. *Biosens Bioelectron*, 23(2):248-52.
- Nanduri V, Balasubramanian S, Sista S, Vodyanoy V und Simonian A** (2007): Highly sensitive phage-based biosensor for the detection of beta-galactosidase. *Anal Chim Acta*, 589(2):166-72.
- Ningaraju TM, Krishnaraj PU und Krishnamurthy K** (2006): Cloning and expression of chiC gene from *Serratia marcescens* 141. *EMBL/GenBank/DBJ databases*, Entry:Q068W1_SERMA.
- Nissen P, Kjeldgaard M und Nyborg J** (2000): Macromolecular mimicry. *EMBO J*, 19(4):489-95.
- Nordenbaek C, Johansen JuS, Junker P, Borregaard N, Sørensen O und Price PA** (1999): YKL-40, a Matrix Protein of Specific Granules in Neutrophils, Is Elevated in Serum of Patients with Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization. *The Journal of Infectious Diseases*, 180:1722-6.
- Ohno T, Armand S, Hata T, Nikaidou N, Henrissat B, Mitsutomi M, Watanabe T und Labadaridis I** (1996): A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J Bacteriol*, 178(17):5065-70.
- Oldenburg KR, Loganathan D, Goldstein IJ, Schultz PG und Gallop MA** (1992): Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:5393-97.
- Otlewski J und Krowarsch D** (1996): Squash inhibitor family of serine proteinases. *Acta Biochim Pol*, 43(3):431-44.
- Ottesen E** (2000): The global programme to eliminate lymphatic filariasis. *Tropical Medicine and International Health*, 5:591-94.
- Pantchev N** (2006): Konservierte Gene für Oberflächenproteine der Mikrofilarienscheide bei den unbescheidete Mikrofilarien freisetzenden Arten *Acanthocheilonema viteae* und *Onchocerca volvulus*. *VVB Laufersweiler Verlag*, Gießen.

- Park KE, Jung SY, Lee SJ, Min B-M und Park WH** (2006): Biomimetic nanofibrous scaffolds: Preparation and characterization of chitin/silk fibroin blend nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38:165–73.
- Perrakis A, Tews I, Dauter Z, Oppenheim AB, Chet I, Wilson KS und Vorgias CE** (1994): Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure*, 2:1169-80.
- Petter C** (2006): Selektion von Peptidbibliotheken auf Chitinaseinhibitoren und Charakterisierung der Wechselwirkungen. Dissertation zur Erlangerung des akademischen Grades doctor rerum naturalium im Fach Biologie. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Pincus S, Smith M, Jennings H, Burritt J und Glee P** (1998): Peptides that mimic the group B streptococcal type III capsular polysaccharide antigen. *J Immunol*, 160(1):293-8.
- Raabe D, Al-Sawalmih A, Yi SB und Fabritius H** (2007): Preferred crystallographic texture of α-chitin as a microscopic and macroscopic design principle of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*. *Acta Biomaterialia*, unveröffentlicht.
- Raghavan N, Freedman D, Fitzgerald P, Unnasch T, Ottesen E und Nutman T** (1994): Cloning and characterization of a potentially protective chitinase-like recombinant antigen from *Wuchereria bancrofti*. *Infect Immun*, 62:1901-08.
- Rajakumar S, Bleiss W, Hartmann S, Schierack P, Marko A und Lucius R** (2006): Concomitant immunity in a rodent model of filariasis: the infection of *Meriones unguiculatus* with *Acanthocheilonema viteae*. *J Parasitol*, 92(1):41-45.
- Ramanathan M, Lee W und Lane A** (2006): Increased expression of acidic mammalian chitinase in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Rhinol*, 20(3):330-5.
- Rao FV, Houston DR, Boot RG, Aerts JMFG, Sakuda S und van Aalten DMF** (2003): Crystal Structures of Allosamidin Derivatives in Complex with Human Macrophage Chitinase. *J Biol Chem*, 278(2):20110–16.
- Rao FV, Houston DR, Boot RG, Aerts JMFG, Hodgkinson M, Adams DJ, Shiomi K, Omura S und van Aalten DMF** (2005): Specificity and Affinity of Natural Product Cyclopentapeptide Inhibitors against *A. fumigatus*, Human, and Bacterial Chitinases. *Chemistry & Biology*, 12:65–76.
- Razek-Desouky A, Specht C, Soong L und Vinetz J** (2001): Leishmania donovani: expression and characterization of *Escherichia coli*-expressed recombinant chitinase LdCHT1. *Exp Parasitol*, 99(4):220-5.
- Reimer U, Reineke U und Schneider-Mergener J** (2002): Peptide arrays: from macro to micro. *Curr Opin Biotechnol*, 13(4):315-20.
- Renkema GH, Boot RG, Muijsers AO, Donker-Koopman WE und Aerts JMFG** (1995): Purification and Characterization of Human Chitotriosidase, a Novel Member of the Chitinase Family of Proteins. *J Biol Chem*, 270:2198-202.
- Robertus J und Monzingo A** (1999): The structure and action of chitinases. In: P. Jollès und R. A. A. Muzzarelli (eds.). Chitin and Chitinases (EXS 87). Birkhäuser Verlag, Basel - Boston - Berlin, 125-36.
- Rogers R, Ellis D und Denham D** (1976): Studies with *Brugia pahangi*. 14. Intrauterine development of the microfilaria and a comparison with other filarial species. *J Helminthol*, 50:251-57.

- Rothe A, Hosse R und Power B** (2006): In vitro display technologies reveal novel biopharmaceutics. *FASEB J*, 20(10):1599-610.
- Saint André A, Blackwell N, Hall L, Hoerauf A, Brattig N, Volkmann L, Taylor M, Ford L, Hise A, Lass J, Diaconu E und Pearlman E** (2002): The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in the pathogenesis of river blindness. *Science*, 1892-5.
- Sakuda S, Isogai A, Matsumoto S, Suzuki A und Koseki K** (1986): The structure of allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor produced by *Streptomyces* sp. *Tetrahedron Lett.*, 27:2475-78.
- Sakuda S, Isogai A, Matsumoto S und Suzuki A** (1987): Search for microbial insect growth-regulators. 2. allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *J Antibiot*, 40:296-300.
- Sanschagrín F und Levesque RC** (2005): A specific peptide inhibitor of the class B metallo-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia* identified using phage display. *J Antimicrob Chem*, 55:252-55.
- Sato A, Viswanathan M, Kent R und Wood C** (2006): Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr Opin Biotechnol*, 17(6):638-42.
- Schoonhoven A, Rudensky B, Elstein D, Zimran A, Hollak CEM, Groener JE und Aerts JMFG** (2007): Monitoring of Gaucher patients with a novel chitotriosidase assay. *Clinica Chimica Acta*, 381(2):136-39.
- Schönemeyer A, Lucius R, Sonnenburg B, Brattig N, Sabbat R, Schilling K, Bradley J und Hartmann S** (2001): Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*. *J Immunol*, 167:3207-15.
- Schüttelkopf AW, Andersen OA, Rao FV, Allwood M, Lloyd C, Eggleston IM und van Aalten DMF** (2006): Screening-based Discovery and Structural Dissection of a Novel Family 18 Chitinase Inhibitor. *J Biol Chem*, 281:27278-85.
- Semino C und Robbins P** (1995): Synthesis of "Nod"-like chitin oligosaccharides by the *Xenopus* developmental protein DG42. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(8):3498-501.
- Sergeeva A, Kolonin M, Molldrem J, Pasqualini R und Arap W** (2006): Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(15):1622-54.
- Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M und Kaslow D** (1993): Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(9):4266-70.
- Shahabuddin M und Vinetz J** (1999): Chitinases of human parasites and their implications as antiparasitic targets. In: P. Jollès und R. A. A. Muzzarelli (eds.). Chitin and Chitinases (EXS 87). Birkhäuser Verlag. Basel - Boston - Berlin, 223-34.
- Shen Z und Jacobs-Lorena M** (1999): Evolution of Chitin-Binding Proteins in Invertebrates. *J Mol Evol*, 48:341-47.
- Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y und Cheng T** (2006): Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. *Journal of Surgical Research*, 133(2):185-92.
- Shiomi K, Arai N, Iwai Y, Turberg A, Koelbl H und Omura S** (2000): Structure of argifin, a new chitinase inhibitor produced by *Gliocladium* sp. *Tetrahedron Lett.*, 41:2141-43.
- Sidhu SS** (2001): Engineering M13 for phage display. *Biomol Engin*, 18:57-63.

- Smith G und Petrenko V** (1997): Phage Display. *Chem Rev*, 97(2):391-410.
- Soboslay P, Newland H, White A, Erttmann K, Albiez E, Taylor H, Williams P und Greene B** (1987): Ivermectin effect on microfilariae of *Onchocerca volvulus* after a single oral dose in humans. *Trop Med Parasitol*, 38(1):8-10.
- Southworth M, Fuhrman J, Robbins P, Beauregard K und Perler F** (1996): Gene cloning and production of active recombinant *Brugia malayi* microfilarial chitinas. *Gene*, 177(1-2):55-8.
- Spindler K und Spindler-Barth M** (1999): Inhibitors of chitinases. In: P. Jollès und R. A. A. Muzzarelli (eds.). Chitin and Chitinases (EXS 87). Birkhäuser Verlag. Basel - Boston - Berlin, 185-200.
- Stemmer W** (1994): Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature Protocols*, 370(6488):389-91.
- Suzuki K, Taiyoji M, Sugawara N, Nikaidou N, Henrissat B und Watanabe T** (1999): The third chitinase gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem J*, 343:587-96.
- Suzuki K, Sugawara N, Suzuki M, Uchiyama T, Katouno F, Nikaidou N und Watanabe T** (2002): Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 Produced by Recombinant *Escherichia coli*: Enzymatic Properties and Synergism on Chitin Degradation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(5):1075-83.
- Suzuki S, Nakanishi E, Ohira T, Kawachi R, Nagasawa H und Sakuda S** (2006): Chitinase inhibitor allosamidin is a signal molecule for chitinase production in its producing *Streptomyces* I. Analysis of the chitinase whose production is promoted by allosamidin and growth accelerating activity of allosamidin. *J Antibiot (Tokyo)*, 59(7):402-9.
- Synstad B, Gaseidnes S, van Aalten D, Nielsen GV und Eijsink V** (2004): Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *European Journal of Biochemistry*, 271:253-62.
- Tabudravu N, Eijsink V, Gooday G, Jaspars M, Komander D, Legg M, Synstad B und van Aalten D** (2002): Psammaplin a, a chitinase inhibitor isolated from the Fijian marine sponge *Aplysinella rhax*. *Bioorg Med Chem*, 10:1123-28.
- Tachu BJ** (2006): Molecular and immunological characterisation of *Acanthocheilonema viteae* chitinase. Dissertation zur Erlangerung des akademischen Grades doctor rerum naturalium im Fach Biologie. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Taki T, Ishikawa D, Hamasaki H und Handa S** (1997): Preparation of peptides which mimic glycosphingolipids by using phage peptide library and their modulation on beta-galactosidase activity. *FEBS Lett*, 418(1-2):219-23.
- Taylor MJ, Bandi C und Hoerauf A** (2005): *Wolbachia* Bacterial Endosymbionts of Filarial Nematodes. *Advances in Parasitology*, 60:245-84.
- Tellam R** (1996): Protein motifs in filarial chitinases: An alternative view. *Parasitology Today*, 12(7):291-92.
- Ternynck T und Avrameas S** (1986): Murine natural monoclonal autoantibodies: a study of their polyspecificities and their affinities. *Immunol Rev*, 94:99-112.

- Terwisscha-van-Scheltinga A, Kalk K, Beintema J und Dijkstra B** (1994): Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure*, 2:1181-89.
- Terwisscha-van-Scheltinga A, Armand S, Kalk K, Isogai A und Henrissat B** (1995): Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin. *Biochemistry*, 34:15619-623.
- Terwisscha-van-Scheltinga AC, Hennig M und Dijkstra BW** (1996): The 1.8 Å Resolution Structure of Hevamine, a Plant Chitinase/Lysozyme, and Analysis of the Conserved Sequence and Structure Motifs of Glycosyl Hydrolase Family 18. *J Mol Biol*, 262:243-57.
- Tews I, Terwisscha-van-Scheltinga A, Perrakis A, Wilson K und Dijkstra B** (1997): Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *J Am Chem Soc*, 119:7954-59.
- Thomas C, Gooday G, King L und Possee P** (2000): Mutagenesis of the active site coding region of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chiA gene. *J Gen Virol*, 81(5):1403-11.
- Vaaje-Kolstad G, Vasella A, Peter MG, Netter C, Houston DR, Westereng B, Synstad B, Eijsink VGH und van Aalten DMF** (2003): Interactions of a Family 18 Chitinase with the Designed Inhibitor HM508 and Its Degradation Product, Chitobiono-lactone. *J Biol Chem*, 279(5).
- Vaaje-Kolstad G, Houston DR, Rao FV, Peter MG, Synstad B, van Aalten DMF und Eijsink VGH** (2004): Structure of the D142N mutant of the family 18 chitinase ChiB from *Serratia marcescens* and its complex with allosamidin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1696(1):103-11.
- van Aalten D, Synstad B, Brurberg M, Hough E, Riise B, Eijsink V und Wierenga R** (2000): Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(11):5842-7.
- van Aalten DM, Komander D, Synstad B, Gaseidnes S, Peter MG und Eijsink VG** (2001): Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:8979-84.
- Venegas A, Goldstein J, Beauregard K, Oles A, Abdulhayoglu N und Fuhrman J** (1996): Expression of recombinant microfilarial chitinase and analysis of domain function. *Mol Biochem Parasitol*, 78(1-2):149-59.
- Vinetz J, Dave S, Specht C, Brameld K, Xu B, Hayward R und Fidock D** (1999): The chitinase PfCHT1 from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* lacks proenzyme and chitin-binding domains and displays unique substrate preferences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:14061-66.
- Wang S, Chiou S und Chang W** (1997): Production of chitinase from shellfish waste by *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Proc Natl Sci Counc Repub China*, 21(2):71-8.
- Watanabe T, Tanaka H und Mizoguchi E** (1993): Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid as essential residues for chitinase activity. *Biol Chem*, 268:18567-72.
- Weber P, Pantoliano M und Thompson L** (1992): Crystal structure and ligand-binding studies of a screened peptide complexed with streptavidin. *Biochemistry*, 31(39):9350-54.
- Weiser A, Or-Guil M, Tapia V, Leichsenring A, Schuchhardt J, Frömmel C und Volkmer-Engert R** (2005): SPOT synthesis: reliability of array-based measurement of peptide binding affinity. *Anal Biochem*, 342(2):300-11.

- Weiss N** (1970): Parasitologische und immunologische Untersuchungen über die durch *Dipetalonema viteae* erzeugte Nagetierfilariose. *Acta Trop.*, 27: 219-59.
- Welburn S, Arnold K, Maudlin I und Gooday G** (1993): Rickettsia-like organisms and chitinase production in relation to transmission of trypanosomes by tsetse flies. *Parasitology Today*, 107(2):141-5.
- WHO** (2000): Fact sheet No. 102: Lymphatic filariasis. In: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/index.html> (abgerufen am 1.9.2007).
- Willats W** (2002): Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol*, 50(6):837-54.
- Williams S und Davies G** (2001): Protein-Carbohydrate interactions: learning lessons from nature. *Trends in Biotechnology*, 19(9):356-62.
- Wu Y, Adam R, Williams SA und Bianco AE** (1996): Chitinase genes expressed by infective larvae of the filarial nematodes, *Acanthocheilonema viteae* and *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 75:207-19.
- Yuki N** (2005): Carbohydrate mimicry: a new paradigm of autoimmune diseases. *Current Opinion in Immunology*, 17:577-82.
- Zabriskie JB** (1982): Rheumatic fever: a streptococcal-induced autoimmune disease? *Pediatr Ann*, 11:383-96.
- Zahner H und Schares G** (1993): Experimental chemotherapy of filariasis: comparative evaluation of the efficacy of filaricidal compounds in *Mastomys coucha* infected with *Litomosoides carinii*, *Acanthocheilonema viteae*, *Brugia malayi* and *B. pahangi*. *Acta Trop*, 52(4):221-66.
- Zhao J, Zhu H, Wong CH, Leung KY und Fred-Wong WS** (2005): Increased lungkine and chitinase levels in allergic airway inflammation: A proteomics approach. *Proteomics*, 5:2799-807.
- Zhou Y, Wang F und Xiao X** (2002): Structures of the cloned chitinase and its truncant from *A. caviae*. *Prog. Nat. Sci.*, 12:587-92.
- Zhu Z, Zheng T, Homer R, Kim Y, Chen N und Cohn L** (2004): Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science*, 304:1678-82.
- Zoeiby A, Sanschagrin F, Darveau A, Brisson J und Levesque R** (2003): Identification of novel inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* MurC enzyme derived from phage-displayed peptide libraries. *J Antimicrob Chemother*, 51(3):531-43.

Widmung

Für meine Eltern, ohne die ich diese Arbeit (ganz sicher) nicht hätte leisten können.

Danksagung

Mein herzlichster Dank geht an erster Stelle an Prof. Dr. Wolfgang Höhne für die Überlassung des Themas, die kritische Begleitung und fachliche Unterstützung der Arbeit, die kontinuierliche und konstruktive Durchsicht des Manuskriptes und nicht zuletzt sein in mich gesetztes Vertrauen.

Darüberhinaus gilt mein großer Dank Magdalena Swiatecka, die mir die Methodik des Phagendisplays näher gebracht hat, sowie Dr. Gabriele Küttner und Elke Gießmann für die Unterstützung bei der Gewinnung von Chitinase. Ebenso danke ich Helga Wessner für Ihr Verständnis und so manche Hilfe im Kampf mit dem Fluorimeter.

Für die Synthese der Peptide danke ich Dr. Peter Henklein, für die Bereitstellung der membrangebundenen Peptide Dr. Rudolf Volkmer. Ebenso möchte ich Prof. Dr. Richard Lucius für die freundliche Überlassung des Konstruktes zur Chitinaseexpression und von Chitinase für erste Vorversuche danken.

Für die Unterstützung und die herzliche Atmosphäre im Labor möchte ich Christian Tiede und Matthias Paschke danken. Danke auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe für Proteinstrukturforschung.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern Sabine und Hubertus Schwendicke und meiner Freundin Stephanie Schygulla für ihr Vertrauen in mich und ihre liebevolle und verständnisvolle Unterstützung danken.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

Ich, Falk Schwendicke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Peptidische Inhibitoren einer Filarienchitinase: Selektion und Charakterisierung“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift