

# Studien zur oxidativen Faltung des Faktor-XIIIa-Inhibitors Tridegin

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades (*Dr. rer. nat.*) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Charlotte Anneke Bäuml

aus Frankfurt am Main

Bonn, im Dezember 2019

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erstgutachter: Prof. Dr. Diana Imhof Zweitgutachter: PD Dr. Lars Podsiadlowski

Tag der Promotion:19. Februar 2020Erscheinungsjahr:2020

Our greatest weakness lies in giving up. The most certain way to succeed is always to try just one more time.

Thomas A. Edison  $(1847-1931)^1$ 

# Zusammenfassung

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der umfassenden Charakterisierung des Naturstoffs Tridegin. Dieses cysteinreiche, 66 Aminosäuren lange Peptid ist ein spezifischer Inhibitor des letzten Schrittes der Blutgerinnungskaskade, der Fibrinquervernetzung katalysiert durch den Blutgerinnungsfaktor XIIIa (FXIIIa). FXIIIa stellt auch aufgrund seiner Beteiligung an weiteren (patho-)physiologischen Prozessen ein sehr interessantes pharmakologisches Zielprotein dar. Tridegin wurde 1997 im Amazonas-Riesenblutegel (H. ghilianii) identifiziert und seitdem bezüglich einiger struktureller und funktioneller Eigenschaften analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung verschiedener Disulfidverbrückungen im Tridegin für seine Faltung, Struktur und inhibitorische Aktivität gegenüber FXIIIa untersucht. Fünf verschiedene dreifach disulfidverbrückte Trideginisomere wurden gezielt durch eine orthogonale Schutzgruppenstrategie dargestellt: drei zuvor in einer Pufferoxidation identifizierte Disulfidisomere, die allesamt die Disulfidbrücke C19-C25 enthielten, sowie zwei weitere Isomere mit der Knottin-Disulfidverbrückung bzw. dem Leech Antihemostatic Protein (LAP)-Motiv. Durch die Analyse der Strukturwirkungsbeziehungen dieser fühf Isomere wurde gezeigt, dass eine Einschränkung der konformationellen Flexibilität im N-terminalen Peptidteil mit einer Erhöhung der inhibitorischen Potenz des Tridegin einhergeht. In einem parallelen Ansatz wurde festgestellt, dass die C19–C25-Disulfidbrücke der drei zuvor identifizierten Trideginisomere nicht essentiell für die strukturelle und funktionelle Integrität des Peptids ist. Durch die Reduzierung der Synthesekomplexität von drei auf zwei Disulfidbrücken wurden In-vitro-Studien ermöglicht, die demonstrierten, dass Tridegin auch in humanem Vollblut die erhoffte Wirkung zeigt. Darüber hinaus wurde die postulierte Trideginsequenz, die bis dato an verschiedenen Positionen Unklarheiten aufwies, durch eine Sequenzierung von genomischer H. ghilianii-DNA – und der anschließenden Identifizierung des für Tridegin kodierenden Gens – verifiziert.

Die vorliegende Dissertation liefert somit substantielle Einblicke in Strukturwirkungsbeziehungen der oxidativen Faltung des peptidischen FXIIIa-Inhibitors Tridegin, der basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen als Leitstruktur für die medizinische Anwendung weiterentwickelt werden kann. Zudem wurde durch die Genomsequenzierung des *H. ghilianii* eine breite Basis für die Suche nach weiteren potenten Wirkstoffen geschaffen.

## Abstract

This PhD thesis deals with the detailed characterization of the natural compound tridegin. This cysteine-rich 66mer peptide is a specific inhibitor of the last step of the blood coagulation cascade, namely the fibrin crosslinking catalyzed by blood coagulation factor XIIIa (FXIIIa). Also due to its participation in a plethora of further (patho-)physiological processes, FXIIIa represents a very interesting pharmacological target protein. The FXIIIa inhibitor tridegin was identified in the giant amazon leech (*H. ghilianii*) in 1997 and has been analyzed regarding some of its structural and functional properties since.

In the presented work the impact of different disulfide linkages in tridegin on its folding, structure, and inhibitory activity towards FXIIIa was analyzed. Five different 3-disulfidebridged tridegin isomeres were synthesized by an orthogonal protecting group strategy: three disulfide isomers (containing the C19-C25 disulfide bridge) which have been identified in an earlier buffer oxidation as well as two further isomers bearing the *knottin* disulfide connectivity and the leech antihemostatic protein (LAP) motif, respectively. Structureactivity relationship studies of these five isomers led to the conclusion that a limitation of the conformational flexibility in the N-terminal part of the peptide correlates with a higher bioactivity of tridegin. A parallel approach demonstrated that the C19–C25 disulfide bridge, which is present in all three previously identified isomers, is not essential for tridegin's structural and functional integrity. The resulting reduction of disulfide bridges decreased the complexity of synthesis which enabled further *in vitro* studies. Therein, the desired effect of tridegin on human whole blood samples was confirmed. Furthermore, the postulated tridegin sequence, which contained several ambiguities, was verified by sequencing of *H. qhilianii* genomic DNA and the subsequent identification of the tridegin gene in the genome sequence.

The presented PhD thesis thus provides substantial insights into the structure-activity relationships of the oxidative folding in the peptidic FXIIIa inhibitor tridegin. Based on the obtained findings, tridegin can be developed further as a lead structure for medical application. In addition, the genome sequencing of *H. ghilianii* brings about a large basis for the search for further pharmaceutically active compounds in the leech's genome.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung								
1	Einle	Einleitung						
2	Theoretischer Hintergrund							
	2.1	nreiche Peptide/Proteine und oxidative Faltung	3					
		2.1.1	Conotoxine	5				
		2.1.2	Antikoagulative cysteinreiche Peptide	6				
	2.2	Hämos	stase und Herz-Kreislauf-Erkrankungen	8				
	2.3	Fibrinogen und Fibrin		10				
		2.3.1 Fibrinogen – biochemische und strukturelle Charakteristika $\ .$ .		11				
	2.3.2 Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin		Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin	13				
	2.4	$Blutgerinnungsfaktor XIII(a)  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  \dots  $		15				
	2.4.1 FXIIIa – Transglutaminasen und die Transglutaminasereakti		${\rm FXIIIa}$ – Transglutaminas en und die Transglutaminas ereaktion	17				
		2.4.2 $FXIII(a)$ – Vorkommen, Aufbau, Aktivierung		18				
		2.4.3FXIII in der Hämostase		20				
				23				
	2.5	FXIII	(a) – Pathophysiologie	28				
		2.5.1	FXIII-Mangelerkrankungen	28				
	2.5.2 FXIII in kardiovaskulären Erkrankungen		FXIII in kardiovaskulären Erkrankungen	30				
		2.5.3 FXIII in <i>Diabetes mellitus</i> und <i>Adipositas</i>		32				
	2.5.4FXIII und Neoplasien2.5.5FXIII in chronisch-entzündlichen Erkrankungen		FXIII und Neoplasien	32				
			33					
		2.5.6 Weitere Erkrankungen im Zusammenhang mit FXIII		34				
	2.6	2.6 FXIIIa-Inhibition		34				
2.6.1 FXIIIa-Inhibitoren		2.6.1	FXIIIa-Inhibitoren	37				
	2.7	2.7 Tridegin		37				
		2.7.1	Trideginsequenz	38				
		2.7.2 Tridegin – funktionelle Eigenschaften		39				
		2.7.3 Tridegin – strukturelle Eigenschaften						

Mat	erial un	id Methoden					
4.1	1 Chemikalien und Reagenzien						
4.2	Geräte						
4.3	3 Festphasenpeptidsynthese (SPPS)						
	4.3.1	Automatische Festphasenpeptidsynthese					
	4.3.2	Abspaltung der Peptide von der Festphase					
4.4	Reinigung der Peptide mittels semipräparativer HPLC						
4.5	Oxidation der linearen Vorläuferpeptide						
	4.5.1	Dreifach disulfidverbrückte Trideginisomere					
4.6	Peptid	charakterisierung					
	4.6.1	Analytische HPLC					
	4.6.2	Massenspektrometrie					
	4.6.3	Aminosäureanalytik					
4.7	Strukt	urelle Studien					
	4.7.1	Aufklärung der Disulfidverbrückung					
4.8	8 Funktionelle Analytik						
	4.8.1	Enzymatische Aktivitätsassays					
	4.8.2	Zellbasierte Assays					
4.9	Compu	ıterbasierte Studien					
	4.9.1	Molekulare Modellierung					
	4.9.2	Molekulardynamiksimulationen					
	4.9.3	Molekulares Blind Docking (starr)					
	4.9.4	Molekulares <i>Docking</i> (semi-flexibel)					
4.10	Genon	sequenzierung des $H.$ ghilianii					
	4.10.1	Isolierung genomischer DNA					
	4.10.2	PCR-Barcoding zur Species-Bestätigung					
	4.10.3	Analyse der DNA-Fragmentgrößen					
	4.10.4	Sequenzierung genomischer DNA					
4.11	1 Allgemeine Software						
Erge	ebnisse	und Diskussion					
5.1	Darstellung und Charakterisierung der Trideginvarianten						
	5.1.1	Synthese der Trideginvarianten					

	5.1.3 Aufklärung der Disulfidverbrückung in Tridegin Z $\ldots\ldots\ldots$							
		5.1.4	Koelutionsexperimente	80				
	5.2	Funkti	ionelle Studien	81				
		5.2.1	Enzymatische Aktivitätsassays	82				
		5.2.2	Zellbasierte Assays	89				
	5.3	uterbasierte Studien	90					
		5.3.1	Molekulare Modellierung und $Blind\ Docking$ der Isomere D und E $% f(x)=0$ .	91				
		5.3.2	Molekulardynamik simulationen der Tridegini somere und -analoga . $\ .$	92				
	5.3.3 Semi-flexibles molekulares <i>Docking</i> der Trideginanaloga an F							
	5.3.4 Semi-flexibles molekulares <i>Docking</i> der Trideginisomere an FXI							
	5.4 Bedeutung der Disulfidverbrückung in Tridegin $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$							
	5.5	5.5 Identifizierung der nativen Trideginsequenz in $H.$ ghilianii						
		Isolation genomischer DNA aus <i>H. ghilianii</i> -Gewebe	104					
		5.5.2	PCR-Barcoding und Analyse der DNA-Fragmentgrößen	105				
		5.5.3	Sequenzierung der genomischen DNA aus <i>H. ghilianii</i>	107				
		5.5.4	Identifizierung des für Tridegin kodierenden Gens	108				
6	Fazi	t und A	Ausblick	109				
Li	Literaturverzeichnis							
AI	okürz	ungsvei	rzeichnis	161				
Abbildungsverzeichnis								
Tabellenverzeichnis								
Danksagung								
Ve	Veröffentlichungen							

# 1 Einleitung

Die medizinische Anwendung von Blutegeln wurde bereits in Wandgemälden der Pharaonengräber im alten Ägypten (1567-1308 v. Chr.) gezeigt. Seitdem taucht der Blutegel in Aufzeichnungen verschiedener Hochkulturen wie der Chinesen, Inder, Perser, Araber und Römer auf. Die Verwendung des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis* (*H. medicinalis*), des heutzutage wohl am besten charakterisierten Blutegels, hatte in Europa im 18. und 19. Jahrhundert ihre Blütezeit.<sup>2</sup> Der weitaus weniger bekannte Amazonas-Riesenblutegel *Haementeria ghilianii* (*H. ghilianii*) fand erstmals im Jahre 1848 durch Filippo de Filippi in *Memorie della Reale Accademia delle Scienze di Torino* Erwähnung.<sup>3</sup> *H. ghilianii* galt nach seiner ersten Beschreibung lange Jahre als ausgestorben, bevor Roy T. Sawyer in den Siebzigerjahren des 20. Jahrhunderts im Rahmen einer Expedition nach Französisch-Guyana einige Exemplare finden konnte und begann, den Speichelextrakt dieser seltenen Art zu charakterisieren.<sup>4</sup>

Mit Hementin wurde – im Gegensatz zu den bis dato bekannten Substanzen, die 'lediglich' die Blutgerinnung hemmten – im Speichelextrakt des *H. ghilianii* erstmals ein Enzym gefunden, das in der Lage ist, bereits gebildete Blutgerinnsel wieder aufzulösen.<sup>5</sup> Da dieses Enzym Thromben, deren Fibrinstruktur nicht quervernetzt war, deutlich effektiver zersetzen konnte, suchte man im Speichelextrakt nach einem Molekül, das die Fibrinquervernetzung hemmte, und stieß auf das Peptid Tridegin.<sup>6</sup> Der Fund dieser – im Vergleich zu den bis dahin bekannten Wirkstoffen aus kleineren Egelarten wie dem *H. medicinalis* – ungewöhnlichen Substanzen, verbunden mit dem Verdacht auf die Existenz weiterer potenter Moleküle, machen den *H. ghilianii* zu einem hochinteressanten Forschungsobjekt.

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der detaillierten Charakterisierung des Tridegin aus *H. ghilianii*. Dieses Peptid ist ein potenter und spezifischer Inhibitor des letzten Schrittes der Blutgerinnungskaskade – der Quervernetzung von Fibrinpolymeren zu einem stabilen Fibringerinnsel. Eine pharmakologische Adressierung des für diesen Schritt verantwortlichen Enzyms (Blutgerinnungsfaktor XIII, FXIII), welche – statt eines massiven Eingriffs in das hämostatische Gleichgewicht – eine erleichterte Thrombolyse im Patienten zur Folge hätte, ist in Anbetracht der gefährlichen Nebenwirkungen herkömmlicher Antikoagulanzien eine vielversprechende Perspektive für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen.

# 2 Theoretischer Hintergrund

## 2.1 Cysteinreiche Peptide/Proteine und oxidative Faltung

Die proteinogene Aminosäure Cystein zeichnet sich unter anderem dadurch aus, dass beim Auftreten von mindestens zwei Cysteinen in einer oder mehreren Peptidketten durch Oxidation der Thiolgruppen Disulfidbrücken gebildet werden können. Diese Disulfidbrücken stabilisieren die Tertiär- und Quartärstrukturen einer Vielzahl von Proteinen und Peptiden und tragen so maßgeblich zu deren funktioneller Integrität bei.<sup>7</sup> Wie genau insbesondere die Disulfidbrücken innerhalb der ersten 100 Aminosäuren (AS) eines Proteins bzw. alle Disulfidbrücken kleinerer Proteine (sogenannter Miniproteine) oder cysteinreicher Peptide gezielt im Organismus gebildet werden, ist aktuell weitestgehend unklar. Verschiedene Studien haben sich in den letzten Jahren mit der Faltung entstehender Polypeptidketten in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen beschäftigt.<sup>8–13</sup> Da die Faltung cotranslational erst ab einer Länge von etwa 100 AS durch *Chaperone* (engl. *chaperones* Anstandsdamen, Faltungshelferproteine) im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) unterstützt werden kann,<sup>12</sup> erscheint eine autonome (Vor-)Faltung der Peptidkette plausibel.

Bei der sogenannten 'oxidativen Faltung' werden unter oxidativen Bedingungen, welche extrazellulär und in intrazellulären Kompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat vorherrschen, zwischen Cysteinen Disulfidbrücken ausgebildet. Dabei reagieren zwei Cysteinreste zu einem Cystinrest.<sup>7,14</sup> Oxidative Faltungswege verschiedener cysteinreicher Peptide und Proteine wurden experimentell untersucht und anhand der Beobachtungen verschiedene Theorien zum Faltungspfad aufgestellt. In der Proteinfaltung wird hauptsächlich zwischen dem *Framework*-Modell, dem Nukleations-Kondensations-Modell und dem Modell des hydrophoben Kollaps unterschieden.<sup>15</sup>

Das Framework-Modell (auch hierarchisches Modell, sequentielles Faltungsmodell oder Diffusions-Kollisions-Modell) fand im Jahre 1973 durch Oleg B. Ptitsyn das erste Mal Erwähnung.<sup>16</sup> Nach diesem Modell beginnt die Faltung durch die Bildung von Sekundärstrukturdomänen, welche durch Interaktion (Diffusionskollision) untereinander ein dynamisches Faltungsintermediat bilden. Schließlich werden stabile tertiäre Kontakte gebildet, wodurch die finale Struktur entsteht.<sup>17</sup> Charakteristisch für dieses Modell ist, dass zunächst Sekundärstruktur<br/>domänen gebildet werden, welche danach durch tertiäre Interaktion zu einem kompakten Inter<br/>mediat kollabieren. $^{18}$ 

Im Modell des hydrophoben Kollapses wird angenommen, dass die Aminosäurenkette eines Proteins rund um hydrophobe Seitenketten kollabiert und sich dann im beschränkten konformationellen Raum des Intermediats zur finalen Struktur neu ordnet. Die Bildung der Sekundärstrukturen wird in diesem Modell durch tertiäre Interaktionen geleitet, die denen in der nativen Struktur ähneln.<sup>18,19</sup> Hierbei findet im Gegensatz zum *Framework*-Modell zunächst der Kollaps statt; Sekundärstrukturen werden im Anschluss daran im bereits eingeschränkten Raum gebildet.<sup>18</sup>

Das Nukleations-Kondensations-Modell basiert dagegen auf der Annahme, dass der Faltungsprozess eine Startstruktur benötigt – einen Faltungsursprung oder -nukleus ähnlich einem Kristallisationskeim. Die Bildung dieses diffusen Nukleus ist der limitierende Schritt und mit der Kondensation der Struktur gekoppelt. Folglich bilden sich Nukleus, sekundäre und teriäre Kontakte gleichzeitig. Dieses Modell kommt im Gegensatz zu den beiden zuvor beschriebenen Modellen ohne stabile und somit nachweisbare Intermediate aus.<sup>20</sup>

Die drei Faltungsmodelle sind generell für alle Proteine und Peptide anwendbar (Abbildung 2.1). Überträgt man sie nun konkret auf die oxidative Faltung von cysteinreichen Peptiden und Proteinen, beschreibt das *Framework*-Modell (bei insgesamt drei nativen Disulfidbrücken) die schnelle Ausbildung zweier nativer Disulfidbrücken sowie von Sekundärstrukturen als Intermediat, das durch tertiäre Kontakte schließlich die dritte native Disulfidbrücke und somit die native Struktur ausbildet. Der bekannteste Vertreter dieses Faltungspfades ist der bovine pankreatische Trypsininhibitor (BPTI).<sup>15,21</sup>

Das Modell des hydrophoben Kollapses übertragen auf oxidative Faltung beschreibt hingegen die Bildung verschiedener nicht-nativer Disulfidbrücken, also vieler nicht-nativer Isomerenintermediate anstatt nur einiger weniger Intermediate. Durch tertiäre Kontakte und Disulfid-Scrambling<sup>22</sup> werden hier schließlich ebenfalls die nativen Disulfidbrücken gebildet, bzw. die der Intermediate ausgetauscht, sodass die native Struktur erhalten wird. Das bedeutendste Beispiel für einen solchen Faltungsweg ist Hirudin, ein Thrombininhibitor aus dem medizinischen Blutegel H. medicinalis.<sup>15</sup>

Verhalten sich cysteinreiche Peptide während der oxidativen Faltung teilweise ähnlich wie Hirudin und teilweise ähnlich wie BPTI, wird von einem BPTI-Hirudin-Hybridfaltungsweg gesprochen, welcher konsistent mit dem Nukleations-Kondensations-Modell ist. Ein Vertreter dieses Faltungsweges ist zum Beispiel das *Tick Anticoagulant Peptide* (TAP) aus der Lederzecke (*Ornithodoros moubata*).<sup>15,21</sup>



**Abbildung 2.1:** Schemata der klassischen Proteinfaltungsmodelle (oben) und ihre Übertragbarkeit auf cysteinreiche Peptide (unten). Details sind Abschnitt 2.1 zu entnehmen. Als disulfidhaltige Vertreter der drei Faltungswege sind die Peptide Hirudin (PDB 2HIR,<sup>23</sup> links), TAP (PDB 1D0D,<sup>24</sup> mittig) und BPTI (PDB 1UUA, rechts) abgebildet.

#### 2.1.1 Conotoxine

Cysteinreiche Peptide und Proteine kommen in vielen Organismen vor und haben eine große Vielfalt an biologischen Funktionen, weshalb sie seit Jahrzehnten Gegenstand der Forschung sind.<sup>25</sup> Die Toxine mariner Kegelschnecken, sogenannte Conotoxine, sind dabei von besonderem Interesse, da sie durch ihre spezifischen Effekte ein großes Potential für die medizinische Anwendung, insbesondere in der Schmerztherapie, haben.<sup>26</sup> Ziconotid (Prialt<sup>®</sup>) ist in diesem Zusammenhang das erste Conotoxin, das Marktreife erlangt hat und heutzutage in der Therapie chronischer Schmerzen verwendet wird.<sup>27</sup>

Unsere Arbeitsgruppe hat sich insbesondere mit dem  $\mu$ -Conotoxin PIIIA aus *Conus purpurascens* befasst. Im Zuge der Charakterisierung dieses Conotoxins stellte sich heraus, dass nicht nur das native Disulfidisomer (mit *Knottin*-Disulfidverbrückung C1–C4, C2–C5, C3–C6) Bioaktivität zeigt, sondern weitere aktive Isomere auftreten.<sup>28</sup> Durch die gezielte Synthese aller 15 möglichen  $\mu$ PIIIA-Disulfidisomere wurde eine Strukturanalyse dieser Isomere möglich.<sup>29</sup> Zudem wurden die Aktivitäten der verschiedenen Isomere am Natriumkanal Na<sub>V</sub>1.4 analysiert, was bestätigte, dass mehrere Isomere – und eben nicht nur das native Isomer – funktionell aktiv sind.<sup>30</sup>

Aufgrund der aufwendigen Synthese cysteinreicher Peptide mit mehr als zwei Disulfidbrücken wurden verschiedene Anstrengungen unternommen, disulfidreduzierte Analoga zu untersuchen. So gelang es, mithilfe von Molekulardynamiksimulationen vorauszusagen, ob die Eliminierung einer Disulfidbrücke bei verschiedenen Conotoxinen kleine oder große Auswirkungen auf die Peptidstruktur hat und somit als günstig oder ungünstig angesehen wird.<sup>31</sup> In diesem Zusammenhang wurden die µ-Conotoxine GIIIA, KIIIA, PIIIA, PMIIIA und SIIIA auch den bereits beschriebenen oxidativen Faltungswegen (BPTI bzw. Hirudin) zugeordnet.<sup>31</sup>

#### 2.1.2 Antikoagulative cysteinreiche Peptide

Eine weitere Gruppe interessanter Peptide sind solche, die antikoagulativ wirken und z.B. in Zecken oder Blutegeln vorkommen. Neben dem bekanntesten Vertreter Hirudin wurde eine Vielzahl weiterer antikoagulative Peptide in verschiedenen Blutegeln identifiziert. Vielen dieser Peptide ist gemein, dass sie durch mehrere Disulfidbrücken stabilisiert werden. Anhand der Anzahl an Cysteinen sowie der Disulfidkonnektivität lassen sich einige dieser Inhibitoren zwei Gruppen zuordnen, dem Antistasin-Typ (10 Cysteine, Verbrückung C1–C3, C2–C4, C5–C8, C6–C9) und dem *leech antihemostatic protein* (LAP-)Typ (6 Cysteine, Verbrückung C1–C2, C3–C5, C4–C6).<sup>32–34</sup> Eine Übersicht zu antikoagulativ wirkenden cysteinreichen Peptiden aus verschiedenen Blutegeln ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

Der bekannteste Vertreter ist das bereits erwähnte Hirudin, ein 65 AS langes Peptid mit sechs Cysteinen und somit drei Disulfidbrücken. Hirudin wurde ursprünglich im Speichelextrakt des *H. medicinalis* entdeckt.<sup>35</sup> Mittlerweile wurden auch verwandte Peptide in anderen Blutegeln identifiziert. Hirudin hemmt den Blutgerinnungsfaktor Thrombin mit bemerkenswerter Potenz ( $k_i = 20 \text{ fM}$ ).<sup>36</sup> Lepirudin (Refludan<sup>®</sup>) und Desirudin (Revasc<sup>®</sup>) sind rekombinante Hirudinpräparate, die Marktreife erlangt haben. Es wurden Hirudinabkömmlinge mit verbesserten Eigenschaften (Bivalirudin, Argatroban, Efegatran, Inogatran, Melagatran, Ximelagatran)<sup>37–40</sup> für den Einsatz in der Klinik entwickelt – während die beiden rekombinanten Hirudinpräparate Desirudin und Lepirudin mittlerweile vom Markt genommen wurden, da die Hersteller der beiden Wirkstoffe die Belieferung dauerhaft eingestellt haben. Darüber hinaus findet das direkte Ansetzen lebender Blutegel am Patienten beispielsweise in der Chirurgie bei Replantationen Anwendung.<sup>2, 41, 42</sup>

An der notwendigen Weiterentwicklung der Hirudinwirkstoffe lässt sich bereits die Komplexität des Eingriffs in die Blutgerinnung (Hämostase) erahnen. Für ein besseres Verständnis wird im nächsten Kapitel auf die zugrundeliegenden Prozesse sowie damit verbundene kardiovaskuläre Erkrankungen näher eingegangen.

Peptid	Ursprung	Zielstruktur	Sequenz					
Antistasin-Typ								
Antistasin <sup>43</sup>	Haementeria officinalis	FXa	MIKLAILLLF TVAIVR <mark>C</mark> QGP FGPG <mark>C</mark> EEAG <mark>C</mark> PEGSA <mark>C</mark> NIIT DR <mark>C</mark> TCSGVR <mark>C</mark> RMH <mark>C</mark> PHGFQR					
			SRYG <mark>C</mark> EF <mark>CKC</mark> RLEPMKAT <mark>C</mark> D ISE <mark>C</mark> PEGMM <mark>C</mark> SRLTNK <mark>CDC</mark> K IDINCRKT <mark>C</mark> P NGLKRDKLG <mark>C</mark>					
			EY <mark>CEC</mark> RPKRK LIPRLS					
Guamerin <sup>44, 45</sup>	Hirudo nipponia	Elastase	VDENAEDTHG L <mark>C</mark> GEKT <mark>C</mark> SPA QV <mark>C</mark> LNNE <mark>C</mark> AC TAIR <mark>C</mark> MIF <mark>C</mark> P NGFKVDENG <mark>C</mark> EYP <mark>CTC</mark> A					
Ghilanten <sup>32, 46</sup>	Haementeria ghilianii	FXa	QGPFGPG <mark>C</mark> EE AG <mark>C</mark> PEGSA <mark>C</mark> N IITDR <mark>CTC</mark> PE VR <mark>C</mark> RVY <mark>C</mark> SHG FQRSRYG <mark>C</mark> EV <mark>CRC</mark> RTEPMKA					
			T <mark>C</mark> DISE <mark>C</mark> PEG MMCSRLTNKC DCKIDINCRK TCPNGLKRDK LGCEYCECKP KRKLVPRLS					
Hirustasin <sup>47</sup>	Hirudo medicinalis	Kallikrein	TQGNT <mark>C</mark> GGET <mark>C</mark> SAAQV <mark>C</mark> LKG K <mark>CVC</mark> NEVH <mark>C</mark> R IR <mark>C</mark> KYGLKKD ENG <mark>C</mark> EYP <mark>C</mark> SC AKASQ					
Piguamerin <sup>48</sup>	Hirudo nipponia	Kallikrein	TD <mark>C</mark> GGKT <mark>C</mark> SE AQV <mark>C</mark> KDGK <mark>C</mark> V CVIGQ <mark>C</mark> RKY <mark>C</mark> PNGFKKDENG CTFP <mark>C</mark> TCA					
Therostasin <sup>49</sup>	Theromyzon tessulatum	FXa	MRGLAVLLLV A <mark>C</mark> FCSVAFGD <mark>C</mark> ENTE <mark>C</mark> PRA <mark>C</mark> PGEYEFDEDG CNT <mark>CLC</mark> KG <mark>C</mark> N DAQ <mark>C</mark> RIY <mark>C</mark> PL					
			GFTTDANG <mark>C</mark> E SF <mark>C</mark> TCNTRET V <mark>C</mark> QNVV <mark>C</mark> SGK RV <mark>C</mark> NPRSGR <mark>C</mark> E					
Yagin <sup>50</sup>	Hirudo medicinalis	FXa	15,4 kDa; 133 AS (keine Sequenz veröffentlicht; Zuordnung zu Antistasin-Typ.)					
LAP-Typ								
Bufrudin <sup>51</sup>	Hirudinaria manillensis	Thrombin	VSYTD <mark>C</mark> TESG QNY <mark>CLC</mark> VGSN V <mark>C</mark> GEGKN <mark>C</mark> QL SSSGNQ <mark>C</mark> VHG EGTPKPKSQT EGDFEEIPDE XIK					
Decorsin <sup>33</sup>	Macrobdella decora	GPIIb/IIIa	APRLPQ <mark>C</mark> QGD DQEK <mark>CLC</mark> NKD E <mark>C</mark> PPGQ <mark>C</mark> RFP RGDADPY <mark>C</mark> E					
Hirudin <sup>52</sup>	Hirudo medicinalis	Thrombin	VVYTD <mark>C</mark> TESG QNL <mark>CLC</mark> EGSN V <mark>C</mark> GQGNK <mark>C</mark> IL GSDGEKNQ <mark>C</mark> V TGEGTPKPQS HNDGDFEEIP EEYLQ					
Hirullin-P18 <sup>51, 53</sup>	<sup>b</sup> Hirudinaria manillensis	Thrombin	VSYTD <mark>C</mark> TSGQ NY <mark>CLC</mark> GGNF <mark>C</mark> GDGKH <mark>C</mark> EMDG SENK <mark>C</mark> VDGEG TPKRQTSGPS DFEEFSLDDI EQ					
Haemadin <sup>34</sup>	Haemadipsa sylvestris	Thrombin	IRFGMGKVP <mark>C</mark> PDGEVGYT <mark>C</mark> D <mark>C</mark> GEKI <mark>C</mark> LYGQ S <mark>C</mark> NDGQ <mark>C</mark> SGD PKPSSEFEEF EIDEEEK					
Ornatin-A2 <sup>54</sup>	Placobdella ornata	GPIIb/IIIa	IPQ <mark>C</mark> RDVKES GQPNDK <mark>CRC</mark> N GKP <mark>C</mark> TVGK <mark>C</mark> T IARGDDNDK <mark>C</mark> T					
Ornatin-B <sup>54</sup>	Placobdella ornata	GPIIb/IIIa	IYVRPTNDEL NY <mark>C</mark> GDFRELG QPDKK <mark>C</mark> RCDG KP <mark>C</mark> TVGR <mark>C</mark> KF ARGDNDDK <mark>C</mark> I SA					
Kazal-Typ								
Bdellin B-3 <sup>55, 56</sup>	Hirudo medicinalis	Plasmin	DTE <mark>CVC</mark> TKEL HRV <mark>C</mark> GSDGVT YDNE <mark>C</mark> LAT <mark>C</mark> H GASVAHDHA <mark>C</mark> EGHEEHHVDE HGEDHD					
Ohne Zuordnung								
Granulin <sup>57</sup>	Hirudo nipponia	Thrombin	ID <mark>C</mark> PDKSK <mark>C</mark> K DDNT <mark>CC</mark> EVPS GKFA <mark>CC</mark> DLPE AV <mark>CC</mark> ADKMH <mark>C C</mark> PPKS (6 kDa; N-terminal fragment)					
LCI <sup>58, 59</sup>	Hirudo medicinalis	Carboxy-	SHTPDESFL <mark>C</mark> YQPDQV <mark>CC</mark> FI <mark>C</mark> RGAAPLPSE GE <mark>C</mark> NPHPTAP W <mark>C</mark> REGAVEWV PYSTGQ <mark>C</mark> RTT <mark>C</mark> IPYVE					
		peptidase B						
Saratin <sup>60, 61</sup>	Hirudo medicinalis	vWF-Kollagen-	EERED <mark>C</mark> WTFY ANRKYTDFDK SFKKSSDLDE <mark>C</mark> KKT <mark>C</mark> FKTEY <mark>C</mark> YIVFEDTVN KE <mark>C</mark> YYNVVDG					
60		Interaktion	EELDQEKFVV DENFTENYLT D <mark>C</mark> EGKDAGNA AGTGDESDEV DED					
Theromin <sup>62</sup>	Theromyzon tessulatum	Thrombin	E <mark>C</mark> ENTE <mark>C</mark> PRA <mark>C</mark> PGEYEFDED G <mark>C</mark> NT <mark>CVC</mark> KG <mark>C</mark> DDAQ <mark>CRC</mark> SSD ANG <mark>C</mark> ESF <mark>CTC</mark> NTR <mark>C</mark> SAADE <mark>C</mark> NPR <mark>CTC</mark> K					
Tridegin⁵	Haementeria ghilianii	FXIIIa	KLLP <mark>C</mark> KEWHQ GIPNPR <mark>C</mark> W <mark>C</mark> G ADLE <mark>C</mark> AQDQY <mark>C</mark> AFIPQ <mark>C</mark> RPR SELIKPMDDI YQRPVEFPNL PLKPRE					

 Tabelle 2.1: Cysteinreiche antikoagulative Peptide aus Blutegeln, strukturell in vier Gruppen unterteilt. Cysteine sind gelb markiert.

LAP Leech Antihemostatic Protein GP Glycoprotein LCI Leech Carboxypeptidase Inhibitor vWF von-Willebrand-Faktor

### 2.2 Hämostase und Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie ischämische Herzkrankheit, ischämischer Schlaganfall und venöse Thromboembolie sind weltweit die häufigste Todesursache (31 %, 2016) und machten in Deutschland 2017 mit 344 530 Todesfällen sogar 37 % aus.<sup>63,64</sup> Die zugrundeliegende Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Bildung einer Thrombose.

Eine Thrombose entsteht durch die Kombination von dysregulierter Hämostase (Hyperkoagulabilität), Veränderungen der Gefäßfunktion und Veränderungen der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes (Stase) – die sogenannte *Virchow-Trias.*<sup>65</sup> Bei der Hämostase handelt es sich um ein komplexes System, welches hier in Grundzügen dargestellt wird, um die Bedeutung von Fibrin(ogen) und Blutgerinnungsfaktor XIII (FXIII) zu verdeutlichen. Die Hämostase wird in primäre und sekundäre Hämostase unterteilt. In der primären Hämostase findet die Thrombozytenaggregation und damit einhergehend die Bildung des sogenannten 'weißen' Thrombus statt.<sup>66</sup> Während der sekundären Hämostase wird unlösliches Fibrin gebildet, welches sich als Netz in und um den bestehenden Thrombus anlagert. Fibrin sorgt für eine Stabilisierung des Thrombus. Die beiden genannten Gerinnungsprozesse finden gleichzeitig statt und sind mechanistisch eng miteinander verflochten.<sup>66</sup>

Die sekundäre Hämostase wurde historisch in einen intrinsischen und einen extrinsischen Pfad aufgeteilt, die beide eine mehrstufige Abfolge der Aktivierung von Proteinen im zellfreien Plasma beschreiben. Diese Unterteilung wird teilweise aus didaktischen Gründen noch verwendet, bildet allerdings nicht ab, was *in vivo* passiert. Mittlerweile ist ein zellbasiertes Modell etabliert,<sup>66,67</sup> das aus drei überlappenden Phasen besteht, die nachfolgend skizziert werden. Aktivierte Blutgerinnungsfaktoren sind durch ein 'a' gekennzeichnet.

1. Initiation

Die Phase der Inititation findet vorrangig auf der Oberfläche von Fibroblasten und weiteren extravaskulären Zelltypen statt. Diese Zellen tragen auf ihrer Oberfläche den sogenannten *Tissue Factor* (TF, Gewebefaktor). Bei einer Verletzung der Gefäßwand kommt Plasma in Kontakt mit den TF-exprimierenden extravaskulären Zellen. Blutgerinnungsfaktor VII (FVII) bindet an TF und wird durch verschiedene Proteasen zu FVIIa aktiviert. Der FVIIa-TF-Komplex aktiviert nun FX und FIX. FXa kann – wie auch zelluläre Proteasen – FV aktivieren.<sup>68–70</sup> Der durch den FVIIa-TF-Komplex aktivierte FXa wird durch den *TF Pathway Inhibitor* (TFPI) oder Antithrombin III (ATIII) inhibiert, sobald er die Umgebung der Zelloberfläche verlässt.<sup>67</sup> Der auf der Zelloberfläche verbleibende FXa kann jedoch mit FVa zusammen kleine Mengen an Thrombin produzieren, was bei der Aktivierung von Thrombozyten und FVIII während der Amplifikationsphase eine wichtige Rolle spielt.<sup>67,71</sup>

#### 2. Amplifikation

Durch eine Verletzung der Gefäßwand kommen auch Thrombozyten in Kontakt mit extravaskulärem Gewebe. Diese sind für die Phase der Amplifikation von besonderer Bedeutung. Thrombozyten heften sich an extrazelluläre Matrixproteine, wodurch sie partiell aktiviert und in räumliche Nähe zu den TF-exprimierenden Zellen gebracht werden.<sup>67</sup> Die bereits beschriebenen kleinen Mengen an Thrombin, die in der Initiationsphase generiert wurden, verstärken nun den Koagulationsprozess durch eine Steigerung der Thrombozytenhaftung und vollständigen Thrombozytenaktivierung sowie Aktivierung der Faktoren V, VIII und XI.<sup>71,72</sup> Die Thrombozytenaktivierung mittels Thrombin erfolgt durch die Bindung an Protease-aktivierende Rezeptoren (PAR) auf der Thrombozytenoberfläche.<sup>73</sup> Thrombozyten schütten während ihrer Aktivierung partiell-aktivierten FV aus α-Granula aus.<sup>74</sup> FV wird schließlich durch Thrombin oder FXa vollständig aktiviert.<sup>68</sup> Thrombin bindet auch an nicht-PAR-Rezeptoren wie GPIb/IX auf der Thrombozytenoberfläche. Dieses gebundene Thrombin ist in der Lage, andere Blutgerinnungsfaktoren wie den vWF(von-Willebrand-Faktor)-FVIII-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche zu aktivieren. FVIII wird durch Thrombin gespalten und dadurch aktiviert sowie aus dem Komplex mit vWF gelöst.<sup>75</sup> Die Thrombozyten liegen nun aktiviert vor und FVa wie auch FVIIIa sind an ihrer Oberfläche gebunden, wodurch die Voraussetzungen für die Propagationsphase geschaffen sind und die Assemblierung der Gerinnungskomplexe sowie die Thrombingenerierung im großen Maßstab beginnen.<sup>67</sup>

#### 3. Propagation

Während der Propagationsphase werden zwei Koagulationskomplexe auf der aktivierten Thrombozytenoberfläche gebildet: Der *Tenase*-Komplex (FVIIIa/FIXa) und der *Prothrombinase*-Komplex (FXa/FVa). Beide Komplexe sind mit Calciumionen und gerinnungsaktiven Phospholipiden der Thrombozytenmembran assoziiert.<sup>76,77</sup> Thrombozyten exprimieren hochaffine Rezeptoren für FIX(a), FX(a) und FXI.<sup>78–80</sup> Diesen Bindungsstellen wird bei der Koordination der Bildung von Koagulationskomplexen eine große Bedeutung beigemessen.<sup>67</sup> Der *Tenase*-Komplex (FVIIIa/FIXa) bildet sich, sobald FIXa die Thrombozytenmembran erreicht. FIXa diffundiert von TF-exprimierenden Zellen, an deren Oberfläche die FIX-Aktivierung während der Initiationsphase stattfindet, zu den aktivierten Thrombozyten. Darüber hinaus bindet dort FXI, wodurch seine Aktivierung durch Thrombin erleichtert wird.<sup>81</sup> FXIa stellt daraufhin zusätzlichen aktivierten FIXa auf der Thrombozytenoberfläche zur Verfügung. Der *Tenase*-Komplex aktiviert FX auf der Thrombozytenmembran, wodurch FXa direkt einen Komplex mit seinem Cofaktor FVa eingehen kann. Der resultierende *Prothrombinase*-Komplex sorgt schließlich durch die Aktivierung von Thrombin für einen explosionsartigen Anstieg der Thrombinkonzentration. Thrombin spaltet seinerseits Fibrinogen, welches nun polymerisiert. Dadurch wird ein erstes blutstillendes Fibringerinnsel gebildet.<sup>67,76</sup>

Darüber hinaus katalysiert Thrombin die Aktivierung von FXIII, dem sogenannten Fibrinstabilisierenden Faktor, zu FXIIIa. FXIIIa ist eine Transglutaminase, welche die Fibrinmonomere durch Ausbildung von kovalenten Isopeptidbindungen quervernetzt (vgl. Abschnitt 2.4). Neben der Quervernetzung der Fibrinmoleküle untereinander verknüpft FXIIIa sie auch kovalent an extrazelluläre Proteine und Strukturproteine der Thrombozytenmembran. FXIIIa sorgt somit für die Entstehung eines Fibrinnetzes, welches die aggregierten Thrombozyten und das gesamte Gerinnsel biomechanisch stabilisiert.<sup>76</sup> FXIIIa schützt das gebildete Gerinnsel außerdem durch die kovalente Anheftung von  $\alpha_2$ -Antiplasmin ( $\alpha_2$ -AP) an Fibrin vor einer vorzeitigen Fibrinolyse durch Plasmin.<sup>82</sup>  $\alpha_2$ -AP-Defizienz führt zu einem Blutungsphänotyp ähnlich der FXIII-Defizienz, was die klinische Bedeutung dieser FXIIIa-Funktion unterstreicht.<sup>83</sup>

FXIII(a) und Fibrin(ogen) sind von besonderer Bedeutung für die vorliegende Dissertation, weshalb im Folgenden näher auf die beiden Gerinnungsfaktoren eingegangen wird.

## 2.3 Fibrinogen und Fibrin

Fibrin wurde 1666 durch Marcello Malpighi (1628-1694) entdeckt. Er untersuchte kardiale Thromben und *In-vitro*-Blutgerinnsel unter dem Lichtmikroskop und beschrieb erstmalig Erythrozyten sowie ein faseriges Netzwerk, das wir heute als Fibrin kennen.<sup>84</sup> Antoine Fourcroy (1755-1809) gab Fibrin 1788 seinen Namen und unterteilte alle tierische Materie in die drei Bestandteile Gelatine, Albumin und Fibrin. 1838 wurde der Begriff 'Protein' (griech. *proteios* vorrangig, grundlegend) von Jöns Jacob Berzelius (1779-1848) für eine bestimmte Klasse von Biomolekülen vorgeschlagen. Das Konzept der Fibrinvorstufe Fibrinogen wird auf Rudolf Virchow (1821-1902) zurückgeführt, der damit 1847 eine langsamer gerinnende Substanz benannte. Im Jahre 1872 zeigte Hermann Adolf Alexander Schmidt (1831-1894), dass die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin ein enzymatischer Prozess ist. Schließlich gelang es Olof Hammarsten (1841-1932) 1879, Fibrinogen durch wiederholte Präzipitation mit halbgesättigter Kochsalzlösung (NaCl-Lösung) zu reinigen.<sup>85,86</sup>



Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau des Fibrinogen-Hexamers aus A $\alpha$ -Kette ( $\alpha$ , grün), B $\beta$ -Kette ( $\beta$ , blau) und  $\gamma$ -Kette ( $\gamma$ , rot). Die C-Termini der B $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten bilden die distale D-Domäne, während die C-terminalen Abschnitte der A $\alpha$ -Kette ( $\alpha$ C) flexibel sind und über die D-Domäne hinausragen (grüne Ellipsen). In der zentralen E-Domäne (blau/rot/grüne Ellipse) werden die sechs Fibrinogenketten mittels Disulfidbrücken zusammengehalten. Die Fibrinopeptide FpA (grüne Kreise) und FpB (blaue Kreise) befinden sich N-terminal. Modifiziert nach Byrnes *et al.* 2016.<sup>92</sup>

#### 2.3.1 Fibrinogen – biochemische und strukturelle Charakteristika

Fibrinogen ist ein 340 kDa schweres Glykoprotein, welches im menschlichen Blutplasma Konzentrationen zwischen 1,5 und 4 g/l aufweist.<sup>87</sup> Fibrinogen ist ein Hexamer bestehend aus je zwei der drei verschiedenen Polypeptidketten (Abbildung 2.2), die auf drei eng miteinander verbundenen Genloci kodiert sind: FGA (2 Aα-Ketten), FGB (2 Bβ-Ketten) und FGG (2 γ-Ketten).<sup>86–89</sup> Die Fibrinogen-Biosynthese findet hauptsächlich in Hepatozyten statt.<sup>90</sup> Im endoplasmatischen Retikulum (ER) assemblieren die drei einzelnen Ketten zu Heterodimeren (Aa-y-Dimere oder Bβ-y-Dimere) und dann zu trimeren Molekülen. Schließlich werden zwei Trimere an ihren N-Termini durch Disulfidbrücken verbunden, wodurch die finale Assemblierung der hexameren Struktur stattfinden kann.<sup>87,91</sup> Diese Disulfidbrücken sind zwar für die korrekte Fibrinogenassemblierung nicht zwingend erforderlich, jedoch für die Fibrinogensekretion. Neben der Bildung von Disulfidbrücken wird Fibringen vor der Sekretion cotranslational und posttranslational durch N-Glykosylierung an B $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten modifiziert.<sup>87</sup> Die Nomenklatur der einzelnen Ketten beruht auf ihrer Thrombin-katalysierten Aktivierung: Thrombin spaltet von den N-Termini der Aa- und  $B\beta$ -Ketten die Fibrinopeptide A und B ab, während die γ-Kette unberührt bleibt. Daher kann die Umwandlung von Fibringen zu Fibrin folgendermaßen beschrieben werden:

$$(A\alpha B\beta\gamma)_2 \longrightarrow (\alpha\beta\gamma)_2 + 2FpA + 2FpB.$$

Die sechs Polypeptidketten des Fibrinogens werden durch 29 Disulfidbrücken stabilisiert.<sup>93</sup> In den A $\alpha$ - B $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten sind jeweils 8, 11 bzw. 10 Cysteine. Die Aminotermini aller sechs Untereinheiten werden im zentralen Komplex, der sogenannten E-Domäne, durch Disulfidbrücken zusammengehalten.<sup>86,87</sup> Die Sequenzen Cys-Pro-X-X-Cys, die in jeder Polypeptidkette zweimal vorkommen, werden in einer Disulfidringstruktur angeordnet, welche die drei Ketten am Ende ihrer  $\alpha$ -helikalen *Coiled-Coil*-Strukturen verbindet.<sup>94</sup> Die beiden Fibrinogenhälften werden durch drei intermolekulare Disulfidbrücken – eine zwischen den beiden A $\alpha$ -Untereinheiten und zwei zwischen den beiden  $\gamma$ -Untereinheiten – zusammengehalten. Die einzelnen Ketten beherbergen darüber hinaus eine (A $\alpha$ ), drei (B $\beta$ ) bzw. zwei ( $\gamma$ ) intramolekulare Disulfidbrücken.<sup>87</sup>

Die Kristallstruktur des humanen Fibrinogens wurde im Jahre 2009 aufgeklärt.<sup>95</sup> Zuvor waren Teile der humanen Fibrinogenstruktur sowie einige tierische Fibrinogenstrukturen bereits bekannt.<sup>96–100</sup> Bei der Spaltung von Fibrinogen durch Plasmin enstehen die bereits genannte zentrale E-Domäne und zwei identische laterale D-Domänen.<sup>101</sup> In den D-Domänen befinden sich jeweils die sogenannten C-terminalen β- und γ-Knoten. Letztere sind für die Bildung von γ-γ-Dimeren durch Quervernetzung von großer Bedeutung. Die C-Termini der Aα-Ketten (αC-Regionen) sind sehr flexibel und konnten im Rahmen der kristallographischen Strukturanalyse von humanem Fibrinogen nicht kristallisiert werden.<sup>95</sup> Diese und andere unvollständig strukturell aufgeklärten Regionen wurden in verschiedenen Arbeiten computergestützt sowie mithilfe von Transmissionselektronen- und Atomkraftmikroskopie visualisiert.<sup>102–104</sup> In der E-Domäne befindet sich der N-terminale zentrale Knoten mit den A- und B-Fibrinopeptiden (FpA und FpB), welche bei der Fibrinogen-aktivierung durch Thrombin abgespalten werden.<sup>87</sup> Der zentrale Knoten ist mit den γ- und β-Knoten durch teilweise *N*-glykosylierte *Coiled-Coil*-Regionen verbunden.<sup>102</sup>

Fibrinogen verfügt über verschiedene starke (sogenannte  $\gamma$ 1- und  $\beta$ 1-)<sup>96, 97, 105</sup> und schwache ( $\gamma$ 2- und  $\beta$ 2-)<sup>106</sup> Bindungsstellen für Calciumionen. Diese Bindungsstellen wurden in der Kristallstruktur von Fibrinogen identifiziert und sind für Fibrinpolymerisierung und lytische Stabilität von großer Bedeutung.<sup>87</sup> Die hochaffinen  $\gamma$ 1- und  $\beta$ 1-Calciumbindungsstellen sind bereits bei physiologischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen durch Calciumionen vollbesetzt. Die  $\gamma$ 1-Bindungsstellen schützen die  $\gamma$ -Ketten durch Ca<sup>2+</sup>-Bindung vor proteolytischer Spaltung.<sup>107, 108</sup> Die Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen hat keinen direkten Effekt auf die FpA-Abspaltung durch Thrombin, allerdings scheint sie wichtig für die Regulierung der Fibrinpolymerisation zu sein.<sup>109</sup> Eine Konformationsänderung in Fibrin, welche mit der Abspaltung von FpB assoziiert ist, ist Ca<sup>2+</sup>-abhängig. Außerdem scheint eine Änderung der Affinität der Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstellen im Zusammenhang mit der FpB-Freisetzung sowie der begleitenden Konformationsänderung zu stehen.<sup>106</sup>

Die Bindungsstellen  $\gamma^2$  und  $\beta^2$  haben deutlich geringere Affinitäten zu Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Die in der Kristallstruktur identifizierten  $\gamma^2$ -Bindungsstellen sind vermutlich durch die Kristallpackung verursachte Wechselwirkungen und keine faktischen Calciumbindungsstellen.<sup>110</sup> Die  $\beta^2$ -Bindungsstellen verankern die  $\beta$ -Knoten in der *Coiled-Coil*-Verbindung zwischen dem zentralen und den lateralen Knoten und spielen eine Rolle in der lateralen Aggregation von Protofibrillen.<sup>110</sup> Darüber hinaus wird angenommen, dass die  $\beta^2$ -Bindungsstellen die

Zugänglichkeit der *tissue Plasminogen Activator* (tPA)-Bindungsstelle in Fibrin(ogen) regulieren.<sup>111</sup>

Fibrinogen wird vor seiner Sekretion aus den Hepatozyten ins Blut co- und posttranslational an seinen B $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten *N*-glykosyliert. Diese Kohlenhydratreste sind von enormer Bedeutung für die Fibrinpolymerisierung sowie für die finale Gerinnselstruktur. Verschiedene Studien suggerieren, dass sowohl die Ladung als auch die Masse der Kohlenhydratreste das Ausmaß der lateralen Aggregation modulieren können. Außerdem haben die Kohlenhydratmodifikationen offensichtlich einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit von Fibrinogen.<sup>87,112–115</sup> Kürzlich wurden durch die Kombination bekannter Kristallstrukturen von Fibrinoligomeren mit hochauflösender Atomkraftmikroskopie neue Fibrinmodelle computergestützt rekonstruiert, die weitere Einblicke in die Bedeutung von Kohlenhydratresten für die Fibrinstruktur liefern.<sup>116</sup>

#### 2.3.2 Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin

Wie zuvor erwähnt (vgl. Abschnitt 2.2) stellt die Umwandlung von Fibrinogen in ein Fibringerüst, das FXIIIa-katalysiert schließlich ein quervernetztes Fibrinnetz bildet, einen zentralen Schritt der Hämostase dar.<sup>87</sup> Die Überführung von Fibrinogen in Fibrin erfolgt in zwei Stufen. Im ersten – enzymkatalysierten – Schritt spaltet Thrombin die beiden Fibrinopeptide von Fibrinogen ab, wodurch ein Fibrinmonomer entsteht. Im zweiten – nicht-enzymatischen – Schritt ordnen sich die monomeren Fibrinmoleküle spontan zu Fibrinoligomeren an, die zu zweisträngigen Protofibrillen verlängert werden. Diese Protofibrillen aggregieren schließlich lateral und longitudinal, wodurch ein faseriges gelartiges Netz entsteht: das Blutgerinnsel. Abschließend wird das Fibrinpolymer durch die Transglutaminase FXIIIa quervernetzt. Dies stabilisiert das Blutgerinnsel mechanisch und chemisch.<sup>87</sup> Auf die einzelnen Schritte der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin wird im Folgenden näher eingegangen.

Durch die Thrombin-katalysierte Abspaltung der Fibrinopeptide FpA und FpB werden am zentralen Knoten des Fibrinmoleküls sogenannte 'A'- und 'B'-Knöpfe freigelegt, die mit 'a'- und 'b'-Taschen in den lateralen  $\gamma$ - und  $\beta$ -Knoten in Wechselwirkung treten. Es bildet sich ein zweisträngiges Fibrinoligomer, eine bis zu 20-25mer-lange Protofibrille (0,5-0,6 µm). Den 'A-a'-Interaktionen wird eine besondere Bedeutung für den Antrieb der Polymerisation beigemessen. Im Anschluss kommt es zur Faserbildung durch laterale Aggregation, welche durch Wechselwirkungen der  $\alpha$ C-Regionen und der Bildung von  $\alpha$ C-Polymeren verstärkt wird. Die Fasern lagern sich nun dicht aneinander, wobei durch die halbversetzte Anordnung von 45 nm-Molekülen eine Periodizität von 22,5 nm erreicht wird (Abbildung 2.3). Diese

Periodizität wird bei der Anlagerung weiterer Fibrinfasern durch Dehnung der äußeren Fasern beibehalten. Wenn die Dehnungsenergie der Protofibrillen die Bindungsenergie der Interaktionen übersteigt, kommt es zu keiner weiteren lateralen Aggregation. Dies ist ein Prozess, der den Faserdurchmesser thermodynamisch reguliert.<sup>87</sup>

Während die Rolle der 'A-a'-Interaktionen als treibende Kraft der Fibrinpolymerisation bereits ausführlich analysiert wurde, ist die Funktion der 'B-b'-Wechselwirkung noch nicht zufriedenstellend aufgeklärt. Ein Fibrinnetzwerk, welches nur durch FpA-Abspaltung (keine FpB-Abspaltung) entsteht, enthält dünnere Fibrinfasern im Vergleich zu Fibrin nach FpAund FpB-Abspaltung. Diese Daten weisen auf eine Bedeutung der 'B-b'-Wechselwirkung für die laterale Aggregation der Protofibrillen hin.<sup>117</sup> Darüber hinaus wird ein Effekt dieser Wechselwirkungen auf die Anfälligkeit von Blutgerinnseln für proteolytischen Verdau diskutiert.<sup>111</sup> Zusammenfassend kann man festhalten, dass 'B-b'-Interaktionen von größerer funktioneller Bedeutung sind als ursprünglich angenommen, was auch durch jüngere Studien indirekt bestätigt wird.<sup>118</sup>

Neben den 'B-b'-Wechselwirkungen sind – wie bereits kurz erwähnt –  $\alpha$ C-Regionen für die laterale Aggregation der Protofibrillen von Bedeutung. Während der Fibrinpolymerisation interagieren die flexiblen  $\alpha$ C-Regionen sowohl innerhalb als auch zwischen verschiedenen Protofibrillen. Diese  $\alpha$ C- $\alpha$ C-Interaktionen werden durch FXIIIa-katalysierte Quervernetzung zusätzlich verstärkt.<sup>119</sup> Die  $\alpha$ C- $\alpha$ C-Polymerisation findet in zwei Stufen statt. Zunächst erfolgt eine Auto-Assoziation der  $\alpha$ C-Domänen durch  $\beta$ -Haarnadel-Austausch in den N-terminalen Subdomänen. Schließlich interagiert die C-terminale Subdomäne mit dem  $\alpha$ C-Verbindungsstück.<sup>120</sup>  $\alpha$ C-Regionen sind für die laterale Aggregation der Protofibrillen zwar nicht notwendig, verstärken diese aber.<sup>119</sup> Verkürztes Fibrinogen ohne  $\alpha$ C-Regionen bildet Fibringerinnsel mit dünneren Fasern und einer größeren Dichte an Verzweigungen. Die  $\alpha$ C-Regionen sind neben ihrer Bedeutung für die Struktur und biophysikalischen Eigenschaften des Fibringerinnsels auch wichtig für dessen Widerstandsfähigkeit gegenüber Fibrinolyse.<sup>121</sup>

Während Fibrinfasern durch laterale Aggregation breiter und länger werden, verzweigen sie sich auch zu einem dreidimensionalen Netzwerk. Elektronenmikroskopische Untersuchungen führten zur Beschreibung zweier verschiedener molekularer Mechanismen, durch die Fibrinverzweigungen enstehen: 'bilateraler' Knotenpunkt und 'äquilateraler' Knotenpunkt. Der 'bilaterale' Knotenpunkt hat seinen Ursprung in zwei Protofibrillen, die unvollständig lateral aggregieren und sich schließlich in zwei verschiedene Protofibrillen aufteilen, von denen jede eine neue Faser bildet.<sup>122</sup> Der 'äquilaterale' (auch: 'trimolekulare') Knotenpunkt bildet sich durch die Anhaftung eines Fibrinmonomers an das Ende einer Protofibrille durch eine einzelne 'A-a'-Verbindung, sodass sowohl das Fibrinmonomer als auch die gebundene Protofibrille unabhängig voneinander wachsen können und so jeweils zwei Stränge bilden.<sup>123</sup> In jedem Fall bestehen die meisten Knotenpunkte aus drei verbundenen Fasern mit etwa gleich großen Durchmessern.<sup>124</sup> Verschiedene Daten unterstützen die Theorie, dass die beiden Prozesse laterale Aggregation und Verzweigung miteinander konkurrieren: Dünnere Fasern (weniger laterale Aggregation) sind meist stärker verzweigt, während dickere Fasern (mehr laterale Aggregation) weniger Knotenpunkte aufweisen.<sup>87</sup>

Im letzten Schritt der Fibrinbildung kommt die Transglutaminase FXIII zum Einsatz (Abbildung 2.3). Das Zymogen FXIII wird durch Thrombin und Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu FXIIIa aktiviert. An den C-Termini der  $\gamma$ -Fibrin(ogen)-Ketten sitzen Aminosäurereste, die eine End-zu-End-Quervernetzung ermöglichen: Zwischen  $\gamma$ Lys406 eines Moleküls und  $\gamma$ Gln398/399 eines anderen Moleküls werden kovalente  $\varepsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysyl-Isopeptidbindungen geknüpft (vgl. Abschnitt 2.4.1). Diese Bindung hat laut jüngeren Studien eine longitudinale Orientierung.<sup>126</sup>  $\alpha$ C-Regionen werden auf die gleiche Weise per Isopeptidbindung zur Stabilisierung der  $\alpha$ C-Polymere miteinander verbunden.<sup>127</sup> Auch zwischen den  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Ketten findet eine Quervernetzung statt, die hier zu  $\alpha$ - $\gamma$ -Heterodimeren führt.<sup>128</sup> Durch die Fibrinquervernetzung wird die Gerinnselbildung irreversibel. Zuvor ist die Fibrinpolymerbildung eine Gleichgewichtsreaktion, die umkehrbar ist.<sup>129</sup> Zur Auflösung des nun biomechanisch stabilisierten Fibringerinnsels müssen die Disulfidbrücken der Fibrinketten reduziert und/oder die Peptidbindungen chemisch oder enzymatisch hydrolysiert werden.<sup>87</sup>

FXIII(a) ist ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit, weshalb auf dieses Enzym im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

## 2.4 Blutgerinnungsfaktor XIII(a)

Blutgerinnungsfaktor XIII(a) – historisch auch Laki-Lóránd- oder Fibrin-stabilisierender Faktor genannt – ist eine Transglutaminase, die für die Katalyse der Fibrinquervernetzung, den letzten Schritt der Hämostase, verantwortlich ist (vgl. Abschnitt 2.2 und Abschnitt 2.3.2). FXIIIa wurde erstmalig durch die beiden Ungarn Kálmán Laki und László Lóránd im Jahre 1948 in Budapest beschrieben. Sie stellten fest, dass ein thermolabiler Serumbestandteil zusammen mit Ca<sup>2+</sup> dafür verantwortlich ist, dass bestimmte Fibringerinnsel nicht von Harnstoff gelöst werden können.<sup>130,131</sup> Eine weitere wichtige Beobachtung aus ihren damaligen Arbeiten war, dass die Viskosität von Fibrin in 30-prozentiger Harnstofflösung nicht von der Viskosität von identisch gelöstem Fibringen zu unterscheiden war. Dies war ein wichtiger Hinweis auf die Reversibilität der Fibrinpolymerisation (vgl. Abschnitt 2.3.2).<sup>131,132</sup> Später fanden Kazuhiko Konishi und László Lóránd heraus, dass für die Aktivierung des im Plasma befindlichen FXIII zunächst Thrombin und danach Ca<sup>2+</sup>-Ionen benötigt



Abbildung 2.3: Schematische Fibrinpolymerisierung: Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin und anschließende Quervernetzung mittels FXIIIa. Fibrinogen ist analog zu Abbildung 2.2 dargestellt. FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> liegt zunächst gebunden an Fibrinogen vor (oben). Durch die thrombinkatalysierte Abspaltung der Fibrinopeptide A (FpA) und B (FpB) sowie der FXIII-Aktivierungspeptide (FXIII-AP) werden Fibrinogen zu Fibrin und FXIII zu FXIIIa aktiviert. FXIIIa katalysiert zunächst  $\gamma$ - und schließlich  $\alpha$ -Ketten-Quervernetzungen und bindet  $\alpha_2$ -Antiplasmin ( $\alpha_2$ -AP) kovalent an das entstehende Fibringerinnsel. Modifiziert nach Byrnes *et al.* 2016 und Byrnes und Wolberg 2016.<sup>92, 125</sup>

werden.<sup>133,134</sup> In den gut siebzig Jahren seit seiner Entdeckung wurden große Fortschritte in der Erforschung des FXIII(a) gemacht, welche im folgenden Kapitel skizziert werden.

#### 2.4.1 FXIIIa – Transglutaminasen und die Transglutaminasereaktion

FXIIIa gehört zur Enzymklasse der Transglutaminasen (TGase, EC 2.3.2.13). Transglutaminasen katalysieren die Bildung einer Isopeptidbindung zwischen der γ-Carboxamidgruppe einer Glutaminseitenkette (Acyl-Donor) und der ε-Aminogruppe einer Lysinseitenkette (Acyl-Akzeptor). Die Transglutaminasereaktion ist schematisch in Abbildung 2.4 gezeigt. Zunächst reagiert ein Thiolrest der Transglutaminase (FXIII: Cys314) mit der γ-Carboxamidgruppe der Glutaminseitenkette. Dadurch entsteht als Intermediat eine Sulfidbindung zwischen der Transglutaminase und dem ehemaligen Glutaminrest. Im zweiten Schritt reagiert nun die ε-Aminogruppe der Lysinseitenkette mit diesem Intermediat, sodass eine Isopeptidbindung zwischen dem Glutamin- und dem Lysinrest entsteht und die Transglutaminase unter Ammoniumbildung unverändert aus der Reaktion hervorgeht.<sup>135, 136</sup> Im FXIIIa ist eine katalytische Triade bestehend aus Cys314, His373 und Asp396 verantwortlich für seine Transglutaminaseaktivität (Abbildung 2.4, rechts).

Es sind neun verschiedene humane Gene für Transglutaminasen bekannt. Sechs hiervon (TGase 1-5, FXIIIa) wurden näher beschrieben, während die genauen Funktionen der TGasen 6 und 7 noch unklar sind.<sup>138,139</sup> Das neunte Transglutaminasegen kodiert für das Erythrozytenmembranprotein 4.2 (Band 4.2). Dieses Protein hat im Gegensatz zu den anderen acht Transglutaminasen im katalytischen Zentrum einen Cys-Ala-Austausch. Dies ist der Grund dafür, dass Band 4.2 über keinerlei Transglutaminaseaktivität verfügt.<sup>139</sup>



**Abbildung 2.4:** Die Transglutaminasereaktion (links) und die katalytische Triade des FXIIIa (rechts, PDB 4KTY, graues Bändermodell).<sup>137</sup> Die drei hauptverantwortlichen Aminosäuren für die Katalyse der Reaktion sind farblich hervorgehoben: Cys314 (gelb), His373 (blau) und Asp396 (rot).

Die Gewebetransglutaminase (TGase 2) ist die wohl am besten charakterisierte Transglutaminase. Sie kommt in vielen verschiedenen Geweben und Zelltypen vor – hauptsächlich im Cytosol, aber auch kern- und membranständig sowie extrazellulär.<sup>140</sup> Abgesehen von ihrer Funktion als Transglutaminase verfügt TGase 2 auch über GTPase-, ATPase-, Proteinkinase- und Proteindisulfidisomerase- (PDI-) Aktivität.<sup>139</sup> Extrazelluläre TGase 2 ist unter normalen physiologischen Bedingungen nicht aktiv. Sie kann durch Gewebeschäden lokal transient aktiviert werden und erfüllt dann wichtige Funktionen während der Wundheilung. Durch die Assoziation mit extrazellulären Matrixproteinen wird die TGase 2 allerdings rasch wieder inaktiviert.<sup>141</sup> Die oxidative Umgebung im extrazellulären Raum trägt ebenfalls zur Inaktivierung der TGase 2 bei. Dies geschieht durch die Bildung bestimmter Disulfidbrücken (Cys230-Cys371 und Cys370-371), die eine Transglutaminaseaktivität behindern. Cys230 scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen, indem es durch die Bildung der Disulfidbrücke Cys230-Cys371 die nachfolgende Bildung von Cys370-Cys371 begünstigt.<sup>142</sup> Es ist bemerkenswert, dass das Vorkommen von Cys230 in TGase 2 in der Transglutaminase-Proteinfamilie einzigartig ist. Dies ist ein Anhaltspunkt dafür, dass Cys230 als isoformspezifischer Redoxsensor fungiert.<sup>142</sup>

FXIIIa besitzt im Gegensatz zur TGase 2 Transglutaminaseaktivität im Extrazellulärraum. Unterschiede zwischen TGase 2 und FXIIIa sind für die vorliegende Arbeit von Bedeutung, da FXIIIa-Inhibitoren oft auch TGase 2 inhibieren, was zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann (vgl. Abschnitt 2.6). FXIII liegt wie die TGasen 1 und 3 und im Gegensatz zu TGase 2 als Zymogen vor. FXIII wird durch Abspaltung eines Aktivierungspeptids und in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu FXIIIa aktiviert.<sup>143</sup>

### 2.4.2 FXIII(a) – Vorkommen, Aufbau, Aktivierung

Es gibt zwei verschiedene FXIII-Typen: plasmatischen FXIII (pFXIII) und zellulären FXIII (cFXIII). Beide FXIII-Typen unterscheiden sich neben ihrer Lokalisation im Organismus auch im strukturellen Aufbau und in der Art ihrer Aktivierung. pFXIII liegt als A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-Heterotetramer vor. Seine Aktivierung erfolgt im Blut in erster Linie durch thrombolytische Spaltung in Gegenwart niedriger Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen.<sup>144</sup> Zellulärer FXIII kommt als A<sub>2</sub>-Monomer vor und wird in der Regel nicht-proteolytisch durch einen moderaten Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, wie z. B. in aktivierten Thrombozyten,<sup>145</sup> aktiviert.<sup>144</sup> cFXIII-A kann zudem in die Extrazellulärmatrix (z. B. im Knochen) sekretiert und dort nicht-proteolytisch durch hohe Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen aktiviert werden.<sup>146,147</sup> Beide FXIII-Typen können prinzipiell sowohl proteolytisch als auch nicht-proteolytisch in ihre aktive Form umgewandelt werden.<sup>147,148</sup>

Während davon ausgegangen wird, dass FXIII-B in Hepatozyten gebildet wird,<sup>149,150</sup> war der Ursprung des plasmaständigen FXIII-A lange Zeit unklar.<sup>151–154</sup> Aktuellere Studien weisen darauf hin, dass Makrophagen für die Synthese und Sekretion von pFXIII-A zuständig sind.<sup>155,156</sup>

Von den FXIII-A-Untereinheiten ist sowohl die Kristallstruktur des inaktiven FXIII-A<sub>2</sub>-Dimers als auch die eines mit hohen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen aktivierten FXIII-A° beschrieben.<sup>137,158</sup> FXIII-A ist, wie alle Transglutaminasen, aus einer  $\beta$ -Sandwich-Domäne, einer katalytischen Domäne und zwei  $\beta$ -Fass-Domänen aufgebaut.<sup>137</sup> Den  $\beta$ -Fass-Domänen 1 und 2 wird während der FXIII-Aktivierung eine besondere Rolle zugesprochen.<sup>159</sup> Zum strukturellen Aufbau des FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-Heterotetramers sowie der FXIII-B-Untereinheiten existieren bislang nur wenige Studien. Die Interaktion der A- und B-Untereinheiten wurde von Katona *et al.* untersucht.<sup>160</sup> Zudem ist es kürzlich mithilfe von Einzelmolekül-Atomkraftmikroskopie gelungen, die Struktur des FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-Komplexes und die strukturellen Veränderungen während des Aktivierungsprozesses näher zu charakterisieren.<sup>161</sup> Diese und weitere Studien



Abbildung 2.5: Proteolytische (links) und nicht-proteolytische (rechts) Aktivierung von pFXIII (FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) und cFXIII (FXIII-A<sub>2</sub>). Proteolytisch aktivierter FXIII (FXIII-A<sup>\*</sup>) und nicht-proteolytisch aktivierter FXIII (FXIII-A<sup>o</sup>) agieren als Monomere (vgl. Abschnitt 2.4.2). Ca<sup>2+</sup>-vermittelte nicht-proteolytische Aktivierung kann sowohl durch hohe als auch durch niedrige (deutlich langsamer) Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen erfolgen.<sup>147</sup> Basierend auf Singh *et al.* 2019 sind drei Ca<sup>2+</sup>-Bindestelle in FXIII-A skizziert.<sup>157</sup> Der Stern markiert das aktive Zentrum des FXIIIa.

deuten außerdem darauf hin, dass FXIIIa nicht, wie zunächst angenommen,<sup>162,163</sup> als Dimer agiert, sondern als Monomer.<sup>137,147,148,157,161,164</sup> Zudem wurden inzwischen einige Studien veröffentlicht, die dem Trägerprotein FXIII-B weitere Funktionen neben der reinen Stabilisierung des Zymogens FXIII zuschreiben.<sup>165–168</sup> Auch die Bedeutung der Ca<sup>2+</sup>-Ionen und des FXIII-Aktivierungspeptids (FXIII-AP) während der FXIII-Aktivierung wurde analysiert.<sup>157,163,164,169</sup> Der aktuelle Forschungsstand zur FXIII-Aktivierung wird in Abbildung 2.5 skizziert.

#### 2.4.3 FXIII in der Hämostase

FXIIIa spielt in der Entstehung venöser Thromben eine bedeutende Rolle. Venöse Thromben unterscheiden sich grundsätzlich von arteriellen Thromben. Während arterielle Thromben hauptsächlich aus aggregierten Thrombozyten bestehen, finden sich in venösen Thromben vor allem Fibrin und Erythrozyten. Daher werden arterielle Thromben auch 'weiße' Thromben und venöse Thromben 'rote' Thromben genannt. Mithilfe von Transmissionselektronenmikroskopie wurde die Struktur venöser Thromben, in denen Erythrozyten ihre klassische Form verlieren, sichtbar gemacht.<sup>170</sup> Diese komprimierten Erythrozytenformen werden *Polyhedrozyten*<sup>171,172</sup> genannt und weisen auf erhebliche Kräfte hin, die in einem Thrombus während der Thrombozyten-vermittelten Gerinnselkontraktion wirken.<sup>65</sup> Die unmittelbare Nähe sowie die Anordnung von Fibrinmolekülen und Erythrozyten innerhalb der Thrombusultrastruktur deuten auf eine mechanistische Beziehung untereinander hin, welche erst kürzlich erkannt wurde.<sup>65</sup>

Für ein tieferes Verständnis der Struktur und des Aufbaus venöser Thromben sind zwei grundlegende Aspekte wichtig. Zum einen beeinflusst die Prothrombinkonzentration im Blut die Thrombingenerierung und dadurch die Beschaffenheit des Fibrinnetzwerks. Erhöhtes Prothrombin sorgt so für die Bildung eines dichten Fibrinnetzwerks, welches aus dünnen Fibrinfasern besteht und eine verringerte Permeabilität aufweist.<sup>173,174</sup> Im Mausmodell wurde gezeigt, dass sowohl der Fibringehalt als auch das Thrombusgewicht durch erhöhtes Prothrombin zunimmt.<sup>175</sup> Jüngste Studien weisen übereinstimmend damit auf einen erhöhten Erythrozytengehalt venöser Thromben in diesem Mausmodell hin.<sup>65</sup> Zum anderen fördert FXIII die Erythrozytenretention in venösen Thromben.<sup>176</sup> FXIII hat

einen dosisabhängigen Effekt auf die Gerinnselkontraktion: Je weniger FXIII vorhanden ist, umso kleiner sind die gebildeten Thromben. Dies wurde in verschiedenen Mausmodellen gezeigt und in humanem Vollblut bestätigt.<sup>176–178</sup> Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit einer Studie aus dem Jahre 1970, die von exzessiver Erythrozytenpräzipitation während der Gerinnselkontraktion bei FXIII-defizienten Patienten berichtet hatte.<sup>179</sup> Ein dichtes Fibrinnetzwerk hält nachweislich mehr Erythrozyten im Gerinnsel zurück.<sup>178</sup> Da FXIII auf die Dichte eines Fibrinnetzwerks jedoch keinen bis wenig Einfluss hat, scheint die Wirkung von FXIII auf die Erythrozytenretention unabhängig von der Dichte des Fibrinnetzwerks zu sein.<sup>124, 180</sup> Diese Vermutung wurde durch den Vergleich der Gerinnselretention in Vollblut mit alternierender TF-Konzentration in Ab- und Anwesenheit eines FXIII-Inhibitors (T101) bestätigt.<sup>178</sup> Darüber hinaus gelang es, den Effekt von FXIII auf die Erythrozytenretention im Gerinnsel auf die  $\alpha$ -Quervernetzung von Fibrin einzugrenzen.<sup>178</sup>

Durch die FXIIIa-katalysierte Quervernetzung werden verschiedene biomechanische Eigenschaften des Blutgerinnsels verändert: Die Steifigkeit und Elastizität der Faser werden erhöht (3,75-fach bzw. 1,2-fach), während sich die Faserdehnbarkeit verringert (1,2-fach).  $\alpha$ -Quervernetzungen sind in Abwesenheit von  $\gamma$ -Quervernetzungen in der Lage, einen beachtlichen Anteil dieser Effekte auf die Fibrinfaser auszulösen (2,5-fache Erhöhung der Steifigkeit, 1,5-fache Erhöhung der Elastizität).<sup>181</sup>

Auch andere Studien haben gezeigt, dass die Fibrinquervernetzung erheblichen Einfluss auf biophysikalische und biomechanische Eigenschaften des Fibrinmoleküls hat.<sup>121,124,180,182</sup> Die FXIIIa-katalysierte Quervernetzung vermag es, Gerinnsel durch Stabilisierung vor Deformation zu schützen sowie Erythrozyten im venösen Thrombus zurückzuhalten. Zusammenfassend weist dies auf eine bedeutende (patho-)physiologische Rolle von quervernetztem Fibrin hin, wodurch FXIII eine interessante therapeutische Zielstruktur darstellt.<sup>65</sup>

Bereits das Zymogen FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> zirkuliert im Plasma gebunden an  $\gamma$ - und  $\alpha$ C-Fibrinregionen, wodurch es bei der Bildung eines Thrombus schnell in unmittelbarer örtlicher Nähe zum sich bildenden Fibrinnetzwerk aktiviert wird und zur Gerinnselkontraktion beiträgt.<sup>92,176,183</sup> Bei der Aktivierung von FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> spielen auch Interaktionen mit Fibrin(ogen) eine Rolle.<sup>184–186</sup>

Zelluläres FXIII-A<sub>2</sub>, welches in Thrombozyten vorkommt (FXIII<sub>Thromb</sub>), scheint bei der FXIIIa-vermittelten Retention der Erythrozyten – trotz teils gegenteiliger Beobachtungen<sup>187</sup> – tendenziell nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.<sup>177, 188, 189</sup> Der Grund hierfür wird in der im Vergleich zu pFXIII langsameren Rekrutierung und Exposition des FXIII<sub>Thromb</sub> vermutet, sodass es schlicht zu spät kommt, um einen wesentlichen Teil zur Fibrinstabilisierung beitragen zu können.<sup>65</sup> Diesbezüglich gibt es zur endgültigen Klärung Bedarf an weiteren Studien.

#### FXIII in Thrombozyten

FXIII-A<sub>2</sub> kommt in hohen Konzentrationen im thrombozytären Cytosol vor<sup>190,191</sup> und macht bemerkenswerte 3 % des Thrombozytengesamtproteins aus.<sup>192</sup> Thrombozyten endozytieren außerdem FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> (an Fibrinogen gebunden) aus dem Plasma und speichern es in  $\alpha$ -Granula.<sup>190,193</sup> Die FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-Konzentration in  $\alpha$ -Granula ist jedoch so gering, dass sie im Thrombozytensekretom oft nicht detektierbar ist.<sup>194</sup> Abtuellere Studien weisen allerdings auf eine Translokation des FXIII<sub>Thromb</sub> vom Cytoplasma an die Thrombozytenoberfläche hin, wo es aktiv zurückgehalten wird und extrazelluläre Quervernetzungen katalysieren kann.<sup>195,196</sup>

FXIII<sub>Thromb</sub> stabilisiert Fibringerinnsel durch die Quervernetzung von γ-Dimeren und α-Polymeren.<sup>197–201</sup> Außerdem katalysiert es die Bindung von α<sub>2</sub>-Antiplasmin (α<sub>2</sub>-AP) an Fibrin,<sup>197,201</sup> wodurch das Fibringerinnsel resistent gegenüber Plasmin-induzierter Fibrinolyse wird. Die kürzlich gezeigte Translokation des FXIII<sub>Thromb</sub> vom Cytoplasma an die Außenseite der Thrombozytenmembran<sup>195</sup> gibt in Ermangelung eines ER-Signalpeptids Rätsel auf und weist auf einen alternativen Sekretionsweg hin. Die Fähigkeit des FXIII<sub>Thromb</sub> zur Katalyse der Fibrin-Fibrin- und Fibrin-α<sub>2</sub>-AP-Quervernetzung wurde indes experimentell in Abwesenheit von pFXIII bestätigt.<sup>195</sup>

Zum Beitrag von FXIII<sub>Thromb</sub> im Verhältnis zu pFXIII während der Thrombusstabilisierung können bislang nur Vermutungen aufgestellt werden. Es wird davon ausgegangen, dass das Verhältnis vom lokalen Aufbau des Thrombus (thrombozytenreich vs. erythrozytenreich) abhängt und daher in Bezug auf den gesamten Thrombus inhomogen ist. Zur näheren Aufklärung sind hierzu weitere Studien notwendig.<sup>150</sup>

Die Korrelation der FXIII- und Fibrinexposition aus Thrombozyten<sup>195</sup> gibt für Mitchell und Mutch Grund zur Annahme, dass das Glykoprotein IIb/IIIa für FXIII<sub>Thromb</sub> als eine Art 'Brücke' dient, um das Fibrinnetzwerk zu erreichen.<sup>150</sup> HSP27 (*heat shock protein* 27) könnte in diesem Zusammenhang als *Chaperon* für die FXIII-A-Translokation vom Cytosol über das Aktincytoskelett zur äußeren Membran dienen.<sup>150</sup> Aufgrund der erhöhten Widerstandsfähigkeit von Fibrin, welches direkt mit Thrombozyten assoziert ist,<sup>202,203</sup> wird weiterhin angenommen, dass FXIII<sub>Thromb</sub> und andere antifibrinolytische Proteine hierzu zumindest in den frühen Stadien der Thrombusbildung beitragen.<sup>150</sup>

Der Vorgang der Thrombusretraktion sorgt dafür, dass sich Thromben verdichten. Dies dient einerseits dazu, Undichtigkeiten an der Wunde zu verhindern und andererseits dazu, das verletzte Gefäß innenseitig nicht mehr als unbedingt notwendig zu blockieren.<sup>150</sup>
Die Kooperation von Thrombozyten mit dem umgebenden Fibrinnetzwerk mittels bidirektionalem GPIIb/IIIa-Signaling spielt während der Thrombusretraktion eine entscheidende Rolle.<sup>204</sup> Hierbei vermittelt das Glykoprotein IIb/IIIa das extrazelluläre Signal des bindenden Fibrinogens an das intrazelluläre (thrombozytäre) Aktincytoskelett mittels sogenannter lipid rafts (spezielle Bereiche der Zellmembran mit besonders hohem Gehalt an Sphingomyelinen, Glycosphingolipiden und Cholesterin).<sup>205</sup> Das Cytoskelett interagiert dabei mittels der Adapterproteine Talin und Vinculin mit GPIIb/IIIa.<sup>206</sup> Bei der Thrombusretraktion stimuliert die Bindung von Fibrin an GPIIb/IIIa mittels sogenanntem outside-in signaling die Kontraktion des Cytoskeletts. FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> hat in diesem Zusammenhang zweierlei Funktionen: Einerseits stabilisiert FXIII- $A_2B_2$  den kondensierten Thrombus durch die Quervernetzung des beteiligten Fibrinnetzwerkes. Andererseits fördert FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> sogenanntes Thrombozyten-Spreading:<sup>150,207</sup> das Ausbreiten eines Thrombozyten, wodurch der Kontakt zu weiteren Thrombozyten und die Ausbildung eines Netzwerks ermöglicht wird. Darüber hinaus festigt FXIII<sub>Thromb</sub> das Thrombozytencytoskelett, indem es verschiedene seiner Bestandteile untereinander quervernetzt.<sup>208</sup> Außerdem weisen jüngere Studien auf eine Bedeutung von FXIII für die Anheftung aktivierter Thrombozyten an Fibrin(ogen) während der Thrombusbildung hin.<sup>209–211</sup>

Die Funktion des FXIII<sub>Thromb</sub> ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Neben seiner Rolle in der Stabilisierung des Thrombozytencytoskeletts während der Thrombozytenaktivierung wird ihm eine Bedeutung in der Wundheilung zugeschrieben.<sup>205, 208, 212, 213</sup>

### 2.4.4 FXIII – weitere physiologische Funktionen

FXIII(a) hat neben seiner Rolle in der Hämostase weitere physiologische Aufgaben, welche bis dato nur oberflächlich charakterisiert wurden.<sup>65,150</sup> Hierzu gehören Funktionen in Wundheilung,<sup>214,215</sup> Angiogenese,<sup>216</sup> Inflammation und Immunantwort,<sup>217,218</sup> Herzgesundheit,<sup>219,220</sup> Knochenbiologie<sup>221,222</sup> sowie in der Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft.<sup>223,224</sup>

Das FXIII-A-Gen (F13A1) wird im Einklang mit den vielfältigen Aufgaben des Genprodukts FXIII-A<sub>2</sub> in verschiedenen Zellen des Knochenmarks sowie der mesenchymalen Linie exprimiert. Dazu gehören insbesondere Megakaryozyten und Thrombozyten,<sup>225, 226</sup> Monozyten und Makrophagen,<sup>227, 228</sup> dendritische Zellen,<sup>229</sup> Chondrozyten,<sup>230</sup> Osteoblasten<sup>231</sup> und Präadipozyten.<sup>232</sup> Beobachtungen der vergangenen Jahre sprechen immer mehr dafür, dass FXIII-A<sub>2</sub> von diesen Zellen in Antwort auf externe Reize abgesondert werden und daraufhin extrazelluläre Quervernetzungen katalysieren kann. In Ermangelung einer ER-Signalsequenz ist nach wie vor unklar, wie FXIII-A<sub>2</sub> aus der Zelle gelangen kann ohne den klassischen ER-Golgi-Signalweg zu nehmen.<sup>150,151</sup> In Monozyten wurde die Assoziation von FXIII-A<sub>2</sub> an Strukturen der Plasmamembran (Podosomen) sowie die Anlagerung von FXIII-A<sub>2</sub> in intrazellulären GM130-positiven Vesikeln beobachtet. Beide Aspekte weisen auf einen alternativen Sekretionsweg des FXIII-A<sub>2</sub> hin.<sup>154</sup>

Der Einfluss von intrazellulärem und extrazellulärem FXIII auf diverse physiologische Vorgänge neben der Hämostase wurde in verschiedenen Übersichtsartikeln besprochen und wird nachfolgend skizziert.<sup>144,150,165,213,233,234</sup>

#### Wundheilung und Angiogenese

FXIII trägt nicht unerheblich zur physiologischen Wundheilung bei. Erste Hinweise hierauf lieferten FXIII-defiziente Patienten, bei denen in 14-36 % der Fälle eine Beeinträchtigung der Wundheilung festgestellt wurde.<sup>144</sup> Dieser Effekt konnte auch in transgenen FXIII-*Knockout*-Mäusen gezeigt werden. Durch FXIII-Substitution wurde der normale Wundheilungsprozess wiederhergestellt, was den Einfluss von FXIII auf die Wundheilung bestätigte.<sup>214</sup> Die Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der das Zusammenspiel verschiedener Vorgänge – wie Fibringelbildung, das Einwandern von Makrophagen ins Gewebe, Fibroblastenmigration und -proliferation, Produktion von extrazellulärer Matrix sowie Angiogenese – erfordert.<sup>144</sup> FXIII spielt durch die Katalyse der Quervernetzung von extrazellulären Matrixproteinen, durch die Förderung der Angiogenese, durch die Aktivierung von Makrophagen sowie durch seine migrationsfördernde Wirkung auf Fibroblasten eine entscheidende Rolle in der Wundheilung.<sup>144, 235</sup>

Da durch FXIII-Substitution in FXIII-defizienten Individuen der Wundheilungsprozess weitestgehend wiederhergestellt werden kann, wird davon ausgegangen, dass insbesondere pFXIII und extrazellulärer FXIII für die Wundheilung von Bedeutung sind.<sup>235</sup> Nichtsdestotrotz darf nicht unterschlagen werden, dass insbesondere alternativ-aktivierte (M2-) Makrophagen eine entscheidende Rolle im zellulären Wund-*Débridement* (Wundreinigung) mittels Phagozytose spielen. Diese M2-Makrophagen zeichnen sich unter anderem durch eine erhöhte Expression von FXIII-A<sub>2</sub> aus.<sup>236,237</sup> Daher wird auch eine Beteiligung von cFXIII in Makrophagen am Wundheilungsprozess vermutet, was allerdings noch nicht ausreichend aufgeklärt wurde.

Nach einer Gewebeverletzung wird pFXIII rasch durch Thrombin und Calcium aktiviert. Abgesehen von seiner bereits beschriebenen Rolle in der Hämostase (vgl. Abschnitt 2.4.3) interagiert FXIIIa mit Komplementfaktor C3 und katalysiert seine kovalente Bindung (mittels Isopeptidbindung) an den sich bildenden Thrombus.<sup>165,238</sup> Neben der Quervernetzung von Matrixkomponenten vermittelt FXIIIa die Interaktion zwischen Endothelzellen und Thrombozyten durch den Vitronectinrezeptor ( $\alpha_v\beta_3$ -Integrin). Hierbei bindet FXIIIa zunächst an den Vitronectinrezeptor der Endothelzelle, wodurch dieser mit dem VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* 2) quervernetzt wird. Dies löst die Aktivierung dieses Rezeptors aus.<sup>235</sup> Aktivierter VEGFR-2 erhöht einerseits die Zellproliferation durch die Hochregulation von Erg-1- und cJun-Transkriptionsfaktoren. Andererseits reguliert der Rezeptor das proapoptotische Thrombospondin-1 (TSP-1) auf dem mRNAund Proteinlevel herunter.<sup>239, 240</sup> Diese Mechanismen, die indirekt durch FXIII beeinflusst werden, sind sowohl für die Angiogenese als auch für die Wundheilung essentiell.

### Inflammation und Immunantwort

Neben der Verflechtung mit den Prozessen der Wundheilung und Blutgerinnerung agiert FXIII auch in einer sehr frühen und evolutiv sehr alten Immunreaktion. Hierbei werden Erreger in einem Fibringerinnsel eingeschlossen und immobilisiert, was schließlich zur Pathogenabtötung führt. Im Zuge dessen wurde gezeigt, dass Faktor XIII die kovalente Bindung von Bakterien an die Fibrinfaser katalysiert und dadurch einen erheblichen Anteil am Pathogeneinschluss im Fibringerinnsel hat. Die Bedeutung von FXIIIa für diesen Prozess der frühen Immunantwort wurde sowohl im Mausmodell als auch in Patienten mit nekrotisierender Fasziitis bestätigt.<sup>241</sup>

Interessanterweise können FXIII und Fibrinogen nicht nur von Thrombin, sondern auch von der Mannose-bindendes Lektin (MBL)-assoziierten Serinprotease (MASP-)1, einem Bestandteil des Komplementsystems, aktiviert werden.<sup>242,243</sup> MASP-1 agiert im Komplex mit MASP-2, die wiederum Prothrombin zu aktivieren vermag.<sup>244</sup> Darüber hinaus sind die FXIII-katalysierte Bindung des Komplementfaktors C3 an Fibrin,<sup>245</sup> die Zusammenhänge zwischen FXIII und C5-Generierung<sup>246</sup> und die Interaktion zwischen C1q und Fibrin(ogen) von Bedeutung. Das Zusammenspiel zwischen FXIII/Fibrin und dem Komplementsystem könnte auch für die Quervernetzung von Bakterien an Fibrinfasern eine Rolle spielen. Die Wechselbeziehungen zwischen FXIII und verschiedenen Aspekten des Komplementsystems sowie der Inflammation wurden kürzlich von Hoppe übersichtlich zusammengefasst.<sup>218</sup> Ein interessanter Nebenaspekt ist die strukturelle Homologie von FXIII-B und Komplementfaktor H, die zu Beginn der Neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts entdeckt und mittlerweile näher untersucht wurde.<sup>247–250</sup>

Verschiedene Immunzellen des angeborenen Immunsystems werden ebenfalls durch FXIII beeinflusst. Alternativ-aktivierte M2-Makrophagen, die bereits im Zusammenhang mit der Wundheilung beschrieben wurden, weisen eine erhöhte FXIII-Expression auf, was positiv mit einer verstärkten Phagozytose dieser Zellen korreliert und die Genexpression verändert.<sup>237, 251</sup> Auch in dendritischen Zellen wird vermehrt FXIII exprimiert, wodurch Zellmigration aktiv unterstützt wird.<sup>252</sup> In FXIII-defizienten Zellen ist allerdings die Phagozytose nur leicht vermindert, was auf eine Kompensation hindeutet.<sup>253</sup> Neutrophile Granulozyten sind ebenfalls Immunzellen der angeborenen Immunantwort, die durch FXIII beeinflusst werden. Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zum Infarktlokus ist in FXIII-A-*Knockout*-Mäusen signifikant verringert. Die Phagozytose-aktivität der neutrophilen Granulozyten in den FXIII-defizienten Mäusen ist ebenfalls reduziert, während hier bei Makrophagen kein Unterschied festgestellt werden konnte.<sup>254</sup> Blutgerinnung, Immunantwort, Inflammation und Wundheilung sind eng miteinander verknüpfte Prozesse, in denen FXIII eine Rolle spielt.

#### Knochenbiologie

Die Rolle von FXIII in der Knochenbiologie wird aufgrund von widersprüchlichen Studienergebnissen mittlerweile kontrovers diskutiert. Zunächst bleibt festzuhalten, dass FXIII-A in verschiedenen Zelltypen des Knochengewebes exprimiert und von dort aus sekretiert wird: in Chondrozyten,<sup>230</sup> Osteozyten<sup>255</sup> und Osteoblasten.<sup>231,255</sup> Verschiedene *In-vitro*-Studien zeigen, dass FXIII-A zur Bildung und Stabilisierung des Knochenbindegewebes durch Quervernetzung verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix beiträgt.<sup>146,256–259</sup> Zudem scheint FXIII neben anderen Transglutaminasen regulierend in verschiedene Schritte der Osteoklastenbildung (Differenzierung, Wanderung und Osteoklastenfusion) einzugreifen, was vermutlich auch im Zusammenhang mit seiner Rolle in rheumatoider Arthritis steht (vgl. Abschnitt 2.5.5).<sup>222, 260</sup>

In vivo konnte die Funktion von FXIII in der Knochenbiologie bislang noch nicht nachgewiesen werden. Der Doppel-Knockout von FXIII-A und TGase 2 im Mausmodell führt nicht zu einer Veränderung der Knochenanlagerungsprozesse.<sup>261</sup> Dies ist im Hinblick auf die Ergebnisse der In-vitro-Studien überraschend. Da neben TGase 2 und FXIII auch TGase 1 Funktionen in der Knochenbiologie übernimmt, könnte TGase 1 den Ausfall von FXIII und TGase2 kompensieren. Aufgrund der grundlegend unterschiedlichen Regulation dieser drei Transglutaminasen wird es jedoch als unwahrscheinlich erachtet, dass TGase 1 die Aufgaben von FXIII und TGase 2 in Gänze übernehmen kann.<sup>261</sup> In jedem Fall sind weitere Studien notwendig, um die Rolle von FXIII in der Knochenbiologie *in vivo* zu definieren.<sup>150</sup>

#### Schutz des Herzens

Im Zusammenhang mit den bereits erwähnten Aufgaben von FXIII in der Wundheilung wurde beobachtet, dass FXIII auch Funktionen zum Schutz des Herzens (*Cardiac Protection*) übernimmt. In FXIII-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass FXIII essentiell für die Heilung des Myokards nach einem Infarkt ist und das schädliche linksventrikuläre *Remodeling* verringert. Zudem tritt in FXIII-*Knockout*-Mäusen die Komplikation der Herzruptur nach dem Infarkt signifikant häufiger auf.<sup>262</sup> Bei Herzinfarktpatienten konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen auftretender Herzruptur nach einem Myokardinfarkt und niedrigen FXIII-Spiegeln festgestellt werden.<sup>219</sup> Diese und weitere Studien<sup>220,263,264</sup> weisen auf die Bedeutung von FXIII für den Schutz des Herzens sowie eine mögliche Anwendung von FXIII als prognostischem Biomarker und Arzneimittel hin.<sup>265</sup>

#### Aufrechterhaltung der Schwangerschaft

FXIII erfüllt einen weiteren wichtigen Zweck: Er trägt wesentlich zur Aufrechterhaltung von Schwangerschaften bei.<sup>223</sup> Dies wurde durch verschiedene Studien bestätigt. Sharief und Kadir stellten bei einer Zusammenfassung der 2013 vorliegenden Literatur fest, dass von 136 unbehandelten Schwangerschaften FXIII-defizienter Frauen 124 (91%) durch eine Fehlgeburt beendet wurden.<sup>266</sup> Eine aktuellere Studie aus Frankreich bestätigt diese Daten (26 Fehlgeburten in 26 unbehandelten Schwangerschaften FXIII-defizienter Frauen).<sup>267</sup> Bei prophylaktischer FXIII-Substitution während der Schwangerschaft kam es in 40 von 45 Fällen (89%) zu Lebendgeburten.<sup>266</sup> Der Grund für die sehr häufig auftretenden Fehlgeburten bei FXIII-defizienten Frauen ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Studien weisen auf eine Rolle von FXIII bei der Implantation der Blastozyste in die Plazenta hin.<sup>223,268</sup> Insbesondere die Entwicklung einer funktionalen Cytotrophoblastenhülle scheint FXIII-abhängig zu sein.<sup>268,269</sup> Es wird vermutet, dass dieser Beobachtung eine unzureichende Ausbildung von Fibrin-Fibronektin-Quervernetzungen (ähnlich der gestörten Wundheilung in FXIII-defizientem Gewebe) an der Oberfläche des Cytotrophoblasten zugrundeliegt, wodurch dessen Hülle nur unzureichend gebildet werden kann.<sup>269</sup> Bei FXIII-suffizienten Frauen konnte bislang kein Zusammenhang zwischen wiederkehrenden Fehlgeburten und temporär erniedrigtem FXIII festgestellt werden.<sup>270</sup> Kürzlich wurde außerdem mittels Magnetresonanztomographie gezeigt, dass embryonaler FXIII und embryonale TGase 2 unterschiedliche Funktionen im Zuge der maternalen Angiogenese während der ersten Tage muriner Schwangerschaft erfüllen: Embryonale TGase 2 ist im Mausmodell ein wichtiger Regulator der dezidualen vaskulären Permeabilität, während der embryonale FXIII die vaskuläre Dichte und Permeabilität reguliert.<sup>271</sup>

Die genaue Rolle von FXIII während der Schwangerschaft ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung.



**Abbildung 2.6:** (Patho-)physiologische Funktionen von FXIII. Übersicht verschiedener physiologischer (grün) und pathologischer (rot) Vorgänge, bei denen FXIII eine Rolle spielt.

# 2.5 FXIII(a) – Pathophysiologie

FXIII ist aufgrund seiner vielseitigen Funktionen in verschiedenen physiologischen Vorgängen (vgl. Abschnitt 2.4.3 und Abschnitt 2.4.4) auch in pathophysiologische Zustände involviert (Abbildung 2.6). Hierzu zählen insbesondere FXIII-Mangelerkrankungen, die in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht wurden.<sup>233</sup> Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von FXIII in weiteren Erkrankungen, wie beispielsweise kardiovaskulären Erkrankungen, Krebs und *Adipositas.*<sup>150</sup> In diesem Zusammenhang gibt es großen Bedarf an weiteren Studien, um die Bedeutung von FXIII weiter einzugrenzen.

### 2.5.1 FXIII-Mangelerkrankungen

FXIII-Mangel ist eine seltene Blutungsstörung. Die Diagnose von FXIII-Mangel ist diffizil, da sämtliche Standardgerinnungstests (Blutungszeit, Prothrombinzeit, Thrombinzeit, partielle Thromboplastinzeit, Thrombozytenzahl) bei FXIII-defizienten Patienten normal ausfallen.<sup>233</sup> Traditionell erfolgte die Diagnose mittels eines Fibrin-Löslichkeitstests, mittlerweile wird stattdessen ein funktionaler FXIII-Assay empfohlen.<sup>144, 272–274</sup>

FXIII-Mangel kann sowohl genetisch bedingt als auch erworben sein, wodurch sich Ausprägung und Behandlung unterscheiden.

#### Hereditärer FXIII-Mangel

Hereditärer FXIII-Mangel kommt mit einer geschätzten Inzidenz von 1 zu 1-3 Millionen Menschen weltweit sehr selten vor.<sup>273, 275, 276</sup> Es wird hierbei – je nachdem welche FXIII-Untereinheit betroffen ist – zwischen FXIII-A-Defizienz und FXIII-B-Defizienz unterschieden. FXIII-A-Mangel wird weiter unterteilt in Typ I und Typ II. Typ I beschreibt einen quantitativen Mangel an FXIII-A, der durch die Synthese von verkürztem oder fehlgefaltetem FXIII-A hervorgerufen wird. Beim Typ II liegt der FXIII-A-Spiegel in der Norm, allerdings ist FXIII-A in diesem Fall – beispielsweise aufgrund einer Mutation im aktivem Zentrum – dysfunktionell. Man spricht in diesem Fall auch von einem qualitativen Mangel.<sup>273</sup> FXIII-Mangel wird klinisch in drei Klassen unterteilt: (1) Schwerer FXIII-Mangel – FXIII-Aktivität ist nicht detektierbar, assoziiert mit spontanen schweren Blutungen; (2) Moderater FXIII-Mangel – FXIII-Aktivität < 30 %, assoziiert mit spontanen oder provozierten leichten Blutungen; (3) Leichter FXIII-Mangel – FXIII-Aktivität > 30 %, meist asymptomatisch.<sup>277, 278</sup>

Das klassische erste Zeichen für FXIII-Mangel ist eine Nabelschnurblutung. Außerdem treten bei schwerem FXIII-Mangel spontane Blutungen auf, wobei die häufigste Todesursache eine Hirnblutung ist.<sup>273</sup> Zudem ist bei FXIII-Mangel die Wundheilung beeinträchtigt und schwangere Frauen erleiden vermehrt Fehlgeburten (vgl. Abschnitt 2.4.4). Die Behandlung erfolgt durch FXIII-Substitution, sei es durch gezielte FXIII-Gabe oder durch Plasmagabe. FXIII-Mangel wird autosomal-rezessiv vererbt. Patienten mit schwerem FXIII-Mangel sind homozygot oder komplex(*compound*)-heterozygot.<sup>273</sup>

Bei Mangel an FXIII-B ist der Krankheitsverlauf meist milder, da funktionelle FXIII-A-Untereinheiten zwar gebildet, aber im Plasma nicht durch FXIII-B-Untereinheiten stabilisiert und daher schneller abgebaut werden. Dadurch ist im Plasma ca. 10 % des Normwerts an FXIII-A detektierbar, während zelluläre FXIII-A-Spiegel nicht beeinträchtigt sind. Der mildere Krankheitsverlauf erschwert die Diagnose des FXIII-B-Mangels.<sup>275</sup>

### Erworbener FXIII-Mangel

Erworbener FXIII-Mangel tritt deutlich häufiger als hereditärer FXIII-Mangel auf, ist aber dennoch eine vergleichsweise seltene Erkrankung. Er kann aufgrund einer eingeschränkten FXIII-B-Synthese in der Leber (Hepatitis, akutes Leberversagen) und/oder durch verstärkten FXIII-Verbrauch in verschiedenen Krankheitsbildern wie Leukämie, Sepsis, Trauma, Lungenembolie, Schlaganfall, Purpura Schönlein-Henoch, Leberzirrhose, disseminierte intravasale Koagulopathie und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen auftreten. Auch große chirurgische Eingriffe können zu FXIII-Mangel führen.<sup>278,279</sup> In diesen Fällen ist die Ausprägung des FXIII-Mangels mit FXIII-Spiegeln zwischen 30 und 70 % des Normwertes meist moderat.<sup>276,278</sup>

Eine weitere Form des erworbenen FXIII-Mangels tritt aufgrund von körpereigenen Autoantikörpern gegen FXIII-A- und/oder (selten) FXIII-B-Untereinheiten auf. Autoantikörper gegen FXIII haben in aller Regel einen schweren FXIII-Mangel zur Folge. Die Therapie von FXIII-Mangel aufgrund von Autoantikörpern ist komplex, da die Substitution wenn überhaupt nur sehr kurzfristig zu einer Milderung der Symptomatik führt.<sup>280</sup> Einige Fälle von FXIII-Autoantikörpern treten im Zusammenhang mit bereits bestehenden Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen *Lupus erythematodes* auf, allerdings sind insbesondere bei älteren Patienten auch mehrere Fälle ohne zugrundeliegende Autoimmunerkrankung beschrieben.<sup>280</sup> Die gebildeten FXIII-Antikörper werden in neutralisierende, nicht-neutralisierende und kombiniert-agierende Antikörper unterteilt.<sup>276, 280, 281</sup> Da FXIII-Substitutionstherapie und Plasmapherese allenfalls zu einer temporären Linderung der Symptome führen, liegt das Hauptaugenmerk in der Therapie darauf, den FXIII-Antikörper zu eliminieren. Dies kann beispielsweise durch eine Eradikationstherapie mittels verschiedener immunmodulatorischer Medikamente wie Corticosteroide, Cyclosporin, Cyclophosphamid und Rituximab (Anti-CD20) geschehen.<sup>280</sup>

In extrem seltenen Fällen treten bei bereits vorliegender FXIII-Defizienz und FXIII-Substitutionstherapie sogenannte Alloantikörper auf, die sich gegen den substitutierten FXIII richten. Bislang wurden vier solcher Fälle berichtet. Einer der Patienten starb im Alter von 15 Jahren. Die Therapie von Alloantikörpern ist ähnlich der von Autoantikörpern.<sup>280</sup>

### 2.5.2 FXIII in kardiovaskulären Erkrankungen

FXIII spielt durch die Katalyse der Fibrinquervernetzung in der Hämostase eine gewichtige Rolle (vgl. Abschnitte 2.3.2 und 2.4.3). Da die Hämostase komplex reguliert ist und es bei Disbalance zwischen Blutfluss und Blutstillung zu pathologischen Zuständen kommen kann, scheint es folgerichtig, dass eine Fehlregulierung von FXIII mit kardiovaskulären Krankheiten assoziiert ist. Erstaunlicherweise waren lange nur wenige Herz-Kreislauf-Erkrankungen bekannt, in denen FXIII von Bedeutung ist.<sup>282</sup> Korrelationen zwischen FXIII und venöser Thrombose konnten zunächst nicht identifiziert werden.<sup>283, 284</sup> Dagegen gab es Hinweise für eine Rolle von FXIII in der Lungenembolie und im Myokardinfarkt.<sup>285, 286</sup> Letzteres wurde allerdings nur geschlechtsspezifisch für Frauen festgestellt. Jüngste Beobachtungen im Mausmodell weisen auf eine Stabilisierung venöser Thromben durch FXIII und ein daraus resultierendes selteneres Auftreten von Lungenembolien hin.<sup>287,288</sup>

Im FXIII-Gen F13A1 ist ein Polymorphismus bekannt, bei dem infolge einer Punktmutation anstelle eines Valins ein Leucin (Val34Leu) in die Polypeptidkette eingebaut wird. Dieser Polymorphismus hat eine Allelfrequenz von ca. 25%, liegt drei Aminosäuren von der Thrombinspaltstelle entfernt und sorgt für eine schnellere Thrombinaktivierung von FXIII. Als Resultat daraus ist auch die quervernetzte Fibrinstruktur im Vergleich zu 34Val verändert.<sup>289–291</sup> Verschiedene Studien weisen daraufhin, dass dieser Polymorphismus seine Träger vor der Entwicklung venöser Thrombosen und koronarer Herzkrankheit 'schützt'.<sup>283,292–295</sup> Dieser Effekt wurde kürzlich auch im Mausmodell näher untersucht.<sup>296</sup> In Bezug auf das Auftreten eines Hirninfarkts konnte die schützende Wirkung dieses Polymorphismus allerdings nicht nachgewiesen werden.<sup>297,298</sup>

Unterschiedliche Beobachtungen weisen darauf hin, dass FXIII auch indirekt an der Entstehung verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt ist. Studien von Zhou *et al.* lassen beispielsweise eine Rolle von FXIII-A bei der Stabilisierung der Gefäßwand während des perivaskulären *Remodelings* vermuten.<sup>299</sup>

Der Angiotensin-II(ATII)-Signalweg ist in pathologische Vorgänge wie *Hypertonie* und *Atherosklerose* involviert.<sup>300</sup> FXIIIa ist in Monozyten in der Lage, die Signalkapazität des ATII-Rezeptor-Typ-1 (AT1) zu erhöhen, indem er AT1-Dimere quervernetzt. In Bluthochdruck-Patienten wurde zudem ein erhöhter Spiegel an AT1-Rezeptordimeren festgestellt.<sup>301</sup> FXIII<sub>Thromb</sub> wurde außerdem in atherosklerotischen Plaques detektiert.<sup>302</sup> Daher ist cFXIIIa möglicherweise ein Risikofaktor für das Auftreten von *Atherosklerose*.

Der Einfluss von FXIII auf die Fibrin- und somit auch auf die Gerinnselstruktur stellt ebenfalls eine indirekte Verbindung zwischen FXIII und kardiovaskulären Erkrankungen dar. Verschiedene Übersichtsartikel und Patientenstudien haben sich in den vergangenen Jahren mit dieser Thematik befasst.<sup>65, 125, 303–309</sup> Der Zusammenhang zwischen FXIII und der Fibrinstruktur im Blutgerinnsel und damit einhergehend auch die Beziehung zwischen FXIII und Gerinnselretraktion (vgl. Abschnitt 2.4.3) hat nach heutigen Erkenntnissen Einfluss auf das Auftreten verschiedener Erkrankungen, die im Zusammenhang mit einer pathophysiologischen Veränderung des kardiovaskulären Systems stehen. So werden abnorme Thrombusstrukturen mit wiederkehrender venöser Thrombose und anderen thromboembolischen Ereignissen in Verbindung gebracht.<sup>86</sup> Auch die antifibrinolytische Funktion von FXIII spielt hierbei eine Rolle.<sup>189</sup> Nikolajsen *et al.* ist es 2014 gelungen, 147 FXIII-Substrate im Plasma zu identifizieren und zu zeigen, dass 48 dieser Substrate durch FXIIIa in das Gerinnsel eingebaut werden.<sup>310</sup> Diese Studie deutet auf weitere bislang nicht näher charakterisierte Funktionen von FXIII während der Gerinnselbildung hin. Die schützende Funktion von FXIII im Herzen (*Cardiac Protection*) wurde bereits im Abschnitt 2.4.4 ausführlich beschrieben und wird hier daher lediglich der Vollständigkeit halber nochmals erwähnt.

Die Kausalität der verschiedenen einflussnehmenden Faktoren konnte in Bezug auf das konkrete Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen noch nicht vollständig aufgeklärt werden, weshalb weitere Forschung in diesem Bereich notwendig ist.

### 2.5.3 FXIII in Diabetes mellitus und Adipositas

FXIII-A wird auch in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas produziert und ist vermutlich an der Insulinregulation beteiligt.<sup>311</sup> Dazu passend wurde in einem Assoziationsscan eine Verbindung zwischen *Diabetes mellitus* Typ II und FXIII-Expression in Langerhans-Inseln festgestellt.<sup>312</sup>

Das F13A1-Gen wurde 2010 in einer genomweiten Transkriptomanalyse als eines von 27 Genen identifiziert, welche potentiell bei der Entstehung von *Adipositas* eine Rolle spielen.<sup>313</sup> Myneni *et al.* stellten daraufhin fest, dass FXIII-A als Regulator der Präadipozyten-Differenzierung agiert und zudem den Insulinsignalweg via Fibronectin-Quervernetzung an die extrazelluläre Matrix von Präadipozyten beeinflusst.<sup>232</sup> FXIII-defiziente Mäuse entwickeln bei sehr fettreicher Nahrung eine metabolisch deutlich gesündere Fettleibigkeit als die Kontrollgruppe. Studien zur metabolischen Gesundheit von FXIII-defizienten Patienten liegen bislang nicht vor.<sup>314</sup> Auch der TGase 2 wird eine regulierende Rolle in der Adipogenese zugeschrieben, welche möglichweiser die Funktion des FXIII komplementiert.<sup>315</sup> Im beschriebenen Zusammenhang ist die FXIII-Forschung noch sehr jung, weshalb es intensiver weiterer Studien bedarf, um die Rolle von FXIII in Bezug auf *Adipositas* näher zu charakterisieren.

### 2.5.4 FXIII und Neoplasien

FXIII-Expression wurde im Kontext verschiedener Neoplasien beschrieben. Das Auftreten von FXIII im Zusammenhang mit verschiedenen Leukämien wurde bisher am intensivsten analysiert. Jeweils unterschiedliche FXIII-Expressionslevel in verschiedenen Arten der akuten Leukämie (AL) wurden erstmals 1992 durch immuncytochemische Detektion sichtbar gemacht.<sup>316</sup> Die FXIII-Färbung eignet sich durch ihre hohe Sensitivität als Marker für verschiedene Subtypen der akuten myeloischen Leukämie (AML).<sup>317–319</sup> Studien über den möglichen prognostischen Wert des Krankheitsverlaufs im seltenen AML-Subtyp der akuten Promyelozytenleukämie kommen zu widersprüchlichen Ergebnissen.<sup>320,321</sup> In der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) ist FXIII-Detektion zwar nicht selten, aber eher

ungewöhnlich, da die lymphatischen (im Gegensatz zu myeloischen) Vorläuferzellen FXIII nicht exprimieren.<sup>319</sup> Aktuelle Studien weisen auf einen prognostischen Wert von FXIII-Detektion in ALL im Kindesalter hin, da hier die FXIII-Expression mit einem besseren Krankheitsverlauf korreliert.<sup>322</sup>

FXIII ist auch in Bezug auf weitere Neoplasien beschrieben. In einigen Hautkrebsarten wird FXIII exprimiert.<sup>323</sup> Dies macht man sich in der Tumorpathologie zunutze, um beispielsweise das Dermatofibroma vom Dermatofibrosarcoma protuberans zu unterscheiden.<sup>324,325</sup> Einige wenige Studien weisen auf einen Einfluss von FXIII auf Tumore der Mundhöhle hin.<sup>326,327</sup> Der Einzelnukleotidpolymorphismus Val34Leu im F13A1-Gen korreliert mit einem erhöhten Risiko, an einem oralen Plattenepithelkarzinom zu erkranken.<sup>326</sup> Im Kontext von Hirntumoren wurde die Anlagerung von quervernetztem Fibrin und FXIII beobachtet.<sup>328</sup> In einer Gliobastomstudie aus 2018 korreliert eine geringere FXIII copy number variation mit einer geringeren Überlebensrate der Betroffenen.<sup>329</sup> Der Einfluss von FXIII wurde auch im Rahmen der Entwicklung von Lungenkrebs untersucht. Zwei Patientenstudien weisen auf einen positiven Effekt von FXIII auf die Tumorprogression und -metastasierung in verschiedenen Formen von Lungenkrebs hin.<sup>330,331</sup> Im Einklang damit zeigt eine Studie im Mausmodell, dass FXIII die hämatogene Metastasierung von Tumorzellen fördert.<sup>332</sup> Außerdem existieren Daten zu FXIII in Brustkrebs,<sup>333</sup> Eierstockkrebs,<sup>334</sup> Darmkrebs<sup>335</sup> und im Leberzellkarzinom.<sup>336</sup> Zuletzt wurden erste Bemühungen vorgestellt, das FXIII-Aktivierungspeptid als Biomarker für die frühzeitige Erkennung von Darmkrebs zu etablieren.<sup>337</sup>

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass verschiedenartige Korrelationen zwischen FXIII und Tumorerkrankungen bestehen. Es bedarf auch hier weiterer Studien, um konkrete kausale Zusammenhänge zu ermitteln.

### 2.5.5 FXIII in chronisch-entzündlichen Erkrankungen

Pathologische Entzündungsprozesse, zu denen es bei Fehlregulierung der Immunantwort kommt, sind ebenfalls eng mit FXIII verknüpft. Einerseits ist FXIII in der Lage, Entzündungen zu kontrollieren, indem es das Fortschreiten der Wundheilung fördert. Dies wurde in verschiedenen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* gezeigt, in denen die FXIII-Aktivität verringert ist.<sup>338–343</sup> Kürzlich wurde beobachtet, dass die Verminderung der FXIII-Aktivität mit einem Verlust an M2-Makrophagen einhergeht.<sup>344</sup> Eine Behandlung von Patienten mit FXIII-Präparaten zeigte zunächst vielversprechende erste Ergebnisse, die klinische Effizienz konnte bislang allerdings noch nicht bestätigt werden.<sup>218,345</sup> In milder bis moderater *Colitis ulcerosa* konnte indes kein prädiktiver Zusammenhang zwischen FXIII-Aktivität und Krankheitsverlauf hergestellt werden.  $^{346}$ 

Andererseits wird FXIII im Hinblick auf *rheumatoide Arthritis* (RA), eine ebenfalls chronische Entzündungskrankheit, eine proinflammatorische Wirkung zugesprochen. Im Plasma von RA-Patienten werden vermehrt D-Dimer, die beim Abbau von quervernetztem Fibrin entstehen und auf eine erhöhte FXIII-Aktivität hinweisen, detektiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass sämtliche pathologische Eigenschaften Kollagen-induzierter *Arthritis* im FXIIIdefizienten Mausmodell signifikant verringert im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen sind.<sup>260</sup> Diese proinflammatorischen Effekte werden auf die Förderung der Osteoklastenbildung durch FXIIIa sowie auf fibrinogenabhängige und fibrinogenunabhängige Entzündungsvorgänge im Gelenk zurückgeführt, die durch FXIII verstärkt werden können. Insbesondere der letztgenannte Aspekt ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.<sup>260</sup>

### 2.5.6 Weitere Erkrankungen im Zusammenhang mit FXIII

Wie aus den bisherigen Ausführungen ersichtlich wird, ist FXIII an einer Vielzahl (patho-) physiologischer Vorgänge beteiligt. Einige Studien deuten zudem auf Funktionen von FXIII in der Lunge,<sup>347,348</sup> im Auge und im Sehnerv,<sup>349–352</sup> in der Hepatozytenregeneration<sup>353</sup> sowie in der Niere<sup>354</sup> hin. Neuesten Erkenntnissen zufolge spielt FXIII außerdem eine Rolle in der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung.<sup>355–357</sup>

# 2.6 FXIIIa-Inhibition

FXIIIa ist insbesondere in Anbetracht seiner Bedeutung für die biomechanische Stabilität, Zusammensetzung und Größe eines Gerinnsels (vgl. Abschnitt 2.4.3) ein interessantes therapeutisches Zielmolekül.<sup>65</sup> Die pharmakologische Adressierung des FXIIIa bietet einige Vorteile gegenüber den etablierten Antikoagulanzien, welche entweder Vitamin K-vermittelt oder direkt an Enzymen der Blutgerinnungskaskade agieren. Diese herkömmlichen Blutverdünner reduzieren zwar nachweislich die Häufigkeit venöser Thrombosen, jedoch geht damit ein nicht zu unterschätzendes Blutungsrisiko einher.<sup>358</sup>

Da ein spezifischer FXIIIa-Inhibitor im Gegensatz zu den allgemein verwendeten Antikoagulanzien weder in die Thrombingeneration noch in die Fibrinbildung eingreift, sollte das Blutungsrisiko deutlich vermindert werden können. Eine FXIIIa-Inhibition im Plasma könnte in diesem Zusammenhang für eine Wirkung auf die Gerinnselgröße und -stabilität ausreichend sein, da FXIII<sub>Thromb</sub> hierbei allenfalls eine untergeordnete Rolle spielt. Ein nicht-thrombozytenmembrangängiger Inhibitor sollte im Gegenzug für eine Restaktivität

Inhibitor	Wirkung / Potenz	Spezifität
Chemische Reagenzien		
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) <sup>359</sup>	Komplexierung von Ca <sup>2+</sup> -Ionen	keine
lodacetamid (IAA) <sup>360</sup>	Alkylierung von Cysteinen	keine
	$IC_{50} = 2,9  \mu M^{361}$	
Stickoxid (NO) <sup>362</sup>	S-Nitrosylierung von	keine
	Sulfhydrylgruppen	
Kompetitive Substrate		
Glycinethylester <sup>363</sup>		hemmt TGase 2
Dansylcadaverin <sup>363</sup>		hemmt TGase 2
Niedermolekulare Verbindungen		
Alutacenonsäuren A und B <sup>364</sup>	$IC_{50}(A) = 1,9  \mu M;$	B hemmt TGase 2
	$IC_{50}(B) = 0,61  \mu M;$	mit $20 \times IC_{50}$
Cerulenin <sup>365</sup>	$IC_{50}$ < 6,2 $\mu M^{366}$	wirkt antibiotisch
Alutacenonsäure-B-Derivat <sup>367</sup>	$IC_{50} = 0,026  \mu M$	nicht bekannt
L722151 <sup>368, 369</sup>	$IC_{50}$ $<$ 0,5 $\mu$ M; <sup>366</sup>	hemmt TGase 2 <sup>370</sup>
	$k_{2nd}{=}23000M^{-1}s^{-1}$	
L682777 (T101) <sup>369, 371</sup>	$IC_{50}$ $<$ 0,25 $\mu$ M; <sup>372</sup>	hemmt TGase 2:
	$k_{2nd} {=} 63000  M^{-1} s^{-1}$	$IC_{50}{=}0,25\mu M^{372}$
Bisamidoepoxid-Derivate <sup>373</sup>	$IC_{50} = 0,004-0,7  \mu M$	hemmen TGase 2
Antikörper		
MAb 309 <sup>374</sup>	Monoklonaler Antikörper,	nicht bekannt
	inhibiert 99% der Aktivität	
9C11 <sup>375, 376</sup>	Monoklonaler Antikörper	nicht bekannt
Peptidische Inhibitoren		
ZED1251 <sup>377</sup> Ac-Asn-MAP-Glu-Gln-Val-Ser- Pro-Leu-Thr-Leu-Leu-Lys(alloc)-OH	$k_{2nd} {=} 5500  M^{-1} s^{-1}$	nicht bekannt
ZED1301 <sup>137</sup>	$IC_{50} = 100 \text{ nM};^{372}$	hemmt TGase 2
Ac-Asp-MAP-NIe-NIe-Leu-Pro-Trp-Pro-OH	$k_{2nd} = 4600 \ M^{-1} s^{-1}$	mit 25 x IC <sub>50</sub>
$Cbz\operatorname{-}Phe\operatorname{-}Glu(CMK)\operatorname{-}Val\operatorname{-}Lys\operatorname{-}Val\operatorname{-}Ile\operatorname{-}Gly\operatorname{-}NH_2^{378}$	$k_{2nd} {=} 681  M^{-1} s^{-1}$	nicht bekannt
Peptidomimetika		
ZED3197 <sup>379</sup>	$IC_{50} = 10-24 \text{ nM}$	TGase 2: $19 \times IC_{50}$ ;
	irreversible Inhibition	hemmt TGase6
Allosterische Inhibitoren		
NSGM 13 <sup>361</sup>	$IC_{50} = 36,2  \mu M$	hemmt gTGase:
	reversible Inhibition	$IC_{50} = 23,5  \mu M$

 Tabelle 2.2:
 Übersicht zu verschiedenen FXIIIa-Inhibitoren.

MAP Michael-Akzeptor-Pharmakophor CMK Chloromethylketon

 $NSGM \ Nicht-Saccharid-Glucosaminoglycan-Mimetikum \qquad gTG ase \ Meerschweinchen-Transglutaminase$ 



**Abbildung 2.7:** Strukturformeln des peptidischen FXIIIa-Inhibitors ZED1301<sup>137</sup> und des aus ihm weiterentwickelten Peptidomimetikums ZED3197<sup>379</sup> sowie des allosterischen Inhibitors NSGM 13 (Nicht-Saccharid-Glucosaminoglycan-Mimetikum 13).<sup>361</sup>

des Gesamt-FXIII sorgen, welche gefährliche Blutungen als Nebenwirkungen verhindern könnte. $^{65}$ 

Partielle FXIII-Reduktion verlängert im Mausmodell nicht die Blutungszeit.<sup>177</sup> Passend hierzu sind Personen mit milder FXIII-Defizienz im Regelfall asymptomatisch.<sup>380</sup> Ein spezifischer FXIIIa-Inhibitor könnte sich folglich durch eine große therapeutische Breite von den herkömmlichen Antikoagulanzien absetzen.<sup>65</sup>

### 2.6.1 FXIIIa-Inhibitoren

Es sind bis zum heutigen Zeitpunkt verschiedene Wirkstoffe beschrieben, die FXIII in seiner Aktivität hemmen. Diese Substanzen sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst und einige ausgewählte jüngere Strukturen in Abbildung 2.7 dargestellt. Die aufgelisteten Inhibitoren haben viel zum aktuellen Kenntnisstand über FXIII beigetragen, allerdings verfügen sie über zwei empfindliche Defizite in Bezug auf eine medizinische Anwendung. Einerseits mangelt es den meisten der genannten Inhibitoren an Spezifität: Sie hemmen nicht nur FXIII sondern auch TGase 2, was in der Klinik zu fatalen Nebenwirkungen führen kann. Andererseits verfügen sie über eine sehr kurze Plasma-Halbwertszeit (5-10 min).<sup>381</sup> In den letzten Jahren wurden einige peptidische FXIII-Inhibitoren entwickelt, um diese Defizite auszumerzen. Mit einem dieser Inhibitoren (ZED1301) gelang es, durch Co-Kristallisation die Struktur von FXIIIa aufzuklären.<sup>137</sup> Kürzlich wurde mit dem Peptidomimetikum ZED3197 eine Weiterentwicklung des ZED1301 veröffentlicht, das in ersten *In-vitro*- und *In-vitro*-Studien Potential für eine medizinische Anwendung aufzeigt (Abbildung 2.7).<sup>379</sup>

# 2.7 Tridegin

Tridegin ist bis dato der einzige bekannte natürliche peptidische Inhibitor von FXIIIa. Tridegin wurde 1997 erstmals von Finney *et al.* beschrieben. Der Name Tridegin leitet sich vom walisischen Wort *triarddeg* (dreizehn) ab.<sup>6</sup> Tridegin wird vom Amazonas-Riesenblutegel *Haementeria ghilianii* (*H. ghilianii*) in seinen Speicheldrüsen produziert, um bei der Blutmahlzeit das Blut flüssig zu halten. Tridegin verhindert die Quervernetzung von Fibrin. Im Anschluss löst Hementin, ein Enzym des *H. ghilianii*, die sich bildenden nichtquervernetzten Fibringerinnsel des Wirts wieder auf.<sup>5, 6</sup>

Bei der ursprünglichen Charakterisierung des isolierten Tridegin wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 9,2 nM ermittelt und mithilfe von Edman-Abbau die Aminosäuresequenz analysiert. Einige Stellen der 66 Aminosäuren langen Sequenz konnten hierbei nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden (Abbildung 2.8, Sequenz 1). Außerdem wurde auch die Wirkung von Tridegin auf andere Enzyme der Blutgerinnungskaskade (FXa, Thrombin) sowie auf Cysteinproteasen (Bromelain, Cathepsin C, Papain) getestet und keine Beeinträchtigung festgestellt. Experimente zur Spezifität von Tridegin ergaben, dass Tridegin Meerschweinchen-TGase, die der humanen TGase 2 recht nahe kommt, zwar inhibiert, allerdings mit einem 23fach höheren IC<sub>50</sub>-Wert als dem für FXIIIa.<sup>6</sup> Demzufolge ist Tridegin ein sehr potenter und spezifischer FXIII-Inhibitor.

1	KLLPCKE <mark>X</mark> HQ	GIPNPRC <mark>X</mark> CG	ADLE <mark>X</mark> AQDQY	CAFIPQC	<b>/E</b> RPR	SELIKPMDDI	YQRPV <mark>C/</mark>	EFPNL	PLKPR	C/E
2	MKLLPCKEWHQ	GIPNPRC <b>W</b> CG	ADLE <b>C</b> AQDQY	CAFIPQ	<b>C</b> RPR	SELIKPMDDI	YQRPV <b>E</b>	FPNL	PLKPR	EE
3	KLLPCKE <b>W</b> HQ	GIPNPRC <b>W</b> CG	ADLE <b>C</b> AQDQY	CAFIPQ	<b>C</b> RPR	SELIKPMDDI	YQRPV <b>E</b>	FPNL	PLKPR	Е
	KLLP <b>C</b> KEWHQ	GIPNPR <b>CWC</b> G	ADLE <b>C</b> AQDQY	<b>C</b> AFIPQ	C RPR	SELIKPMDDI	YQRPV E	FPNL	PLKPR	Е
4	KLLP <mark>S</mark> KEWHO	GIPNPRSWSG	ADLESAODOY	SAFIPO	S RPR	SELIKPMDDI	YORPV F	FPNL	PLKPR	Е

**Abbildung 2.8:** Trideginsequenzen. 1: Sequenz aus Finney *et al.* 1997.<sup>6</sup> Unklare Aminosäurenpositionen sind rot markiert. X steht für eine beliebige Aminosäure. 2: Sequenz aus Linxweiler *et al.* 2000.<sup>382</sup> Zusätzliche Aminosäuren im Vergleich zu 1 sind grün markiert. Fette schwarze Buchstaben bezeichnen die Aminosäuren an den zuvor unklaren Positionen. 3: Sequenz aus Böhm *et al.* 2012.<sup>383</sup> Cysteine sind blau markiert. 4: Mutierte Sequenz aus Böhm *et al.* 2014.<sup>384</sup> Mutationen von Cystein zu Serin sind violett markiert.

Der  $IC_{50}$  von 9,2 nM konnte seither nicht reproduziert werden. Dies hat verschiedene Gründe. Einerseits wurde seit der Erstbeschreibung von Finney *et al.* in 1997 nicht mehr aus *H. ghilianii* isoliertes Tridegin beschrieben, sondern rekombinant oder chemosynthetisch produziertes Tridegin. Das native Tridegin kann sich daher vom exprimierten oder synthetisierten Tridegin sowohl in der genauen Sequenz (vgl. Abschnitt 2.7.1) als auch in posttranslationalen Modifikationen unterscheiden. Andererseits ist der  $IC_{50}$ -Wert grundsätzlich abhängig vom benutzten Assay. Folglich sind die  $IC_{50}$ -Werte unterschiedlicher Arbeitsgruppen nicht miteinander vergleichbar.

### 2.7.1 Trideginsequenz

Die anfangs lückenhafte Trideginsequenz (vgl. Abschnitt 2.7) wurde nach einigen Jahren vervollständigt. Zwischen 2000 und 2003 wurden drei Patentschriften zu Tridegin veröffentlicht,<sup>382, 385, 386</sup> von denen zwei eine vollständige Aminosäuresequenz von Tridegin enthielten.<sup>382, 386</sup> Im Vergleich zur von Finney *et al.* veröffentlichten Sequenz gab es zwei zusätzliche Aminosäuren, ein N-terminales Methionin und eine C-terminale Glutaminsäure. Wie diese Aminosäuresequenz ermittelt wurde, wurde hingegen nicht erläutert.

2005 beschrieben Faria *et al.* eine trideginähnliche cDNA-Sequenz in *Haementeria depressa* (*H. depressa*). Dieses Homolog konnte auf Peptidebene allerdings nicht nachgewiesen werden und wurde bis dato auch nicht chemisch synthetisiert.<sup>387</sup> Dr. T. Kühl (Universität Bonn) führte ein *Alignment* der lückenhaften Trideginsequenz aus *H. ghilianii* mit der trideginähnlichen Sequenz in *H. depressa* durch und vervollständigte so die Sequenz aus *H. ghilianii*.<sup>383,388</sup> Hierbei entstand eine Sequenz, die abgesehen von den zwei zusätzlichen Aminosäuren mit der in den Patentschriften veröffentlichten Sequenz übereinstimmte und fortan in der Arbeitsgruppe von Prof. Diana Imhof (Universität Bonn) verwendet wurde (Abbildung 2.8, Sequenz 3).

### 2.7.2 Tridegin – funktionelle Eigenschaften

In einer der veröffentlichten Patentschriften zu Tridegin wurde damit begonnen, die Aminosäuresequenz funktionell aufzuklären. Hierbei wurde die hauptsächliche inhibitorische Aktivität von Tridegin im C-terminalen Teil des Peptids lokalisiert und anschließend wurden mittels Alaninscan für die Funktion wichtige Aminosäurereste identifiziert.<sup>386</sup> In späteren Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Diana Imhof wurde die Bedeutung des Isoleucins an Position 50 sowie des Leucins an Position 62, die durch Giersiefen *et al.* vorgeschlagen worden waren, bestätigt.<sup>389,390</sup>

Dr. M. Reuleaux (geb. Böhm) führte in den Folgejahren weitere Analysen zur funktionellen Charakterisierung des Tridegin durch. Sie zeigte, dass N-terminal-verkürzte Peptide sich wie Substrate für FXIIIa verhalten, deren inhibitorische Aktivität mit der Zeit abnimmt. Der Glutaminrest an Position 52, der durch FXIIIa deamidiert beziehungsweise transamidiert werden kann, wurde als ursächlich für dieses Verhalten identifiziert. Dieses Substratverhalten wurde für N-terminal-verkürzte Peptide bis zu einer Länge von 60 Aminosäuren, jedoch nicht für Tridegin in voller Länge beobachtet.<sup>383, 384, 390, 391</sup> Warum Tridegin in voller Länge nicht auch dieses Substratverhalten aufweist ist noch unklar. Es wird vermutet, dass das Substratverhalten nicht primär von der Peptidlänge, sondern von der dreidimensionalen Struktur des gesamten Peptids abhängt.<sup>391</sup>

Durch den Vergleich von oxidiertem Volllängen-Tridegin mit reduziertem Volllängen-Tridegin sowie mit einer Mutante, in der alle Cysteinreste durch Serin ersetzt wurden (siehe Abbildung 2.8, Sequenz 4), wurde festgestellt, dass die Oxidation des Tridegin seine inhibitorische Aktivität um den Faktor 3-4 erhöht. Für die Stabilität des Inhibitors in Gegenwart von FXIIIa schien die Oxidation der Peptidkette keine Rolle zu spielen. Für keine der getesteten 66mer-Sequenzen wurde ein Substratverhalten ähnlich wie bei den verkürzten Varianten beobachtet.<sup>384,391</sup>

Tridegin wurde in zwei Teile unterteilt, ein disulfidverbrücktes N-terminales Segment ( $K^{1}-C^{37}$ ) und ein flexibles C-terminales Segment ( $R^{38}-E^{66}$ ). Erwartungsgemäß zeigte das N-terminale Segment keine messbare FXIIIa-Inhibition, während das C-terminale Segment FXIIIa ähnlich wie andere C-terminale Segmente vergleichbarer Länge inhibierte.<sup>384,392</sup> Zudem wurde festgestellt, dass sowohl Herstellungsweg (chemische Synthese *vs.* rekombinante Expression) als auch Dimer-Bildung die Inhibitoraktivität von Tridegin beeinflussen. Die aktivsten Trideginvarianten waren demnach rekombinant exprimierte Tridegindimere, dicht gefolgt von chemisch synthetisierten Tridegindimeren. Der Grund für die bessere Wirksamkeit der Dimere konnte bis dato noch nicht ermittelt werden.<sup>383,384,392</sup> Außerdem ist bisher nicht geklärt, um welche Art von Disulfiddimeren es sich handelt.

Studien zur Aufklärung des Inhibitormodus ergaben, dass Tridegin kein 'simpler' kompetitiver Inhibitor ist, sondern offenbar einen recht komplizierten Inhibitionsmechanismus hat, der mit den verfügbaren Standardmodellen nicht beschrieben werden kann.<sup>391</sup>

Außerdem wurden Bindungsstudien mittels *Microscale Thermophoresis* (MST) durchgeführt, die darauf hinweisen, dass der N-terminale Teil des Peptids einen großen Teil zur Bindung an FXIIIa beiträgt, während der C-terminale Bereich des Peptids hauptsächlich für die Inhibition als solche verantwortlich ist.<sup>384,392</sup>

### 2.7.3 Tridegin – strukturelle Eigenschaften

Zur strukturellen Aufklärung von Tridegin wurden verschiedene Experimente durchgeführt. CD-spektroskopische Analysen deuten auf geringe Anteile von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern sowie größere Anteile von  $\beta$ -Schleifen und ungeordneten Strukturen hin.<sup>390,391</sup> NMR-Strukturanalysen konnten aufgrund der Tendenz von Tridegin, in hoher Konzentration zu aggregieren, bislang nicht durchgeführt werden. Es wurden außerdem viele Versuche unternommen, Tridegin alleine sowie zusammen mit FXIII zu kristallisieren. Leider wurden in diesem Zusammenhang ausschließlich Kristalle des bereits kristallographisch charakterisierten FXIII-A<sup>158</sup> gebildet. Die Schwierigkeiten in beiden strukturellen Aufklärungsmethoden sind möglicherweise auf das Vorliegen eines Disulfidisomerengemischs zurückzuführen (vgl. folgenden Abschnitt), was zum Zeitpunkt der Analysen noch nicht bekannt war.<sup>384,391</sup>

#### Disulfidisomere

Tridegin verfügt über sechs Cysteine (C5, C17, C19, C25, C31, C37), die in der Lage sind, drei Disulfidbrücken auszubilden. Theoretisch sind somit 15 verschiedene Disulfidisomere, die in der vorliegenden Arbeit vereinfacht fortan teilweise 'Isomere' genannt werden, möglich.<sup>384</sup> Der Begriff 'Isomer' bezieht sich in diesem Fall ausschließlich auf die Verbrückung der Cysteine untereinander; es handelt sich demnach um Konformationsisomere.

In einem pufferbasierten Selbstfaltungs-Oxidationsansatz wurden drei verschiedene (der 15 theoretisch möglichen) Trideginisomere mittels Verdau und anschließender massenspektrometrischer Analyse zweifelsfrei identifiziert (Abbildung 2.9).<sup>384,391</sup> Diese drei Isomere zeichnen sich durch eine gemeinsame Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 19 und 25 aus. Indes konnte eine mögliche strukturelle Homologie zum Thrombininhibitor Hirudin (Disulfidverbrückung C1–C2, C3–C5, C4–C6) nicht bestätigt werden.<sup>391</sup>

Eine Trennung der drei identifizierten Isomere war mit den verfügbaren chromatographischen Methoden nicht möglich. Daher beruht ihre individuelle Analyse bislang auf computergestützten Studien (vgl. folgender Abschnitt).<sup>384,391</sup>

### Molekulare Modellierungs- und Docking-Studien

Da eine experimentelle Aufklärung der Trideginstruktur bislang nicht möglich war, wurden die drei identifizierten Trideginisomere computergestützt mittels *Threading* modelliert. Die resultierenden Strukturen wurden an die Kristallstruktur des aktivierten FXIIIa gedockt. Die *Docking*-Daten weisen auf unterschiedliche Bindungsmodi der verschiedenen Isomere in Bezug auf FXIIIa hin (Abbildung 2.9).<sup>384,391</sup> Eine experimentelle Bestätigung der unterschiedlichen Bindungsmodi steht noch aus.



**Abbildung 2.9:** Mittels *Threading* modellierte Strukturen (links) der Isomere A (rot), B (grün) und C (blau) sowie *Docking* der drei Isomere an FXIIIa (FXIII-A°, PDB 4KTY, rechts).<sup>384,391</sup> Die Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt. Zusätzlich sind Strukturen und Disulfidverbrückungen jeweils schematisch dargestellt (links). Der blassgelbe Kreis (rechts) markiert das katalytische Zentrum von FXIIIa.

# 3 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Kenntnisse zum FXIIIa-Inhibitor Tridegin zu erweitern und dieses Peptid intensiv strukturell und funktionell zu analysieren. In Ermangelung eines spezifischen FXIIIa-Inhibitors in der medizinischen Anwendung soll in diesem Zusammenhang auch eine Leitstruktur für die FXIII-Inhibitorentwicklung ermittelt werden, die in größeren Maßstäben produziert und getestet werden kann.

Basierend auf der Identifizierung von drei verschiedenen disulfidverbrückten Trideginisomeren, welche bisher nicht getrennt und daher nicht einzeln experimentell charakterisiert werden konnten,<sup>384</sup> sollen diese drei Trideginisomere mittels einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie gezielt hergestellt und im Anschluss funktionell und strukturell analysiert werden. Diese drei Isomere beherbergen allesamt die Disulfidbrücke C19–C25 und unterscheiden sich lediglich in den zwei weiteren Disulfidbrücken. Darüber hinaus werden auf die gleiche Weise zwei weitere Disulfidisomere synthetisiert. Eines dieser Isomere erhält die klassischen *Knottin*-Disulfidverbrückung, die z. B. aus Conotoxinen bekannt ist und Auskunft darüber geben soll, wie sich eine maximale konformationelle Einschränkung der Flexibilität des N-terminalen Trideginabschnitts auf seine Funktionalität auswirkt. Außerdem soll die Charakterisierung eines Isomers mit Disulfidbrücken in Anlehnung an das *leech antihemostatic protein* (LAP-)Motiv zur Aufklärung beitragen, ob Tridegin tatsächlich strukturell nicht mit dem Thrombininhibitor Hirudin vergleichbar ist.

Parallel zu diesen synthetisch komplexen Trideginisomeren sollen drei von Thomas Schmitz im Arbeitskreis von Prof. Diana Imhof synthetisierte zweifach disulfidverbrückte Analoga biologisch charakterisiert werden. Auf Grundlage der Existenz der C19–C25-Disulfidverbrückung in allen drei identifizierten Trideginisomeren soll ermittelt werden, ob diese Disulfidbrücke für die Funktionalität des Peptids notwendig ist.

Schließlich soll ein Versuch unternommen werden, die native Trideginsequenz, welche seit der Erstbeschreibung in 1997 nicht mehr weiter analysiert wurde, zu ermitteln. Hierzu wird genomische DNA aus nativem Material des *H. ghilianii* isoliert und sequenziert, um das für Tridegin kodierende Gen zu identifizieren.

Zusammenfassend dient die vorliegende Dissertation der umfassenden Einschätzung des Naturstoffs Tridegin als möglichen zukünftigen Arzneistoff.

# 4 Material und Methoden

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden in den Laboratorien der Arbeitsgruppe von Prof. Diana Imhof (Universität Bonn) sowie teilweise in Laboratorien von Kooperationspartnern durchgeführt. Diese Studien werden hier zur besseren Nachvollziehbarkeit der gesamten Ergebnisse (unter Nennung des jeweiligen Kooperationspartners) ebenfalls beschrieben. Weitere methodische Details können in den Manuskripten Bäuml, Schmitz *et al.* 2019 und Bäuml *et al.* 2020 eingesehen werden.<sup>393,394</sup>

Alle Abkürzungen für Aminosäuren und entsprechende Derivate wurden gemäß der Empfehlungen des *Nomenclature Committee of IUB* (NC-IUB) und des *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) verwendet. Alle Aminosäuren und -derivate liegen in L-Konfiguration vor, sofern nicht anders angegeben.

# 4.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller		
Lösungsmittel und -zusätze			
Acetonitril (MeCN, HPLC-Qualität)	VWR (HiPerSolv CHROMANORM)		
Cyclohexan (analysenrein)	VWR (AnalR NORMAPUR)		
Dichlormethan (DCM, HPLC-Qualität)	VWR (HiPerSolv CHROMANORM)		
Diethylether (technisch)	VWR Chemicals (GRR RECTAPUR)		
Dimethylformamid (DMF, analysenrein)	VWR (AnalaR NORMAPUR)		
Dimethylformamid (DMF, technisch)	VWR (TECHNICAL)		
Essigsäure (analysenrein)	VWR (AnalR NORMAPUR)		
Ethylacetat (technisch)	Julius Hoesch		
lsopropylalkohol (HPLC-Qualität)	VWR (HiPerSolv CHROMANORM)		
Methanol (analysenrein)	VWR (AnalaR NORMAPUR)		
Trifluoressigsäure (TFA, für die Spektroskopie)	Merck Uvasol®		
Wasser (HPLC-Qualität)	VWR (HiPerSolv CHROMANORM)		

Tabelle 4.1: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Peptidsynthese, -abspaltung und -oxidation	
Anisol	FLUKA Chemika
O-Benzotriazol-tetramethyluronium-hexafluoro-	Iris Biotech
phosphat (HBTU)	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	FLUKA Chemika
1,2-Ethandithiol	FLUKA Chemika
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Glutathion, oxidiert (GSSG)	Sigma-Aldrich
Glutathion, reduziert (GSH)	Merck
lod	VWR
N-Methylmorpholin (NMM)	Sigma-Aldrich
Phenol	Merck
Piperidin	Alfa Aesar
Thioanisol	Alfa Aesar
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck (zur Synthese)
Aminosäurederivate	
Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-	ORPEGEN Pharma
OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH,	
Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-	
Glu(O <i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-	
OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-	
OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH,	
Fmoc-Ser( <i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-	
Tyr( <i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-Val-OH	
Fmoc-Cys( <i>t</i> Bu)-OH	Novabiochem
Pufferbestandteile	
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck
$Dinatriumhydrogenphosphat\ (Na_2HPO_4)$	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	VWR (NORMAPUR)
Natriumhydroxid (NaOH, 1M)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth
Salzsäure (HCl, 1M)	Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth (Pufferan)
Tris-HCI	Roth (Pufferan)
Massenspektrometrische Analyse	
Chymotrypsin	Boehringer Mannheim
α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure (HCCA)	Sigma-Aldrich

 Tabelle 4.1: Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)

	- ,
Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem BioChemica
Essigsäure (HPLC-Qualität)	VWR (HiPerSolv CHROMANORM)
Iodacetamid (IAA)	AppliChem BioChemica
Protein Calibration Standard I	Bruker Daltonics
Aminosäureanalytik	
Fertigreagenz Ninhydrin	Laborservice ONKEN
Puffer A-F	Laborservice ONKEN
Probenverdünnungspuffer (PVP)	Laborservice ONKEN
Enzymaktivitätsassays	
N,N-Dimethylcasein (DMC)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
$Faktor XIII (Fibrogammin^{\circledast})$	CSL-Behring
Faktor XIIIa (human, T070)	Zedira
$Glu(NH-(CH_2)_4-NH-Abz)-Substrat$	T. Steinmetzer, Universität Marburg
3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Roth
Rhodamin-B-Isonipecotylcadaverin (R-I-Cad)	M. Pietsch, Universitätsklinikum Köln
Transglutaminase 2 (TGase 2, human, T022)	Zedira
Zellbasierte Assays	
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfon-	Sigma-Aldrich
säure (HEPES)	
Gewebefaktor ( <i>tissue factor</i> , TF, Innovin <sup>®</sup> )	Dade Behring
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
T101 (FXIII-Inhibitor)	Zedira
Genomsequenzierung	
AMPure XP Beads ( <i>Magnetic Beads</i> )	Beckman Coulter
DNeasy Blood & Tissue Kit (AL-, ATL-, AW1-, AW2-	Qiagen
Puffer, Proteinase K)	
HS Extended Genomic Ladder	Agilent
HS Genomic DNA 50 kb Kit	Agilent
$NEBNext{}^{\mathbbmsc{R}}$ Companion Module for Oxford Nanopore	New England BioLabs
Technologies® Ligation Sequencing	
Qiagen Multiplex PCR Kit	Qiagen
RNase A	Qiagen
Sequencing Kit SQK-LSK109	Oxford Nanopore Technologies
Speicheldrüsengewebe aus <i>H. ghilianii</i>	Biopharm Leeches

 Tabelle 4.1: Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)

# 4.2 Geräte

Gerät	Hersteller	Firmensitz	
Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4	CHRIST	Osterode (Harz), GER	
Vakuumkonzentrator RVC 2-18 $CD_{plus}$	CHRIST	Osterode (Harz), GER	
Vakuumpumpe ChemStar 2070-02	W/alah		
Vakuumpumpe Chemvac P6Z - 101	weich	Fürstenfeldbruck, GER	
Vakuumpumpe LVS 106 T - 10 ef	by Gardner Denver		
Vakuumpumpe MZ 2C NT	$Vacuubrand^{\mathbb{R}}$	Wertheim, GER	
Vortex VF2	IKA <sup>®</sup> Labortechnik	Staufen, GER	
Vortex Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, NY, USA	
Rotationsverdampfer Rotavapor RE111	BÜCHI Labortechnik	Flawil, CHE	
Zentrifuge EBA 20	Hettich	Tuttlingen, GER	
Zentrifuge Mikro 20	Hettich	Tuttlingen, GER	

Tabelle 4.2: Allgemeine Ausrüstung und Geräte

GER Deutschland NY New York USA Vereinigte Staaten von Amerika CHE Schweiz

# 4.3 Festphasenpeptidsynthese (SPPS)

Die Festphasenpeptid<br/>synthese (Solid-Phase Peptide Synthesis, SPPS) wurde mittels eines EPS (Economy Peptide Synthesizer) 221 und eines Res<br/>Pep SL Syntheseautomats (beide Intavis Bioanalytical Instruments, Köln, Deutschland) gemäß einem Standard-Fmoc-Protokoll durchgeführt. Hierbei wurde ein Rink-Amid-MBHA-Harz mit einer Beladungskapazität von 0,53 mmol/g (Iris Biotech GmbH) als polymeres Trägermaterial verwendet.

Um die zielgerichtete Synthese verschiedener Tridegindisulfidisomere sicherzustellen, wurden drei verschiedene Cystein-Schutzgruppen (Trityl, Acetamidomethyl und *tert*-Butyl) für die sechs in der Trideginsequenz vorkommenden Cysteine verwendet. Die angewandte Schutzgruppenstrategie kann Abbildung 4.1 entnommen werden.

### 4.3.1 Automatische Festphasenpeptidsynthese

Die linearen Vorläuferpeptide wurden mithilfe des folgenden Standardprotokolls synthetisiert. Alle Angaben beziehen sich auf 100 mg Harz.

- 1. Vorbereitung des Harzes
  - Mit 2500 µl DMF waschen
  - Mit 1400 µl DCM waschen
  - Mit 1400 µl DMF waschen
  - Mit 300 µl Luft spülen
  - Mit 2500 µl DMF waschen
- 2. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe
  - + 2× Fmoc abspalten mit 1000 µl 20 % Piperidin in DMF 6-20 min\*
  - Mit  $4000 \,\mu l$  DMF was chen
  - Mit 1400 µl DMF waschen
  - Mit 300 µl Luft spülen
  - $2 \times \text{ mit } 2000 \, \mu \text{l DMF was$  $chen}$
- 3. Kopplung der Aminosäure
  - Folgende Bestandteile separat mischen: 450 µl HBTU (0,6 M in DMF), 125 µl NMM/DMF (1:1), 10 µl DMF und 420 µl Aminosäure (0,6 M in DMF)
  - Kopplung 7-30 min (abhängig von aktueller Peptidlänge)\*
  - Gleiche Bestandteile wie zuvor separat mischen
  - Kopplung 7-30 min (abhängig von aktueller Peptidlänge)\*
  - Mit 3000 µl DMF waschen
  - $2 \times \text{mit } 1400 \,\mu\text{l DMF}$  was chen
  - $2 \times \text{ mit } 2000 \, \mu \text{l DMF was$  $chen}$
- 4. Finale Fmoc-Abspaltung und Waschen des Produkts
  - + 3× Fmoc abspalten mit 1000 µl 20 % Piperidin in DMF 10 min
  - Mit 4000 µl DMF waschen
  - Mit 1400  $\mu l$  DMF was chen
  - Mit 300 µl Luft spülen
  - $2 \times \text{ mit } 2000 \, \mu \text{l DMF waschen}$
  - $4 \times \text{ mit } 1400 \, \mu \text{l DCM was$  $chen}$
  - $2 \times$  mit 4500 µl Luft spülen

Die Schritte 2 und 3 wurden für die Synthese der linearen Trideginvorläuferpeptide gemäß der Aminosäurenanzahl 66-mal wiederholt. Die Dauer der Fmoc-Abspaltung sowie des Kopplungsschrittes (\*) wurde bei wachsender Peptidlänge verlängert. Die Kopplungsdauer betrug daher bei den ersten acht Kopplungen 7 min, von der neunten bis zur 16. Kopplung 20 min und bei allen weiteren Kopplungen (17-66) 30 min. Alle Aminosäuren wurden in DMF gelöst (0,6 M). Nach der Synthese wurde das harzgekoppelte Peptidprodukt getrocknet.

### 4.3.2 Abspaltung der Peptide von der Festphase

Zur Abspaltung der Peptide von der festen Phase und der Entschützung der Aminosäuren (bis auf Cys-Acm und Cys-tBu) wurde zunächst 150 µl Reagenz K (0,75 g Phenol, 0,25 ml Ethandithiol, 0,5 ml Thioanisol) und anschließend 1 ml 95 % TFA pro 100 mg harzgekoppeltes Peptid auf Eis zugegeben. Die Mischung wurde 3 h bei Raumtemperatur (RT) geschüttelt und das Harz im Anschluss gefiltert. Das abgespaltene Peptid wurde in kaltem Diethylether präzipitiert und das Pellet durch mehrere Zentrifugations- und Resuspensionsschritte mehrfach mit Diethylether gewaschen. Das luftgetrocknete Rohprodukt wurde in einem geeigneten Lösungmittel (50 % MeCN, 50 % H<sub>2</sub>O, 0,1 % TFA) gelöst und vor der Reinigung mittels semipräparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) lyophilisiert.

# 4.4 Reinigung der Peptide mittels semipräparativer HPLC

Die Reinigung des Rohprodukts wurde mittels semipräparativer HPLC-Trennung an einem Shimadzu LC-8 System durchgeführt. Peptidmengen zwischen 5 und 20 mg wurden mithilfe einer semipräparativen Vydac-Säule (218TP1022, C18 Reverse Phase,  $250 \ge 22 \text{ mm}$ , 5 µm Korngröße, 100 Å Porengröße), Peptidmengen zwischen 20 und 120 mg mittels einer semipräparativen Eurospher-Säule (Knauer, C18 Reverse Phase,  $250 \ge 32 \text{ mm}$ , 5 µm Korngröße, 100 Å Porengröße) gereinigt.

Zur Peptidreinigung wurde ein Gradientenelutionssystem bestehend aus Eluent A (0,1% TFA in H<sub>2</sub>O) und Eluent B (0,1% TFA in 9:1 MeCN:H<sub>2</sub>O) verwendet. Die Gradientenelution wurde durch eine Konzentrationserhöhung des Eluenten B von 10% auf 60% innerhalb von 120 min durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 3,6 ml. Die Peptidelution wurde durch Absorptionsmessung bei  $\lambda = 220$  nm beobachtet. Gesammelte Fraktionen wurden lyophilisiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

## 4.5 Oxidation der linearen Vorläuferpeptide

Zur Synthese der fünf dreifach disulfidverbrückten Trideginisomere sowie der drei zweifach disulfidverbrückten Trideginanaloga wurden orthogonale Schutzgruppenstrategien (Abbildung 4.1) neben einem pufferbasierten Selbstfaltungsansatz verwendet.<sup>393,394</sup> Es wird an dieser Stelle darauf verwiesen, dass die zweifach disulfidverbrückten Analoga durch Thomas Schmitz im Arbeitskreis von Prof. Diana Imhof synthetisiert und chemisch charakterisiert wurden. Die experimentellen Details dieser Synthesen sind der Veröffentlichung Bäuml,

Schmitz *et al.* 2019 zu entnehmen.<sup>393</sup> An dieser Stelle wird ausschließlich auf die Synthese der dreifach disulfidverbrückten Isomere eingegangen.

### 4.5.1 Dreifach disulfidverbrückte Trideginisomere

Zur gezielten Synthese der fünf verschiedenen dreifach disulfidverbrückten Trideginisomere wurde eine orthogonale Schutzgruppenstrategie verwendet, welche aus Abbildung 4.1 ersichtlich wird. Die stufenweise Ausbildung der Disulfidbrücken wurde durch gezieltes Abspalten der verschiedenen Cysteinschutzgruppen und anschließende Oxidation der zugehörigen Cysteine erreicht.

Die Abspaltung der Trityl-Schutzgruppen erfolgte bereits gleichzeitig mit der Abspaltung des Peptids von der festen Phase (vgl. Abschnitt 4.3.2). Die zwei hier entstandenen freien Thiolgruppen wurden im nächsten Schritt oxidiert. Die Ausbildung der ersten und zweiten Disulfidbrücke wurde in Anlehnung an Mochizuki *et al.* 2015<sup>393,395</sup> im selben Reaktionsansatz durchgeführt. Hierzu wurde das gereinigte Vorläuferpeptid zunächst mit einer Konzentration von 0,05 mM (= 1 Äquivalent) in einem Essigsäure-Wasser-Gemisch (AcOH/H<sub>2</sub>O 1:1) gelöst. Zum Start der Oxidation wurden unter Rühren 1,1 Äquivalente Iod (0,1 M in Methanol, MeOH) zugegeben. Nach 5-15 min (abhängig vom Isomer) war



**Abbildung 4.1:** Schutzgruppenstrategie für die gezielte Synthese der Trideginvarianten. Lineare Vorläuferpeptide der Isomere **A-E** sowie der Analoga  $A_{[C19S, C25S]}$ - $C_{[C19S, C25S]}$ . Acm Acetamidomethyl, Trt Trityl, tBu tert-Butyl. Modifiziert nach Bäuml, Schmitz et al. 2019 und Bäuml et al. 2020.<sup>393, 394</sup>

die Ausbildung der ersten Brücke abgeschlossen. Anschließend wurde die Iodkonzentration auf 15 Äquivalente erhöht und dadurch während weiterer 15-30 min unter Rühren die Abspaltung der Acm-Schutzgruppen sowie die Oxidation der zugehörigen Disulfidbrücken durchgeführt. Das Fortschreiten der Oxidation wurde durch die Entnahme und Analyse von Oxidationskontrollen mittels HPLC- und MS-Messungen überprüft. Die Reaktion wurde durch 3-4malige Extraktion mit dem gleichen Volumen Cyclohexan gestoppt. Das Oxidationsprodukt in der wässrigen Phase wurde lyophilisiert und für den nächsten Oxidationsschritt verwendet.

Zur Abspaltung der tBu-Schutzgruppen sowie Ausbildung der dritten Disulfidverbrückung wurde das Peptid (0.125 mM) in einem TFA-DMSO-Anisol-Gemisch (97:2,9:0,1) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und dreimal mit Ether verrieben. Die restliche Flüssigkeit wurde in ein Röhrchen überführt, mit Wasser verdünnt und lyophilisiert. Das vollständig oxidierte Rohprodukt wurde anschließend mittels semipräparativer HPLC gereinigt (vgl. Abschnitt 4.4).

# 4.6 Peptidcharakterisierung

Die gereinigten Peptide wurden mittels analytischer HPLC, Massenspektrometrie und Aminosäurenanalyse charakterisiert.

### 4.6.1 Analytische HPLC

Sowohl die Rohprodukte nach der Synthese bzw. nach der Oxidation als auch die gereinigten Fraktionen wurden mittels analytischer HPLC auf ihre Reinheit überprüft. Hierbei wurden Vydac-Säulen (218TP24 bzw. 208TP24, C18 bzw. C8 Reverse Phase,  $250 \times 4,6 \text{ mm}$ , 5 µm Korngröße, 300 Å Porengröße) in einer Shimadzu-Anlage (LC-AT für Vorläuferpeptide; LC-20AD für Oxidationsprodukte) verwendet. Das Elutionssystem bestand aus 0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O (Eluent A) und 0,1 % TFA in MeCN (Eluent B).

Die Gradientenelution erfolgte durch eine Erhöhung des Eluenten B von 0% auf 60% in 60min (Rohprodukte nach Synthese, Oxidation und Verdau) oder von 20% auf 60% in 40min bzw. von 20% auf 50% in 30min (gereinigte Peptide) bei einer Flussrate von 1 ml/min. Das Injektionsvolumen wurde an die Konzentration der Probe angepasst und variierte zwischen 20 und 400 µl. Die Elution der Peptide wurde photometrisch bei  $\lambda = 220$  nm gemessen.

### 4.6.2 Massenspektrometrie

Die Identität der Peptide wurde mittels massenspektrometrischer Messungen bestätigt. Zur Ionenerzeugung im Massenspektrometer kamen sowohl Elektrospray (Elektrosprayionisationsmassenspektrometrie, ESI-MS) als auch Matrix-assistierte Laserdesorption (MALDI-MS) zum Einsatz.

ESI-MS-Messungen wurden mittels eines microTOF-Q III Gerätes (Bruker Daltonics, Bremen) durchgeführt, welches an ein Dionex Ultimate 3000 LC-Gerät (*Liquid*-Chromatographie, Säule: EC 100/2 Nucleoshell RP18, C18 Reverse Phase,  $100 \ge 2 \text{ mm}$ ,  $2,7 \ \mu\text{m}$  Korngröße, 90 Å Porengröße, Thermo Scientific) gekoppelt war (LC-MS). Das Elutionssystem bestand aus 0,1 % Essigsäure in H<sub>2</sub>O (Eluent A) und 0,1 % Essigsäure in MeCN. Bei einer Flussrate von  $0,3 \ \text{ml/min}$  erfolgte die Elution durch eine Erhöhung von Eluent B von 0 % auf 60 % in  $12 \ \text{min}$ . Bei der Aufklärung der Disulfidbrücken (vgl. Abschnitt 4.7.1) wurde auch kollisionsinduzierte Dissoziation (*collision-induced dissociation*, CID) zur Sequenzidentifizierung verwendet.

MALDI-MS-Messungen wurden an einem UltrafleXtreme, einem Autoflex III smartbeam und einem Autoflex II Gerät (alle Bruker Daltonik, Bremen) durchgeführt. Als Matrix wurde  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (7 mg/ml) gelöst in 50 % MeCN/H<sub>2</sub>O (0,1 % TFA) verwendet. Die Peptide wurden direkt in der Matrix angelöst und dann 2 µl der Lösung auf eine MS-Platte (MTP 384 *target plate polished steel*, Bruker Daltonics, Bremen) aufgetragen und per Vakuum getrocknet. Zur Kalibrierung des Spektrometers wurde der Protein Calibration Standard I (Massenbereich 4.000-20.000 kDa; ebenfalls Bruker Daltonics, Bremen) gemessen.

### 4.6.3 Aminosäureanalytik

Vor der funktionellen und strukturellen Analyse der verschiedenen Trideginvarianten wurden Stammlösungen der gereinigten Peptide hergestellt, aliquotiert, lyophilisiert und die genaue Peptidmenge mittels Aminosäureanalyse bestimmt. Dazu wurden die Peptide in 6 N HCl bei 110 °C für 24 h hydrolisiert, in einem Vakuumkonzentrator bei 60 °C 5 h getrocknet, in 200 µl Probenverdünnungspuffer gelöst, gefiltert (Costar Spinx Centrifuge Tube Filter) und mit einem Aminosäureanalysator (Eppendorf-Biotronik LC 3000, Hamburg) – ausgestattet mit einer Kationenaustausch-Säule (CK10M, Korngröße 4 µm, Quervernetzung 10 %, Mitsubishi Chemical Corporation, Tokyo, Japan) – gemessen. Der Nachweis der Aminosäuren erfolgte durch eine Derivatisierung mit Ninhydrin (Detektion bei 570 und 440 nm). Zur Ermittlung der Peptidkonzentration wurden die Messdaten mit einem Aminosäurestandard (Laborservice Onken, Gründau) verglichen.

# 4.7 Strukturelle Studien

### 4.7.1 Aufklärung der Disulfidverbrückung

Zur Überprüfung der korrekten Disulfidbrückenausbildung wurden die Trideginvarianten mittels enzymatischem Verdau und anschließender MS-Analytik untersucht. Hierbei wurden jeweils 50 µg Peptid in 50 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,5) gelöst und 10 µl Chymotrypsin hinzugegeben (0,1 mg/ml in 0,1 mM HCl; finale Konzentration: 16,7 µg/ml). Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C inkubiert und die Reaktion nach 1,5 h durch die Zugabe von 60 µl 0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O gestoppt.

Die verdauten Peptidproben wurden bei -80 °C gelagert und gegebenenfalls vor der MS-Analyse mittels analytischer HPLC (siehe 4.6.1) in verschiedene Fraktionen aufgetrennt und lyophilisiert. Die Aufklärung der Disulfidbrücken erfolgte am LC-ESI-MS durch eine Kombination von MS und MS/MS (CID) (siehe Abschnitt 4.6.2).

Nach der ersten massenspektrometrischen Analyse wurden die disulfidverbrückten verdauten Proben durch die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) reduziert. DTT wurde in einer leicht basischen Umgebung (pH > 7) zugegeben (finale DTT-Konzentration: 10 mM) und der Reaktionsansatz bei RT 30 min inkubiert. Schließlich wurden die reduzierten Proben ebenfalls per Massenspektrometer gemessen und die Ergebnisse zur Aufklärung der Disulfidbrücken mit den Daten der entsprechenden Fraktionen vor der Reduktion verglichen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Compass Data Analysis 4.4 und BioTools 3.2 (beide Bruker Daltonik, Bremen).

## 4.8 Funktionelle Analytik

Die Trideginvarianten wurden in verschiedenen enzymatischen Aktivitätsassays sowie ausgewählte Varianten auch in zellbasierten Assays mit humanem Blutplasma bzw. Vollblut bezüglich ihrer inhibitorischen Potenz gegenüber FXIIIa untersucht. Die experimentellen Einzelheiten werden im Folgenden beschrieben.

### 4.8.1 Enzymatische Aktivitätsassays

Die Aktivität der verschiedenen Trideginvarianten wurde zunächst in einem fluorogenen FXIIIa-Assay analysiert.<sup>378, 384</sup> Neben der so untersuchten Inhibition der Isopeptidaseaktivität des FXIIIa wurde außerdem ein Fluoreszenzanisotropie-Assay durchgeführt, der die FXIIIa-Transamidaseaktivität detektierte. Schließlich wurde außerdem die Spezifität der Inhibitoren in einem TGase 2-Assay eruiert.<sup>396</sup>

### Fluorogener FXIIIa-Assay

Zur ersten Beurteilung des inhibitorischen Potentials der verschiedenen Trideginvarianten gegenüber Faktor XIIIa wurden mittels eines fluorogenen Enzymassays IC<sub>50</sub>-Werte der Peptide bestimmt. Der verwendete Assay wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Torsten Steinmetzer am Institut für pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg etabliert.<sup>378, 384</sup> Die Messungen für die vorliegende Arbeit wurden dort in Zusammenarbeit mit Thomas Schmitz (Arbeitsgruppe Prof. Diana Imhof) und Prof. Dr. Torsten Steinmetzer durchgeführt und durch Mitarbeiter seiner Arbeitsgruppe unterstützt.

Zymogener FXIII (Fibrogammin<sup>®</sup>, 200 µl, 12,5 U absolut) wurde zunächst mit 1000 µl Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5 in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung) und 715 µl 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung verdünnt und mit 20 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung versetzt. Die FXIII-Aktivierung erfolgte durch Zugabe von 45 µl Thrombinlösung (0,53 mg/ml) und anschließende 20-minütiger Inkubation bei 37 °C. Thrombin wurde sodann durch die Zugabe von 20 µl Hirudinlösung (1 mg/ml) deaktiviert.

Die Enzymaktivität wurde in Gegenwart und Abwesenheit der verschiedenen Trideginvarianten als Inhibitoren gemessen. Hierzu wurden schwarze 96-*Well*-Mikrotiterplatten verwendet. In jedem *Well* wurden 25 µl Substrat (20 µM final, H–Tyr(3-NO<sub>2</sub>)–Glu(NH–(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>–NH–Abz)–Val–Lys–Val–Ile–NH<sub>2</sub>),<sup>378,384</sup> 25 µl Inhibitor in H<sub>2</sub>O bzw. H<sub>2</sub>O und 150 µl Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, in 0,9% (w/v) NaCl) vorgelegt und die Enzymreaktion durch Zugabe von 25 µl aktivierter Enzymlösung gestartet (Gesamtvolumen: 250 µl pro *Well*). Die Konzentration der FXIII-A-Untereinheit betrug somit etwa 0,082 µM, wenn man von einer vollständigen Aktivierung ausgeht. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte bei Raumtemperatur in einem Fluoroskan Ascent *Plate Reader* (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finnland). Die Zunahme der Fluoreszenz bei Enzymaktivität wurde mithilfe des fluorogenen Substrats bei  $\lambda_{ex} = 320$  nm und  $\lambda_{em} = 405$  nm in 15-Sekunden-Intervallen 30 min lang gemessen. Zu Kontrollzwecken wurde bei jeder Messung eine Michaelis-Menten-Kurve im Duplikat mitbestimmt (Substratkonzentrationen: 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 µM).

Durch einen Vortest (drei verschiedene Konzentrationen) wurde der optimale Konzentrationsbereich der verschiedenen Trideginvarianten zur Ermittlung der  $IC_{50}$ -Werte bestimmt. In Abhängigkeit vom jeweils eingesetzten Peptid variierten die Inhibitorkonzentrationen zwischen 0,03 und 15 µM. Acht verschiedene Konzentrationen der Peptide wurden in Duplikaten oder Triplikaten gemessen. Die Datenauswertung erfolgte durch lineare und nonlineare Regression mithilfe der Software Origin Pro 8G (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA). Im Anschluss wurden die Daten durch GraphPad Prism Version 7.04 (Synergy Software, Reading, PA, USA) visualisiert.

#### Fluoreszenzanisotropie-basierter Assay mit TGase 2

Zur Abklärung der Spezifität der Trideginvarianten wurde exemplarisch die inhibitorische Aktivität von  $ABC_{[C19S, C25S]}$  (bereitgestellt durch Thomas Schmitz, AK Prof. Diana Imhof) und Isomer **B** in einem TGase 2-Assay in Anlehnung an Hauser *et al.* 2017<sup>396</sup> untersucht. Diese Arbeiten wurden durch Dr. Markus Pietsch und Paul Sommerfeld am Universitätsklinikum Köln durchgeführt.

Die verschiedenen Reaktionsansätze (Gesamtvolumen 100 µl) enthielten 5 µg/ml humane TGase 2, 0,81 µM Substrat (Rhodamin-B-Isonipecotylcadaverin, R-I-Cad), 30 µM N,N-Dimethylcasein (DMC) und 5 % DMSO. Die Konzentrationen der Trideginvarianten betrugen in der ersten Messreihe 10 µM (Vorversuche) bzw. 30 µM (Hauptversuche). Die Stammlösungen der Peptide (250 µM) wurden in Wasser angesetzt. Kontrollen ohne Inhibitor wurden ebenfalls gemessen. Der Assaypuffer bestand aus 100 mM MOPS, 3 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,05 mM EDTA-Na<sub>2</sub> (pH 8,0). Der Enzympuffer in der ersten Messreihe war aus 100 mM MOPS, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT und 20 % (v/v) Glycerol zusammengesetzt und ebenfalls auf pH 8,0 eingestellt. In den Vorversuchen wurde die Enzymaktivität mit und ohne 30-minütige Präinkubation (30 °C im Plate Reader) von Trideginvariante, Substrat und TGase 2 im Multi-Mode Microplate Reader 'Synergy 2' (BioTek, USA; Gen5 Software Version 1.11.5) gemessen. Die Reaktion wurde in Ansätzen mit Präinkubation durch Zugabe von DMC und in Ansätzen ohne Präinkubation durch Zugabe von TGase 2 gestartet. Die Enzymaktivität wurde über einen Zeitraum von 15-30 min bei 30 °C verfolgt ( $\lambda_{ex} = 540$  nm,  $\lambda_{\rm em} = 620\,\rm nm)$  und der lineare Bereich (0-10\,\rm min) mittels linearer Regression ausgewertet. In den Hauptversuchen mit 30 µM Inhibitor wurde auf die Präinkubation verzichtet und die Enzymreaktion durch Zugabe von TGase 2 gestartet.

In einer zweiten Messreihe wurde die DTT-Konzentration im Assay von 0.5 mM auf 0.1 mM reduziert, um das Risiko einer Reduktion der Disulfidbrücken im Tridegin zu vermindern. Diese DTT-Konzentration entsprach der verwendeten DTT-Konzentration im Fluoreszensanisotropie-basierten FXIIIa-Transamidaseaktivitätsassay (siehe nachfolgenden Abschnitt). Der Enzympuffer in der zweiten Messreihe entsprach dem Enzympuffer der ersten Messreihe bis auf die DTT-Konzentration, welche auf 2 mM verringert wurde. Die Stammlösung des Peptids (250 µM) wurde in Assaypuffer statt in Wasser hergestellt. Die Inhibitorkonzentration im Assay betrug 40 µM und der Assay wurde nach einer 30-minütigen Präinkubation (TGase 2, Substrat, Inhibitor) bei 30 °C durch die Zugabe von DMC gestartet. Im Übrigen entsprachen die Reaktionsbedingungen denen der ersten Messreihe.

Die Datenauswertung erfolgte mittels GraphPad Prism (Version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

#### Fluoreszenzanisotropie-basierter Assay mit FXIIIa

Neben der Wirkung der Trideginvarianten auf die FXIIIa-Isopeptidaseaktivität wurde exemplarisch auch der Effekt von  $ABC_{[C19S, C25S]}$  (bereitgestellt durch T. Schmitz, AK Prof. Diana Imhof) auf die FXIIIa-Transamidaseaktivität untersucht. Diese Analyse wurde durch Dr. Markus Pietsch und Paul Sommerfeld (Universitätsklinikum Köln) durchgeführt. Der durchgeführte Assay entsprach im Wesentlichen dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen TGase 2-Assay. Statt TGase 2 wurde FXIIIa (finale Konzentration 5 µg/ml, T070, Zedira) verwendet. Die finale DTT-Konzentration betrug 0,1 mM. Die Reaktion wurde nach einer 30-minütigen Präinkubation (FXIIIa, Substrat, Inhibitor) bei 30 °C durch die Zugabe von DMC gestartet. Zur Ermittlung eines IC<sub>50</sub>-Wertes wurden in drei Messreihen (jeweils im Duplikat) acht verschiedene Inhibitorkonzentrationen (0,01-40 µM) gemessen und mittels linearer und nonlinearer Regression (GraphPad Prism Version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) ausgewertet.

### 4.8.2 Zellbasierte Assays

Die zweifach disulfidverbrückten Trideginvarianten konnten von Thomas Schmitz (AK Prof. Diana Imhof) in größeren Mengen hergestellt werden, wodurch eine weitere funktionelle Analyse ermöglicht wurde. Zellbasierte Assays und deren Analyse wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Alisa S. Wolberg und Dr. Lori A. Holle am *Department of Pathology and Laboratory Medicine* (University of North Carolina at Chapel Hill, NC, USA) durchgeführt.<sup>393</sup>

### Vollblut- und Plasmaaufbereitung

Das Vollblut wurde von gesunden freiwilligen Blutspendern in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsiniki und des University of North Carolina Institutional Review Board entnommen. Die Blutabnahme erfolgte mithilfe einer 21G-Flügelkanüle (Becton, Dickenson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) in 0,105 M Natriumcitrat (pH 5,5, 10 % finale Konzentration). Der Normalplasmapool (NPP) wurde aus Blut von vier gesunden Spendern hergestellt. Bei jedem Spender wurden die ersten 5 ml Blut verworfen. Das plättchenarme Plasma wurde durch sequentielles Zentrifugieren (25 min 150 g, dann 20 min 20 000 g) vorbereitet. Anschließend wurde es vereinigt, aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und schließlich bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### Turbiditätsassay Blutgerinnung

Blutgerinnungsassays wurden direkt nach dem Auftauen des NPP (37 °C) durchgeführt. NPP wurde mit den verschiedenen Trideginvarianten bzw. mit HEPES-gepufferter Kochsalzlösung (20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, HEPES-*buffered saline*, HBS) versetzt. Die Blutgerinnung wurde durch Inkubation von rekalzifiziertem (10 mM CaCl<sub>2</sub>, final) NPP mit Gewebefaktor (Tissue factor, TF; 1:12.000 Innovin<sup>®</sup>-Verdünnung) und Phospholipiden (4 µM finale Konzentration) in einer 96-*Well*-Flachmikrotiterplatte durchgeführt (Gesamtreaktionsvolumen 100 µl, 80 % NPP). Die Blutgerinnung wurde anhand der Trübung des Reaktionsansatzes bei 405 nm mithilfe eines SpectraMax 384Plus *Microplate Readers* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) bei Raumtemperatur über 90 min verfolgt.

#### Vollblutgerinnselkontraktions-Assay (Whole Blood Clot Contraction Assay)

Dieser Assay basiert auf der Beobachtung, dass FXIIIa die Retention von Erythrozyten in kontrahierten Vollblutgerinnseln begünstigt und daher einen bestimmenden Faktor für die Größe des Vollblutgerinnsels darstellt.<sup>176,178</sup>

Die Blutgerinnung des rekalzifierten (10 mM CaCl<sub>2</sub>, finale Konzentration) Vollblutes wurde durch Zugabe von TF (1:12.000 Innovin<sup>®</sup>-Verdünnung, 1 pM finale Konzentration) initiiert. Der Reaktionsansatz (Gesamtvolumen = 200 µl) bestand aus 85 % Vollblut, 10 % Trideginvariante (oder T101 bzw. HBS), 2,5 % Innovin und 2,5 % CaCl<sub>2</sub>. Die Gerinnselkontraktion fand in silikonisierten 96-*Well*-Mikrotiterplatten (Corning<sup>TM</sup> 9017, Corning, NY, USA) bei 37 °C (120 min) statt. Schließlich wurden die kontrahierten Gerinnsel entnommen und gewogen. Anhand der ermittelten Blutgerinnselmasse wurden mittels GraphPad v 7.02 (Synergy Software, Reading, PA, USA) IC<sub>50</sub>-Werte der verschiedenen Inhibitoren ermittelt. Die hierfür verwendete Gleichung lautete  $y = bottom + (top - bottom)/(1 + (x/IC_{50}))$  mit y = response und x = Inhibitorkonzentration. IC<sub>50</sub>-Werte wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

# 4.9 Computerbasierte Studien

Zur weiteren strukturellen und funktionellen Aufklärung wurden verschiedene computerbasierte Studien durchgeführt. Diese Analysen wurden durch den Kollegen Ajay Abisheck Paul George sowie den Kooperationspartner PD Dr. Arijit Biswas (Universitätsklinikum Bonn) unter Zuhilfenahme der experimentellen Daten durchgeführt. Methodische Details können den Manuskripten Bäuml, Schmitz *et al.* 2019 und Bäuml *et al.* 2020 entnommen werden.<sup>393,394</sup>
## 4.9.1 Molekulare Modellierung

Die Strukturen der Trideginisomere **D** und **E** wurden von PD Dr. Arijit Biswas (Universitätsklinikum Bonn) mittels *Threading* analog zu den Isomeren **A-C** modelliert.<sup>384</sup> Hierzu wurde der I-TASSER *Threading* Server verwendet.<sup>397–399</sup> Beide Isomere wurden in ihrer konformationellen Flexibilität insofern eingeschränkt, als dass die S- $\gamma$ -Atome jeweils zweier Cysteine, die per Disulfidbrücke verbunden sein sollten, nicht mehr als 2 Å voneinander entfernt sein durften. Die jeweils korrekte Disulfidverbrückung wurde in den generierten Modellen überprüft und bei Bedarf mittels YASARA<sup>400</sup> manuell verknüpft. Die Modelle wurden anschließend energieminimiert, sodass sich natürliche Bindungslängen einstellen konnten. Schließlich wurden beide Modelle einer kurzen Molekulardynamiksimulation (500 ps) ausgesetzt. Aus der Simulationstrajektorie wurde die Struktur am Energieminimum als finales Modell gewählt.

#### 4.9.2 Molekulardynamiksimulationen

Die Analyse der strukturellen Stabilität der verschiedenenen synthetisierten Trideginisomere und ihrer disulfidreduzierten Analoga wurde durch Molekulardynamiksimulationen (MD-Simulationen) realisiert. Durchgeführt wurde sie von Ajay Abisheck Paul George (AK Prof. Diana Imhof) in Kooperation mit PD Dr. Arijit Biswas (Universitätsklinikum Bonn). Da von Tridegin keine experimentell ermittelte Struktur zur Verfügung stand, dienten hierbei die modellierten Strukturen der Trideginisomere  $\mathbf{A}$ - $\mathbf{C}^{384}$  sowie  $\mathbf{D}$  und  $\mathbf{E}$  (vgl. Abschnitt 4.9.1) als Startstrukturen. Die MD-Simulationen der verschiedenen Trideginvarianten wurden mit GROMACS (Versionen 5.1.4 bzw. 2018) durchgeführt.<sup>401–404</sup>

Die Trideginvarianten wurden individuell ins Zentrum einer kubischen Box  $(2 \times 2 \times 2 \text{ nm})$ platziert. Mithilfe des TIP3P-Wassermodells<sup>405</sup> wurde die Box gefüllt. Es wurden keine Ionen hinzugefügt, da die Nettoladung der Peptide bereits 0 war. Zur Simulation wurde ein AMBER99SB-ILDN-Kräftefeld verwendet.<sup>406</sup> Die *In-silico*-Öffnung der Disulfidbrücke der Isomere A-C erfolgte wie zuvor beschrieben.<sup>31</sup> Zur Energieminimierung wurde ein Protokoll mit 5000 Stufen *steepest descent* durchgeführt. Vor der MD-Simulation erfolgten ein thermaler Equilibrierungsschritt bei 300 K (*velocity rescaling Berendsen Thermostat*)<sup>407</sup> sowie ein Konstantdruckequilibrierungsschritt (Parrinello-Rahman-Barostatat)<sup>408,409</sup> bei 1 atm. Bei beiden Equilibrierungssimulationen wurden mithilfe des LINCS-Algorithmus Positionsbeschränkungen auf alle Bindungen angewandt.<sup>410</sup>

Die Simulationen zum Vergleich der Strukturen der Isomere A-C, Isomere A-C mit *in silico* geöffneter Disulfidbrücke C19–C25 und der Analoga  $A_{[C19S, C25S]}$ - $C_{[C19S, C25S]}$  wurden in zwei Schritten durchgeführt (GROMACS 5.1.4): Nach der ersten 100 ns-Simulation

war aufgrund der beobachteten großen RMSD-Schwankungen eine weitere freie Equilibrierung der Peptide nötig. Die Daten dieser ersten Simulation tragen nicht direkt zur Diskussion der Ergebnisse bei, weshalb sie nicht Teil der vorliegenden Arbeit sind, allerdings in der *Supporting Information* des Manuskripts Bäuml, Schmitz *et al.* 2019<sup>393</sup> eingesehen werden können. Das jeweils letzte Zeitfenster der 100 ns-Simulation wurde für eine weitere 300 ns-Simulation verwendet. Hierbei wurden die beschriebenen Schritte zur anfänglichen Energieminimierung und Equilibrierung erneut durchgeführt. Für jedes Isomer wurden somit insgesamt 400 ns Simulation durchgeführt. Die Ergebnisdiskussion basiert auf den Beobachtungen der finalen 300 ns-Simulation. Die Simulationen fanden bei periodischen Randbedingungen statt. Die Langstrecken-Elektrostatik wurde mithilfe des *Particle-Mesh-Ewald*-Algorithmus' berechnet.<sup>411–413</sup> Es wurden 10 000 Zeitfenster pro 100 ns Simulationszeit in der Trajektorie aufgezeichnet. Die verschiedenen Konformationen, die während der Molekulardynamiksimulationen beobachtet werden konnten, wurden mittels VMD (Visual Molecular Dynamics) visualisiert.<sup>414</sup>

Die MD-Simulationen der Trideginisomere **A-E** (GROMACS 2018) wurden zur Vorbereitung des semi-flexiblen *Dockings* über einen Zeitraum von 1 µs durchgeführt. Diese vergleichsweise lange Simulationszeit war durch eine Leistungsverbesserung des GROMACS-Pakets (Version 2018) möglich.<sup>415</sup> Abgesehen von der Simulationsdauer entsprach die Vorgehensweise der oben beschriebenen Methodik.

Weitere Details können den Manuskripten Bäuml, Schmitz *et al.* 2019 und Bäuml *et al.* 2020 entnommen werden.<sup>393, 394</sup>

## 4.9.3 Molekulares Blind Docking (starr)

Das starre molekulare Blind Docking der Trideginisomere **D** und **E** wurde analog zum zuvor beschriebenen Docking der Isomere **A-C** von PD Dr. Arijit Biswas (Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt.<sup>384</sup> Die Isomere wurden mittels des Z-dock Docking Servers<sup>416</sup> an die bereinigte Kristallstruktur (ohne Inhibitor ZED1301) des FXIIIa (FXIII-A°, PDB 4KTY)<sup>137</sup> gedockt. Die bestbewerteten Docking-Komplexe wurden hinsichtlich der Nähe des jeweiligen Isomers zu Aminosäuren der katalytischen Triade (Cys314, His373, Asp398) sowie beeinflussenden umgebenden Aminosäuren (Trp279, Asp343, Glu401) untersucht. Schließlich wurde für jedes Isomer ein repräsentativer Komplex ausgewählt.

## 4.9.4 Molekulares *Docking* (semi-flexibel)

Die Trideginisomere und ihre disulfidreduzierten Analoga wurden mithilfe von molekularem *Docking* an die FXIIIa-Kristallstruktur (FXIII-A°, PDB 4KTY)<sup>137</sup> bzw. an die daraus abgeleitete FXIIIa-Struktur<sup>417</sup> (vgl. Abschnitt 5.3.4) gedockt. Das molekulare *Docking* wurde in YASARA-Suite (Version 18.4.2 bzw. Version 19.9.17) mithilfe des dock\_runensemble.mcr-Makros<sup>418</sup> durchgeführt. Durch dieses Makro wird der Vina-Algorithmus<sup>419</sup> für das Docking eines Liganden an ein Rezeptorensemble mit flexiblen Seitenketten verwendet. In diesem *Ensemble-Docking*-Ansatz<sup>420</sup> wurde die jeweilige Trideginvariante 400-mal an ein Rezeptorensemble gedockt, welches zuvor durch die 20 bestbewerteten Orientierungen der Seitenketten von FXIIIa (PDB 4KTY) erstellt wurde. Das eingesetzte Protokoll wurde aus einer zuvor durchgeführten Studie<sup>421</sup> angepasst. Die aktivierte FXIIIa-Struktur wurde für das Docking wie folgt vorbereitet: Der *small-molecule*-Inhibitor (ID: PRD\_001125) wurde entfernt, fehlende Schleifen und Aminosäurereste wurden mithilfe des FREAD-Loop-Modelingservers (http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/fread/php/)<sup>422</sup> ergänzt. Die so optimierte Struktur wurde schließlich in YASARA Suite *pre-docking* durch eine Kombination aus *steepest-descent*-Algorithmus und simulierter Abkühlung (*simulated annealing*) energieminimiert.

Weitere methodische Einzelheiten können in den Manuskripten Bäuml, Schmitz *et al.* 2019 und Bäuml *et al.* 2020 eingesehen werden.<sup>393, 394</sup>

# 4.10 Genomsequenzierung des H. ghilianii

Zur Genomsequenzierung des *H. ghilianii* wurden tiefgefrorene isolierte Speicheldrüsensets bestehend aus anteriorer und posteriorer Speicheldrüse sowie der Proboscis erworben (Biopharm Leeches, Biopharm UK Ltd., Hendy, Wales). Das Material stammte aus einer Präparation von 1994, weshalb eine RNA- beziehungsweise Peptidisolation nicht möglich war. Frischeres Material war nicht verfügbar. Folglich wurde aus dem Gewebe des *H. ghilianii* genomische DNA isoliert und anschließend analysiert. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit PD Dr. Lars Podsiadlowski und Anja Bodenheim am Zoologischen Forschungsmuseum Alexander Koenig (ZFMK) in Bonn durchgeführt.

### 4.10.1 Isolierung genomischer DNA

Das *H. ghilianii*-Gewebe wurde zunächst in einer zuvor mittels EtOH sterilisierten Glaspetrischale zerkleinert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Gewebe nach Zugabe von 180 µl ATL-Puffer (NaCl, Tris, EDTA; Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit) und 20 µl Proteinaselösung (Aktivität > 600 mAU/ml) über Nacht schüttelnd (300 rpm, *rounds per minute*) bei 56 °C verdaut. Am nächsten Tag wurde die Reaktionsmischung kurz zentrifugiert und 4 µl RNase A (100 mg/ml) zugegeben. Nach einer Inkubation von 2 min bei RT wurden 200 µl AL-Puffer (Lyse-Puffer) zugegeben. Es bildete sich ein Präzipitat aus Puffersalzen, das sich durch eine 10-minütige Inkubation bei 56 °C (0 rpm) weitestgehend lösen ließ. Nun wurde die eigentliche DNA-Isolierung durch die Zugabe von 160 µl *Magnetic Beads* (40 % des Anfangvolumens) gestartet und 15 min auf einem Rotator (Stuart SB3, Cole-Parmer, Wertheim) bei 10 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Probe im Magnetgestell eingespannt und gewartet (bis zu 10 min), bis die Lösung klar wurde. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Magnetpellet wurde nun erst mit 500 µl AW1-Puffer und im Anschluss mit 500 µl AW2-Puffer gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes wurde die Probe kurz zentrifugiert und wieder in das Magnetgestell eingespannt, um die restliche Lösung abzupipettieren. Das Pellet wurde schließlich 3-5 min luftgetrocknet und 75 µl Puffer (ohne EDTA, abweichend vom Kit) zur Lösung der DNA zugegeben. Nach einer Inkubation von 5-15 min (je nach Festigkeit des Pellets) wurde die DNA-Konzentration mittels eines Quantus<sup>TM</sup>-Fluorometers (Promega, Mannheim) nach Protokoll des Herstellers ermittelt. Sie betrug in verschiedenen Ansätzen 14-43 ng/µl.

## 4.10.2 PCR-Barcoding zur Species-Bestätigung

Um zunächst zu überprüfen, ob die erworbenen Drüsengewebe wirklich von *H. ghilianii* stammen, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaktion*, PCR) mit dem zur Artbestimmung bei Tieren allgemein verwendeten 650 bp-Fragment des mitochondrialen Gens *cytochrome oxidase subunit I* (COI) durchgeführt. Für die PCR wurden die am ZFMK optimierten COI-*Primer* verwendet (LCO1490-JJ: 5-CHACWAAYCATAAAGATATYGG-3; HCO2198-JJ: 5-AWACTTCVGGRTGVCCAAARAATCA-3).

Die PCR wurde mit dem Qiagen Multiplex Mix durchgeführt. In einem 20 µl-Ansatz wurden dabei 2,5 µl DNA, 2,3 µl Wasser, 2 µl Q-Solution, 10 µl Multiplex-Mix und jeweils 1,6 µl der beiden auf 10 mM verdünnten *Primer* eingesetzt. Die Laufbedingungen waren: initiale Denaturierung (15 min, 95 °C), dann 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (35 s, 94 °C), *Annealing* (90 s, 55 °C) und Elongation (90 s, 72 °C); danach abschließende Elongation (10 min, 72 °C) und Kühlung auf 10 °C bis zur weiteren Verwendung. Das PCR-Produkt wurde auf einer 1%-Agarose-Gelelektrophorese überprüft und anschließend von einem kommerziellen Sequenzierservice sequenziert (Macrogen Europe, Amsterdam, Niederlande).

## 4.10.3 Analyse der DNA-Fragmentgrößen

Um die Güte (insbesondere die mittlere Fragmentgröße) der isolierten DNA zu bestimmen, wurde ein kleiner Teil der DNA mit Hilfe des *Fragment Analyzers* (Advanced Analytics, jetzt Agilent) überprüft. In diesem Falle kam das HS Genomic DNA 50 kb Kit zum Einsatz; geeicht wurde mit der *HS Extended Genomic DNA Ladder*. 2 µl der vorverdünnten DNA (Konzentration auf 5 ng pro µl eingestellt) wurden eingesetzt. Die Analyse erfolgte mit der dem Gerät zugehörigen *ProSize Data Analysis* Software (Agilent).

## 4.10.4 Sequenzierung genomischer DNA

Zur Vorbereitung der Genomsequenzierung wurde durch das Anheften eines Führungsadapters (*leader adaptor*) und eines Motorproteins an die isolierte genomische DNA eine sogenannte Bibliothek (*library*) generiert. Hierzu wurde das nachfolgend näher beschriebene Ein-Topf-Ligationsprotokoll (*one-pot ligation protocol*) mit einem Sequencing Kit von Oxford Nanopore (SQK-LSK109) sowie dem NEBNext® Companion Module for Oxford Nanopore Technologies® Ligation Sequencing verwendet.

Um eine effektive Sequenzierung zu gewährleisten wurde die Hälfte der Probe mit G-*Tubes* (Covaris) auf eine Größe zwischen 5 und 10 kb fragmentiert. Die andere Hälfte der Probe wurde nicht fragmentiert, da einige größere Fragmente für die spätere Genomassemblierung benötigt werden.

In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden zu 48 µl genomischer DNA 3,5 µl *NEBNext Ultra II End-Prep Buffer*, 3,5 µl *NEBNext FFPE DNA Repair Buffer*, 3 µl *NEBNext Ultra II End-Prep Enzyme Mix* und 2 µl *NEBNext FFPE DNA Repair Mix* gegeben (60 µl Gesamtvolumen) und vorsichtig vermischt. Die Lösung wurde 5 min bei RT, 5 min bei 65 °C inkubiert, 30 s auf Eis abgekühlt und anschließend in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit *Magnetic Beads* (vgl. Abschnitt 4.10.1) gereinigt. Hierbei wurde zweimal mit 70 % EtOH in nukleasefreiem H<sub>2</sub>O gewaschen und in 61 µl nukleasefreiem H<sub>2</sub>O eluiert. Der Überstand der Elutionslösung wurde nach 5-10 min auf dem Magnetgestell in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Konzentration von 1 µl der gereinigten Probe wurde mittels eines Quantus<sup>TM</sup>-Fluorometers (Promega, Mannheim) nach Protokoll des Herstellers bestimmt und betrug zwischen 12 und 32 ng/µl.

Im Anschluss wurde die Ligation durch Zugabe von 25 µl Ligationspuffer (LNB), 10 µl *NEBNext Quick T4 DNA Ligase* und 5 µl *Adapter Mix* (AMX) zu 60 µl Probenlösung gestartet. Nach einer 20-minütigen Inkubation wurde die DNA mittels *Magnetic Beads* in einem Volumenverhältnis von 4:10 (40 µl *Magnetic Beads* zu 100 µl Lösung) gereinigt, um eine Selektion größerer DNA-Fragmenten zu erzielen. Hierbei wurde je nach Ansatz zweimal mit *Long Fragment Buffer* oder *Short Fragment Buffer* gewaschen. Zur Elution wurde 15 min mit 15 µl Elutionspuffer inkubiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Bestimmung der DNA-Konzentration (28-43 ng/µl) wurde die *Flow Cell* (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) nach Herstellerangaben vorbereitet und die DNA-Probe (15 µl) zusammen mit 37,5 µl Sequenzierungspuffer und 25,5 µl *Loading Beads* (zuvor vermischt) in die *Flow Cell* geladen. Die Probe wurde in einem GridION<sub>X5</sub>-Sequenzierer (Oxford Nanopore, Oxford, UK) über 48 Stunden sequenziert.

# 4.11 Allgemeine Software

Zur Auswertung verschiedener Daten sowie für die Erstellung diverser Abbildungen wurden folgende Programme verwendet: Microsoft Office (Version 16.20), GraphPad Prism (Version 7.04), UCSF Chimera (Version 1.13.1)<sup>423</sup> und Inkscape (Version 0.92). Die Dissertationsschrift wurde mithilfe von MiKTeX (Version 2.9) verfasst.

# 5 Ergebnisse und Diskussion

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits in einer Masterarbeit und einem Zeitschriftenartikel veröffentlicht.<sup>393,424</sup> Ein weiteres Manuskript wird in Kürze zur Begutachtung bei einer Fachzeitschrift eingereicht.<sup>394</sup> Die Resultate werden hier zur besseren Verständlichkeit in Gänze beschrieben.

# 5.1 Darstellung und Charakterisierung der Trideginvarianten

In früheren Studien wurden drei verschiedene Disulfidisomere des FXIIIa-Inhibitors Tridegin mittels enzymatischem Verdau und anschließender MS-Analytik identifiziert.<sup>384, 391</sup> Da es mit den zur Verfügung stehenden chromatographischen Methoden nicht möglich war, diese Isomere voneinander zu trennen, war für eine detaillierte Charakterisierung eine gezielte schutzgruppenbasierte Synthese notwendig. Es ist zudem bislang noch nicht gelungen, den oxidativen Faltungsweg des Tridegin aufzuklären. Da Tridegin offenbar weder hauptsächlich ein einziges Isomer – wie BPTI<sup>21,31</sup> oder die Conotoxine  $\mu$ -SIIIA<sup>425</sup> und  $\varkappa$ -RIIIK<sup>426</sup> – noch mehrere verschiedene Isomere – wie Hirudin,<sup>21</sup>  $\mu$ -PIIIA<sup>28,29</sup> oder  $\mu$ -SmIIIA<sup>426</sup> – bildet, ist es aktuell nicht möglich, es einem theoretischen Faltungsweg zuzuordnen.

Aufgrund der synthetischen Komplexität sowie der Annahme, dass – wie beim µ-Conotoxin PIIIA<sup>29,30</sup> – nicht alle Isomere synthetisch gut darstellbar und biologisch aktiv sind, wurden in der vorliegenden Arbeit fünf Disulfidisomere von 15 theoretisch möglichen Isomeren des Tridegin gezielt synthetisch hergestellt. Drei der ausgewählten Isomere (**A**, **B**, **C**) basierten auf den zuvor in einem Selbstfaltungsansatz in Puffer von Dr. Miriam Reuleaux (geb. Böhm) identifizierten Isomeren (**ABC**).<sup>384</sup> Darüber hinaus wurden zwei weitere Isomere synthetisiert: ein Trideginisomer mit der *Knottin*-Disulfidverbrückung (**D**) und ein weiterer mit der aus dem Thrombininhibitor Hirudin bekannten LAP-Disulfidverbrückung (**E**) (vgl. Kapitel 3). Bei der Synthese dieser fünf dreifach disulfidverbrückten Trideginisomere lag der Fokus der vorliegenden Arbeit nicht darauf, eine Synthesestrategie zu optimieren, sondern darauf, die grundsätzliche synthetische Zugänglichkeit dieser Peptide zu ermöglichen und sie umfassend chemisch-analytisch sowie biologisch hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität gegenüber FXIIIa zu charakterisieren.

#### Dreifach disulfidverbrückte Isomere Zweifach disulfidverbrückte Analoga в Α B[C195, C255] A[C195, C255] С D C [C195, C255] ABC [C195, C255] Mutanten Е ABC P<sup>39</sup>-P<sup>64</sup> All-Ser -c-c-Pufferoxidierte Mischung der Isomere A, B und C

K<sup>1</sup>LLPC<sup>5</sup>KEWHQ GIPNPRC<sup>17</sup>WC<sup>19</sup>G ADLEC<sup>25</sup>AQDQY C<sup>31</sup>AFIPQC<sup>37</sup>RPR SELIKPMDDI YQRPVEFPNL PLKPRE<sup>66</sup>

#### Trideginsequenz

Abbildung 5.1: Übersicht der charakterisierten Trideginisomere, -analoga und -mutanten. Oben ist die Trideginsequenz mit blau markierten Cysteinen dargestellt. Darunter finden sich in schematischer Darstellung die dreifach disulfidverbrückten Trideginisomere sowie die zweifach disulfidverbrückten Analoga (bereitgestellt von T. Schmitz, AK Imhof). Die Isomerenmischung **ABC** sowie die Mutanten **All-Ser** und **P<sup>39</sup>-P<sup>64</sup>** wurden bereits in vorherigen Arbeiten charakterisiert und dienten als Kontrollen.<sup>383, 384</sup> Punktmutationen sind rot markiert. Alle Peptide wurden als C-terminale Amide dargestellt. Modifiziert nach Bäuml, Schmitz *et al.* 2019 und Bäuml *et al.* 2020.<sup>393, 394</sup>

Die drei im Selbstfaltungsansatz in Puffer identifizierten Isomere enthielten allesamt die Brücke C19–C25, was auf ihre Konservierung sowie eine mögliche funktionelle und strukturelle Rolle im Peptid hinweist. Während der Synthese wurden außerdem teiloxidierte Spezies mit einer C25–C37-Brücke beobachtet, die das Peptid scheinbar in einem fehlgefalteten Stadium arretierte.<sup>384</sup> Aus genannten Gründen könnte diese Disulfidbrücke essentiell für die Struktur, Faltung und/oder Funktion des Tridegin sein.

Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden parallel zu der oben skizzierten komplexen Synthese von Trideginisomeren mit drei Disulfidbrücken vereinfachte Analoga mit zwei Disulfidbrücken durch Thomas Schmitz (AK Prof. Diana Imhof, Universität Bonn) dargestellt. Hierbei wurden die Cysteine C19 und C25 durch Serin ersetzt. Mithilfe dieser Analoga ( $A_{[C19S, C25S]}, B_{[C19S, C25S]}, C_{[C19S, C25S]}, ABC_{[C19S, C25S]}$ ) sollte die Bedeutung dieser Disulfidbrücke aufgeklärt sowie der Syntheseaufwand verringert werden. In der vorliegenden Arbeit dienten die Analoga der Unterstützung der Aufklärung der Strukturaktivitätsbeziehungen von Tridegin und wurden dafür von Thomas Schmitz zur Verfügung gestellt. Alle beschriebenen Trideginvarianten sowie drei weitere, die bereits in vorherigen Studien charakterisiert wurden und als Kontrollen dienten, sind in Abbildung 5.1 schematisch zusammengefasst. Darüber hinaus wurde das im Handel erhältliche Tridegin ( $\mathbf{Z}$ ) der Firma Zedira<sup>®</sup> analytisch charakterisiert. Die Sequenz dieser Trideginvariante ist 73 Aminosäuren lang und beherbergt N-terminal ein zusätzliches Methionin sowie C-terminal einen His<sub>6</sub>-*Tag.* 

## 5.1.1 Synthese der Trideginvarianten

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, cysteinreiche Peptide darzustellen. Während weder in der rekombinanten Expression im Bakterium noch in pufferbasierten Selbstfaltungssystemen nach chemischer Synthese nennenswerter Einfluss auf die Bildung verschiedener Disulfidbrücken genommen werden kann, zeichnen sich orthogonale Schutzgruppenstrategien in Kombination mit chemischer Synthese dadurch aus, dass gezielt Cysteine miteinander verknüpft werden können.<sup>427–429</sup>

## Auswahl der orthogonalen Schutzgruppenstrategie

Die regioselektive Synthese von Peptiden mit drei oder mehr Disulfidbrücken ist komplex. In den vergangenen Jahrzehnten wurden verschiedene orthogonale Schutzgruppenstrategien vorgestellt, die sich zu diesem Zweck eignen.<sup>29, 395, 430–436</sup> Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass eine Strategie, die für ein Peptid erfolgreich war, nicht unbedingt auch für ein anderes Peptid benutzt werden kann. Das Oxidationsprotokoll muss für das entsprechende Peptid optimiert werden, da ein Syntheseerfolg im Regelfall sequenzabhängig ist.<sup>437, 438</sup> In der Trideginsequenz kommen 19 der 20 proteinogenen Aminosäuren vor (kein Threonin). Dies erschwert die Auswahl einer geeigneten Synthesestrategie insofern, als dass prinzipiell fast alle während der Oxidation auftretenden Nebenreaktionen, die für verschiedene Aminosäuren beschrieben sind, stattfinden können. So können beispielsweise Tyrosin, Histidin und Tryptophan während einer iodkatalysierten Oxidation iodiert werden.<sup>439,440</sup> Auch die Oxidation von Tryptophan und Methionin stellt eine mögliche Nebenreaktion während der oxidativen Faltung dar.<sup>441</sup>

In der Arbeitsgruppe von Prof. Diana Imhof war bereits eine orthogonale Schutzgruppenstrategie zur Synthese dreifach disulfidverbrückter Peptide etabliert.<sup>29, 442</sup> Basierend hierauf wurde für die skizzierte Syntheseherausforderung eine Schutzgruppenstrategie ermittelt, die sowohl für die Herstellung der fünf Trideginisomere (**A**-**E**) als auch der drei Analoga (**A**<sub>[C195, C255]</sub>-**C**<sub>[C195, C255]</sub>) geeignet sein sollte. Grundsätzlich sind regioselektive Strategien zur Oxidation sowohl an der festen Phase als auch in Lösung beschrieben. Aufgrund der Länge von Tridegin und der damit verbundenen möglichen Dimerisierung und Multi-

Trideginvariante Disulfidverbrückung		Trt (1)	Acm (2)	tBu (3)
Α	C5–C17, C19–C25, C31–C37	C5, C17	C31, C37	C19, C25
В	C5–C37, C17–C31, C19–C25	C5, C37	C17, C31	C19, C25
С	C5–C31, C17–C37, C19–C25	C5, C31	C17, C37	C19, C25
D	C5–C25, C17–C31, C19–C37	C5, C25	C19, C37	C17, C31
E	C5–C17, C19–C31, C25–C37	C19, C31	C25, C37	C5, C17
A <sub>[C195, C255]</sub>	C5–C17, C31–C37	C5, C17	C31, C37	_
B <sub>[C19S, C25S]</sub>	C5–C37, C17–C31	C5, C37	C17, C31	-
C <sub>[C19S, C25S]</sub>	C5–C31, C17–C37	C5, C31	C17, C37	-

**Tabelle 5.1:** Verwendete Schutzgruppen für die Synthese der Trideginisomere und -analoga. Modifiziert und ergänzt nach Bäuml, Schmitz *et al.* 2019 und Bäuml *et al.* 2020.<sup>393,394</sup>

merisierung bei einer Festphasenoxidation<sup>443</sup> sowie der potentiellen Bildung von störenden Sekundärstrukturen während der Synthese an der festen Phase kam eine Oxidation am Harz, wie sie bei verschiedenen Synthesestrategien durchgeführt wird,<sup>444</sup> nicht in Frage. Da die Synthese der drei Analoga den Syntheseaufwand zur Erzielung besserer Ausbeuten erheblich reduzieren sollte, fiel die Wahl auf eine Synthesestrategie, in der zwei Disulfidbrücken im gleichen Ansatz regioselektiv gebildet werden können. Zur Kombination von Trityl(Trt)und Acetamidomethyl(Acm)schutzgruppen<sup>395,443</sup> sowie von *tertiär*-Butyl(*t*Bu)- und 4-Methylbenzyl(MeBzl)schutzgruppen<sup>437,445</sup> existieren in diesem Zusammenhang etablierte Ein-Topf-Protokolle (one-pot protocols). Bei der Kombination von tBu-Schutzgruppen mit MeBzl-Schutzgruppen wird die Regioselektivität thermodynamisch durch ein Erhitzen auf 70 °C gewährleistet. Durch diese harschen Reaktionsbedingungen werden verschiedene Nebenreaktionen wie beispielsweise die Oxidation von Trp- und Met-Resten sowie die Aspartamidbildung<sup>446</sup> begünstigt.<sup>438</sup> Zudem rangiert Tridegin mit seinen 66 Aminosäuren im Bereich eines Miniproteins, dessen Vorfaltung bei erhöhter Temperatur zerstört werden kann. Folglich fiel die Wahl auf die Kombination aus Trt- und Acm-Schutzgruppen für die ersten beiden Disulfidbrücken. Als logische Ergänzung wurde die tBu-Gruppe als dritte Schutzgruppe für die Synthese der dreifach verbrückten Trideginisomere eingesetzt, da mithilfe der Kombination aus den genannten drei Schutzgruppen schon verschiedene Peptide mit drei oder mehr Disulfidbrücken erfolgreich hergestellt wurden.<sup>29,430,433,442,447,448</sup>

Bei der Wahl der Reihenfolge der Disulfidverknüpfung wurde wie folgt vorgegangen: Cysteine, die in der Sequenz weiter auseinander lagen, wurden zuerst verknüpft. Die in allen dreifach verbrückten Trideginisomeren vorkommende Brücke zwischen C19 und C25 wurde daher zuletzt gebildet, was auch zu einer besseren Vergleichbarkeit der Isomere untereinander und mit den jeweiligen Analoga führte. Hieraus ergab sich die jeweilige Schutzgruppenstrategie der Isomere und Analoga (Abbildung 4.1 und Tabelle 5.1).

Hinsichtlich der Selektion von geeigneten Reaktionsbedingungen für die Bildung der zwei bzw. drei Disulfidbrücken mussten mögliche Nebenreaktionen der 19 verschiedenen Aminosäuren des Tridegin in Betracht gezogen werden. Für die Bildung der ersten und zweiten Disulfidbrücke wurde wässrige Essigsäure (AcOH, 50%) als Lösungsmittel verwendet. Methanol (MeOH) als Alternative zu AcOH sorgt zwar für einen schnelleren Ablauf der Oxidationsreaktion, begünstigt aber auch Nebenreaktionen von Aminosäuren wie Tyrosin, Histidin und Tryptophan.<sup>439</sup> Der Einsatz von wässriger AcOH als Lösungsmittel verringert hingegen die Iodierung der genannten Aminosäurereste.

Für die Abspaltung der *t*Bu-Schutzgruppe sowie die gleichzeitige Verknüpfung der dritten Disulfidbrücke wurde ein TFA/DMSO/Anisol-Gemisch verwendet. Auf die Verwendung von TFA/MeSiCl<sub>3</sub>/Ph<sub>2</sub>SO<sup>29,430</sup> wurde aufgrund der beschriebenen Nebenreaktion mit ungeschützten Tryptophanresten verzichtet.<sup>449</sup>

Wie bereits kurz dargelegt (vgl. Abschnitt 5.1) war das Ziel der gewählten Schutzgruppenstrategie, die synthetische Zugänglichkeit der verschiedenen Trideginvarianten zu realisieren, um ihre inhibitorische Potenz untereinander vergleichen und daraus Strukturaktivitätsbeziehungen ableiten zu können. Eine mögliche Optimierung des vorgestellten Synthesewegs ist nicht Bestandteil der vorliegenden Dissertation.

#### Oxidation der Trideginvarianten

Während der Synthese der dreifach verbrückten Trideginisomere A-E stellte die Abspaltung der tBu-Schutzgruppe und die anschließende Bildung der dritten Disulfidbrücke eine besondere Herausforderung dar. Nach der erfolgreichen Bildung der ersten beiden Brücken durch eine mittels Iod katalysierte zweistufige Oxidation, die durch die Zugabe eines Überschusses an Ascorbinsäure gestoppt wurde, führte keines der getesteten Protokolle (TFA/DMSO/Anisol,<sup>445</sup> TFA/DMSO,<sup>433</sup> TFA/MeSiCl<sub>3</sub>/Ph<sub>2</sub>SO,<sup>29,430,449</sup> TFA/MeSiCl<sub>3</sub>/DMSO, 1 M HCl in Eisessig) zur Abspaltung der tBu-Schutzgruppe zum Syntheseerfolg. Das Hauptproblem war in diesem Zusammenhang die Löslichkeit des Zwischenprodukts nach Abschluss der zweiten Oxidation. Dies konnte durch eine leichte Abwandlung der Vorgehensweise bei der ersten und zweiten Oxidation gelöst werden: Statt der Zugabe von Ascorbinsäure, die möglicherweise die folgende dritte Oxidation behinderte, wurde das Iod mittels Cyclohexan extrahiert und auf diese Weise die Reaktion gestoppt. Cyclohexan eignete sich zu diesem Zweck aufgrund einer schnelleren und deutlicheren



Abbildung 5.2: Exemplarischer Oxidationsverlauf des Isomers A. Superposition der MALDI-Massenspektren des linearen Vorläuferpeptids (schwarz), der Intermediate nach erster (blau) und zweiter Oxidation (rot) sowie des Endprodukts (grün) nach erfolgreicher dritter Oxidation.

Phasentrennung besser als Dichlormethan. Das so gewonnene Zwischenprodukt war nun in TFA löslich und die Abspaltung der *t*Bu-Schutzgruppe sowie die dritte Oxidation konnten in TFA/DMSO/Anisol (97:2,9:0,1) erfolgreich durchgeführt werden.

Der Oxidationsverlauf des Trideginisomers **A** ist exemplarisch in Abbildung 5.2 dargestellt. Die beiden Intermediate mit einer beziehungsweise zwei Disulfidbrücken sind gut erkenntlich. Hinsichtlich des Endprodukts, das als Kaliumaddukt identifiziert wurde, bleibt festzustellen, dass es zu Adduktbildung neigt, wodurch sich der massenspektrometrische Peak verbreitert. Dies wurde bei allen dreifach verbrückten Isomeren beobachtet und ist vermutlich auf die Reaktionsbedingungen zur Abspaltung der tBu-Schutzgruppen und zur Bildung der dritten Disulfidbrücke zurückzuführen, da ein ähnliches Phänomen weder in den ersten beiden Oxidationsschritten noch beim pufferoxidierten **ABC** beobachtet wurde.<sup>384,391</sup>

Die Darstellung und Charakterisierung der zweifach verbrückten Analoga  $A_{[C19S, C25S]}$ ,  $B_{[C19S, C25S]}$ ,  $C_{[C19S, C25S]}$  und  $ABC_{[C19S, C25S]}$  erfolgte durch Thomas Schmitz (Arbeitsgruppe Prof. Diana Imhof, Universität Bonn) und ist im Manuskript Bäuml, Schmitz *et al.* 2019<sup>393</sup> ausführlich beschrieben. Der Anteil der beiden Erstautoren an den experimentellen Studien, die von Prof. Diana Imhof koordiniert wurden, beträgt jeweils 50 %. Darüber hinaus waren weitere Koautoren an biologischen Testungen beteiligt.<sup>393</sup>



**Abbildung 5.3:** Analytik der verschiedenen Trideginvarianten. Jeweils groß links: HPLC-Chromatogramme (C18) bei einem Gradienten von 20-60 % Eluent B (0,1 % TFA in Acetonitril) in 40 min (Isomere **A**, **B**, **C**, **D**, **E**) bzw. 0-60 % Eluent B in 60 min (Tridegin **Z**) (Eluent A: 0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O). Jeweils klein rechts: zugehörige MALDI-TOF-Massenspektren. Modifiziert nach Bäuml *et al.* 2020.<sup>394</sup>

Tridegin- variante	t <sub>R</sub> (C18) [min]	t <sub>R</sub> (C8) [min]	[M] <sup>r</sup>	[M] <sup>m</sup>	Oxidations- ausbeute <sup>v</sup>	Referenz
Α	18,0ª	17,9 <sup>a</sup>	7776,1	7777,1 <sup>b</sup>	9%	Bäuml <i>et al.</i> <sup>394</sup>
В	18,2ª	18,2ª	7776,1	7779,8 <sup>b</sup>	6 %	Bäuml <i>et al.</i> <sup>394</sup>
С	17,3ª	17,5ª	7776,1	7779,6 <sup>b</sup>	5 %	Bäuml <i>et al.</i> <sup>394</sup>
D	17,0ª	17,2ª	7776,1	7777,4 <sup>c</sup>	6 %	Bäuml <i>et al.</i> <sup>394</sup>
E	17,8 <sup>a</sup>	17,7 <sup>a</sup>	7776,1	7779,8 <sup>b</sup>	7 %	Bäuml <i>et al.</i> <sup>394</sup>
A <sub>[C195, C255]</sub>	18,6 <sup>d</sup>	19,0 <sup>d</sup>	7745,9	7746,2 <sup>e</sup>	14 %	Bäuml <i>et al.</i> <sup>393</sup>
B <sub>[C195, C255]</sub>	18,5 <sup>d</sup>	19,0 <sup>d</sup>	7745,9	7745,9 <sup>e</sup>	33 %	Bäuml <i>et al.</i> <sup>393</sup>
C <sub>[C195, C255]</sub>	18,4 <sup>d</sup>	19,0 <sup>d</sup>	7745,9	7746,0 <sup>e</sup>	19 %	Bäuml <i>et al.</i> <sup>393</sup>
ABC <sub>[C195, C255</sub>	] 19,2 <sup>d</sup>	18,6 <sup>d</sup>	7745,9	7745,9 <sup>e</sup>	20 %	Bäuml <i>et al.</i> <sup>393</sup>
Z	38,4 <sup>f</sup>	17,0ª	8731,1	8730,6 <sup>e</sup>	_	$Zedira^{\mathbb{R}^{372}}$

**Tabelle 5.2:** Analytische Charakterisierung der verschiedenen Trideginvarianten. Modifiziert nach Bäuml, Schmitz *et al.* 2019. und Bäuml *et al.* 2020.<sup>393,394</sup>

 $\begin{array}{ll} r \; \text{Retentionszeit} & r \; \text{berechnete durchschnittliche Masse} \\ v \; \text{bezogen auf eingesetztes gereinigtes lineares Vorläuferpeptid} \\ b \; \text{detektiert als} \; \begin{bmatrix} M+K \end{bmatrix}^+ & c \; \text{detektiert als} \; \begin{bmatrix} M+K+Na-H \end{bmatrix}^+ \\ & d \; \text{Gradient: 20-50\% MeCN in } H_2O \; \text{in 30 min} \\ \end{array}$ 

e detektiert als  $[M{+}H]^+ \qquad$ f Gradient: 0-60% MeCN in  $H_2O$  in 60 min

Bei der Oxidation der zweifach verbrückten Trideginanaloga  $A_{[C19S, C25S]}$ ,  $B_{[C19S, C25S]}$  und  $C_{[C19S, C25S]}$  (Bäuml, Schmitz *et al.* 2019) wurden beide Arten des Reaktionsstopps (Zugabe von Ascorbinsäure und Iodextraktion) getestet.<sup>393</sup> Das Oxidationsprodukt der mit Ascorbinsäure abgestoppten Reaktion wies in allen drei Ansätzen Nebenprodukte auf, die nach Iodextraktion mittels Ethylacetat nicht beobachtet wurden.<sup>393</sup> Somit erwies sich auch in diesem Fall die Extraktion des Iods als bessere Alternative.

Die analytischen Daten der gereinigten Endprodukte sind in Abbildung 5.3 und Tabelle 5.2 zusammengefasst. Wie erwartet, wurde bei der Synthese der dreifach verbrückten Trideginisomere **A-E** eine geringe Oxidationsausbeute (5-9% bezogen auf eingesetztes gereinigtes lineares Peptid) erzielt. Die Abweichungen der Ausbeuten untereinander werden als zu gering erachtet, um hieraus Rückschlüsse auf die relative Synthetisierbarkeit der einzelnen Isomere zu ziehen. Für die drei zweifach verbrückten Trideginanaloga **A**<sub>[C195, C255]</sub>-**C**<sub>[C195, C255]</sub> wurden höhere Oxidationsausbeuten erzielt (Tabelle 5.2). Analogon **B**<sub>[C195, C255]</sub> (33%) wurde mit einer deutlich höheren Ausbeute als **A**<sub>[C195, C255]</sub> (14%) und **C**<sub>[C195, C255]</sub> (19%) hergestellt. Alle drei zweifach verbrückten Isomere **A**-**C** synthetisiert.

## 5.1.2 Aufklärung der Disulfidverbrückung in synthetischen Trideginvarianten

Die Aufklärung der Disulfidverbrückung erfolgte getrennt nach dreifach verbrückten Isomeren und zweifach verbrückten Analoga. Hierbei wurde die Analyse der zweifach verbrückten Analoga von T. Schmitz (AK Prof. Imhof, Universität Bonn) durchgeführt. Diese ist im Manuskript Bäuml, Schmitz *et al.* 2019 ausführlich erläutert und wird hier lediglich zu Vergleichszwecken herangezogen.<sup>393</sup> Zur Bestätigung der angestrebten Disulfidverbrückung

Analogon	Peptidfragment	[M+H] <sup>r</sup>	[M+H] <sup>m</sup>	SG / Brücke
	KLLPCKEW	1016,54	1016,56	C5 (SH)
lin. Vorlaufer	HQGIPNPRCW	1207,56	1207,59	C17 (SH)
A[C19S, C25S]	CAF	411,20	412,18	C31 (Acm)
	IPQCRPR	940,55	940,52	C37 (Acm)
lin Vorläufor	KLLPCKEW	1016,54	1016,57	C5 (SH)
nn. voriauier	CWSGADLESAQDQY	1643,70	1643,67	C17 (Acm)
D[C19S, C25S]	CAF	411,20	412,18	C31 (Acm)
	IPQCRPR	869,46	869,49	C37 (SH)
lin Vorläufor	KLLPCKEW	1016,54	1016,56	C5 (SH)
	HQGIPNPRCW	1278,65	1278,62	C17 (Acm)
C[C19S, C25S]	CAF	340,11	340,13	C31 (SH)
	IPQCRPR	940,55	940,52	C37 (Acm)
	KLLPCKEW–CW	1321,63	1321,67	C5–C17
	KLLPCKEW–CWSGADLESAQDQY	2586,15	2586,15	C5–C17
<b>A</b>	CAF–CRPR	868,41	868,38	C31–C37
A[C19S, C25S]	CAF-CRPRSEL	1197,57	1197,55	C31–C37
	CAF–IPQCRPR	1206,59	1206,59	C31–C37
	CAF–IPQCRPRSEL	1535,75	1535,74	C31–C37
	CAF–IPQCRPRSELIKPM	2005,02	2005,03	C31–C37
	KLLPCKEW–CW	1321,64	1321,67	C5–C17 <sup>A</sup>
ABC <sub>[C195, C255]</sub>	CAF–IPQCRPR	1206,59	1206,60	C31–C37 <sup>A</sup>
	KLLPCKEW–PQCRPR	1769,93	1769,96	C5–C37 <sup>B</sup>
	CW–CAF	645,22	645,20	C17–C31 <sup>B</sup>
	KLLPCKEW–CAF	1353,67	1353,69	C5-C31 <sup>C</sup>
	CW–CRPR	836,37	836,37	C17–C37 <sup>C</sup>

**Tabelle 5.3:** Ermittelte Peptidfragmente zur Aufklärung der Disulfidverbrückung der verschiedenen Trideginanaloga. Modifiziert nach Bäuml, Schmitz *et al.* 2019.<sup>393</sup>

M Masse <sup>r</sup> berechnet, monoisotopisch <sup>m</sup> gemessen, monoisotopisch SG Schutzgruppe

<sup>A</sup> Analogon **A**<sub>[C195, C255]</sub> <sup>B</sup> Analogon **B**<sub>[C195, C255]</sub>

<sup>C</sup> Analogon **C**[C195, C255]

der einzelnen Verbindungen wurden die synthetisierten Peptide mittels Chymotrypsin proteolytisch verdaut, die entstandenen Peptidfragmente per HPLC getrennt und die entsprechenden Fraktionen massenspektrometrisch untersucht. Peptidfragmente vollständig oxidierter Endprodukte, die auf intramolekulare Disulfidbrücken hinwiesen, wurden zusätzlich nach einer Reduktion mittels Dithiothreitol (DTT) per MS analysiert. Dieses Verfahren wurde bereits in vorherigen Studien zur Identifizierung der gebildeten Disulfidisomere nach einer Tridegindarstellung per Selbstfaltungsprotokoll in Puffer angewandt.<sup>384,391</sup>

Für die linearen Vorläuferpeptide der Analoga  $A_{[C19S, C25S]}$ - $C_{[C19S, C25S]}$  wurden auf diese Weise die Positionen der eingesetzten Schutzgruppen verifiziert (Tabelle 5.3) und an Analogon  $A_{[C19S, C25S]}$  exemplarisch auch die gewünschte Disulfidverbrückung im Endprodukt bestätigt (Tabelle 5.3). Die Daten des pufferoxidierten Analogons  $ABC_{[C19S, C25S]}$  weisen auf das Vorhandensein aller drei möglichen zweifach disulfidverbrückten Isomere hin (Tabelle 5.3).

Die Endprodukte der dreifach disulfidverbrückten Trideginisomere **A-E** wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenso analysiert. Teilweise konnten hier jedoch nur zwei von drei Disulfidbrücken zweifelsfrei nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise auf die höhere Komplexität dieser Analyse im Vergleich zu den zweifach verbrückten Trideginanaloga beziehungsweise auf den abweichenden Syntheseweg im Vergleich zur Pufferoxidation der Isomerenmischung **ABC** zurückzuführen.<sup>384, 391</sup> In diesen Fällen ist dennoch von der korrekten Disulfidverbrückung auszugehen, da zur Bildung der Disulfidverbrückungen eine orthogonale Schutzgruppenstrategie angewandt wurde, alle Endprodukte vollständig oxidiert vorlagen und bei zwei bestätigten Disulfidbrücken nur die gewünschte dritte Disulfidbrücke möglich ist.

Die drei Disulfidbrücken des Isomers **A** wurden durch die Identifizierung verschiedener disulfidverbrückter Peptidfragmente nachgewiesen. Nach der Reduktion mittels DTT waren entsprechende Massen nicht mehr oder deutlich schwächer detektierbar. Zudem wurden nach der Reduktion auch die erwarteten reduzierten Massen detektiert, was ebenfalls auf die gewünschte Disulfidverbrückung hinweist (Tabelle 5.4). Im Isomer **B** konnten die beiden Brücken C17–C31 und C19–C25 ähnlich zweifelsfrei identifiziert werden (Tabelle 5.4). Die C5–C37-Disulfidverbrückung konnte indes nicht eindeutig bestätigt werden, da die Masse eines entsprechenden disulfidverbrückten Peptidfragments (LPCK–IPQC) auch nach erfolgter Reduktion detektiert wurde, während die erwarteten Teilfragmente (LPCK und IPQC) nicht nachgewiesen werden konnten. Die ermittelten Daten reichen aufgrund des Nachweises von zwei Disulfidbrücken dennoch für eine Bestätigung der gewünschten Disulfidverbrückung aus. Die Disulfidverbrückung des Isomers **C** konnte durch je zwei Peptidfragmente für alle drei Brücken nachgewiesen und nach erfolgter Reduktion bestätigt



**Abbildung 5.4:** Exemplarisches Schema der Disulfidbrückenaufklärung für Trideginisomer **A** mittels enzymatischem Verdau und anschließender massenspektrometrischer Analyse. Gezeigt ist der Nachweis der Brücke C31–C37. Modifiziert nach Bäuml *et al.* 2020.<sup>394</sup>

werden (Tabelle 5.4). Da die Analyse der Disulfidverbrückung in den Isomeren **D** und E weniger eindeutig war, wurden in beiden Fällen auch Peptidfragmente herangezogen, die durch unspezifische proteolytische Spaltung entstanden sind. Die Brücke C19–C37 in Isomer **D** konnte mithilfe von vier disulfidverbrückten Peptidfragmenten bestätigt werden, die nach erfolgter Reduktion nicht mehr oder deutlich schwächer detektierbar waren. Die C17–C31-Brücke wurde durch den Nachweis des Peptidfragments PNPRCW–CAF sowie durch die Detektion seiner Teilfragmente PNPRCW und CAF nach Reduktion mittels DTT bestätigt. Zudem wiesen zwei detektierte Massen auf die dritte Brücke (C5–C25) hin (Tabelle 5.4). Im Isomer E wurde die Existenz der beiden Brücken C19–C31 und C25–C37 durch verschiedene Peptidfragmente vor und nach der Reduktion bestätigt (Tabelle 5.4). Die C5–C17-Brücke konnte nicht ähnlich eindeutig wie in Isomer A nachgewiesen werden, da die Massen der Fragmente LPCKEW-CW und KLLPCKEW-CW auch nach Reduktion noch detektierbar waren. Aufgrund der detektierten Teilfragmente (LPCKEW, KLLPCKEW, CW) nach der Reduktion sowie der beiden anderen bestätigten Brücken ist die Datenlage nichtsdestotrotz auch in diesem Fall ausreichend für eine Bestätigung der synthetisch beabsichtigten Disulfidverbrückung.

Zusammenfassend konnte die Disulfidverbrückung aller fünf dreifach disulfidverbrückten Isomere **A-E** verifiziert werden.

nach Reduktion Disulfidvor Reduktion Isomer [M]<sup>r</sup> [M]<sup>m</sup> [M]<sup>r</sup> [M]<sup>m</sup> brücke Peptidfragment [M]<sup>m</sup> Peptidfragment [M]<sup>r</sup> Peptidfragment C5-C17 KLLPCKEW-CW 1320,64 1320,62 KLLPCKEW 1015,55 1015,53 CW 307.10 \_ CGADLECAQDQY 1312,47 1312,47 CGADLECAQDQY 1314,49 1314,49 -C19-C25 Α **CGADLECA** 778,26 778,26 CGADLECA 780,28 780,27 -\_ CAF-IPQCRPR 1205,58 1205,57 CAF 339,13 339,12 **IPQCRPR** 868,47 868,47 C31-C37 CAFIPQCRPR 1187,57 1187,57 CAFIPQCRPR 1189,58 1189,54 -\_ IPQC C5-C37 LPCK-IPQC 916,45 916,45 LPCK 459,25 459,22 \_ \_ C17-C31 PNPRCW-CAF 1108,46 1108,51 PNPRCW 771,31 CAF 771,35 339,13 339,12 В CGADLECAQDQY 1312,47 1312,46 CGADLECAQDQY 1314,49 1314,49 -\_ \_ C19-C25 GADLECA 778.26 GADLECA 778,26 780,28 780,27 \_ \_ \_ LPCK-CAFIPQ 1134,56 1134,56 LPCK 459,25 459,21 CAFIPQC 677,32 677,31 C5-C31 LPCK-QDQYCAF 1330,57 1330,48 LPCK 459,25 459,24 QDQDYCAF 873,33 873,37 CW-IPQCRPR **IPQCRPR** 1173,55 1173,57 CW 307,10 307,10 868,47 868,44 С C17-C37 CW-CRPR 307.10 CRPR 836,37 836.29 CW 307.10 530,27 530,22 1312,47 1312,46 CGADLECAQDQY 1314,49 1314,48 -CGADLECAQDQY \_ \_ C19-C25 CGADLECA 778,26 778,26 CGADLECA 780,28 780,28 \_ \_ \_ 1312,54 1312,55 LPCK LPCK-ECAQDQY 459.25 ECAQDQY 855.30 855.31 \_ C5-C25 1336,54 1336,55 LPCKEW LPCKEW-ECAQD ECAQD 774.37 774,40 564,19 564.29 PNPRCW-CAF CAF C17-C31 1108,46 1108,50 PNPRCW 771,35 771.37 339,13 339,12 D CGAD-IPQCRPRSEL 1559,72 1559,71 CGAD 364,11 364,10 **IPQCRPRSEL** 1197,63 1197,62 CGAD-IPQCRPR 1230,56 1230,60 CGAD 364,11 364,10 **IPQCRPR** 868,47 868,45 C19-C37 CGADLE-IPQC 1063,43 1063,43 CGADLE IPQC 606,23 606,20 459,22 459,19 CRPR WCGADL-CRPR 1191,53 1191,56 WCGADL 663.27 663,25 530,27 530.23

**Tabelle 5.4:** Disulfidbrückenaufklärung der Isomere **A-E** mittels chymoptryptischem Verdau und anschließender massenspektrometrischer Analyse. Identifizierte Peptidfragmente vor und nach der Reduktion durch DTT. Modifiziert nach Bäuml *et al.* 2020.<sup>394</sup>

M Masse <sup>r</sup> berechnet, monoisotopisch <sup>m</sup> gemessen, monoisotopisch

	Disulfid-	vor Reduktion			nach Reduktion					
Isomer	brücke	Peptidfragment	[M] <sup>r</sup>	[M] <sup>m</sup>	Peptidfragment	[M] <sup>r</sup>	[M] <sup>m</sup>	Peptidfragment	[M] <sup>r</sup>	[M] <sup>m</sup>
	CE C17	LPCKEW–CW	1079,46	1079,53	LPCKEW	774,37	774,37	CW	307,10	_
	C5-C17	KLLPCKEW–CW	1320,64	1320,62	KLLPCKEW	1015,55	1015,57	CW	307,10	306,94
		CG–QYCAF	806,27	806,25	CG	178,04	178,01	QYCAF	630,25	630,28
	C10 C21	WCGADL–AQDQYCAF	1605,62	1605,77	WCGADL	663,27	663,32	AQDQYCAF	944,37	944,44
	C19-C31	WCGADL–CAFIPQ	1338,57	1338,63	WCGADL	663,27	663,26	CAFIPQ	677,32	677,31
		CGAD–CAFIPQ	1039,41	1039,63	CGAD	364,11	364,14	CAFIPQ	677,32	677,32
E		ECAQD-CRPR	1092,44	1092,49	ECAQD	564,19	564,17	CRPR	530,27	530,27
E		ECAQD–IPQC	1312,51	1312,46	ECAQD	564,19	564,17	IPQC	459,22	459,20
		GADLECA-CRPR	1205,53	1205,57	GADLECA	677,27	677,32	CRPR	530,27	530,27
		ECAQD-IPQCRPR	1430,64	1430,73	ECAQD	564,19	564,18	IPQCRPR	868,47	868,47
	C25-C57	ECA-CRPR	849,36	849,33	ECA	321,10	321,08	CRPR	530,27	530,26
		ECAQD–IPQC	1021,38	1021,34	ECAQD	564,19	564,26	IPQC	459,22	459,20
		ECA–IPQC	778,30	778,26	ECA	321,10	321,07	IPQC	459,22	459,20
		GADLECA-CRPRSEL	1534,69	1534,73	GADLECA	677,27	677,34	CRPRSEL	859,43	859,45

 Tabelle 5.4: Disulfidbrückenaufklärung der Isomere A-E (Fortsetzung)

M Masse <sup>r</sup> berechnet, monoisotopisch <sup>m</sup> gemessen, monoisotopisch

## 5.1.3 Aufklärung der Disulfidverbrückung in Tridegin Z

Die Disulfidverbrückung des im Handel erhältlichen Tridegin Z, welches rekombinant hergestellt wird, war bis dato nicht bekannt. Zur Analyse der Disulfidverbrückung wurde das gleiche Protokoll wie in Abschnitt 5.1.2 angewandt. Auf eine Trennung der Peptidfragmente mittels HPLC wurde hierbei verzichtet. Die generierten massenspektrometrischen Daten wurden mittels Bruker BioTools mit theoretisch ermittelten Peptidfragmenten für alle 15 möglichen Disulfidisomere verglichen. Dabei wurde für elf von 15 Isomeren eine MS-Sequenzabdeckung von 100 % ermittelt (in Tabelle 5.5 grün und gelb markiert). Von diesen elf Isomeren zeigen jedoch nur fünf Isomere (in Tabelle 5.5 grün markiert) eine MS/MS-Abdeckung von mehr als 25 %, die auch Aminosäurepositionen im N-terminalen disulfidverbrückten Sequenzteil mit einschließt. Aufgrund der Datenlage kann folglich die Existenz der anderen Isomere (in Tabelle 5.5 gelb und rot markiert) nicht ausgeschlossen werden, allerdings ist das Vorkommen der Isomere 1-4 (entsprechen **A-D**) sowie des Isomers 10 (Verbrückung C1–C4, C2–C3, C5–C6) am wahrscheinlichsten (Tabelle 5.5).

**Tabelle 5.5:** Aufklärung der Disulfidverbrückung im Tridegin Z. Übersicht der Sequenzabdeckung aller 15 theoretisch möglichen Disulfidisomere. 1-5: den fünf synthetisierten Isomeren A-E entsprechende Isomere. Im Schema sind die MS-Abdeckung in grau und die MS/MS-Abdeckung in rot dargestellt. Wahrscheinlichkeit der Isomere: hoch (grün), mittel (gelb), niedrig (rot). Modifiziert nach Bäuml *et al.* 2020.<sup>394</sup>

	Abdeckung	
	[%]	
Isomer	MS MS/MS	Schema
1 (A)		MKLLPCKEWH QGIPNPRCWC GADLECAQDQ YCAFIPQCRP RSELIKPMDD IYQRPVEFPN LPLKPREHHH HHH
C1–C2 C3–C4 C5–C6	100 26,0	
2 (B) C1–C6 C3–C4 C2–C5	100 27,4	MKLLPCKEWH QGIPNPRCWC GADLECAQDQ YCAFIPQCRP RSELIKPMDD IYQRPVEFPN LPLKPREHHH HHH
3 (C) C1–C5 C3–C4 C2–C6	100 26,0	MKLLPCKEWH QGIPNPRCWC GADLECAQDQ YCAFIPQCRP RSELIKPMDD IYQRPVEFPN LPLKPREHHH HHH



**Tabelle 5.5:** Disulfidverbrückung des Tridegin $\mathbf{Z}$  (Fortsetzung)



**Tabelle 5.5:** Disulfidverbrückung des Tridegin **Z** (*Fortsetzung*)

#### 5.1.4 Koelutionsexperimente

In vorherigen Studien über das pufferoxidierte Tridegin war es nicht möglich gewesen, die drei identifizierten Disulfidisomere A, B und C per RP-HPLC voneinander zu trennen, um sie einzeln zu analysieren, da sie in einem einzigen Peak eluierten.<sup>384, 391</sup> Basierend auf dieser und ähnlichen Beobachtungen bezüglich des µ-Conotoxins PIIIA<sup>28</sup> wurden ausführliche Koelutionsstudien mit allen theoretisch möglichen 15 Disulfidisomeren des µ-PIIIA durchgeführt, die zeigten, dass eine chromatographische Trennung verschiedener Disulfidisomere dieses Peptids nicht eineindeutig möglich ist.<sup>29</sup>

Darauf aufbauend wurden in der vorliegenden Studie ebenfalls Koelutionsexperimente mit verschiedenen gezielt synthetisierten Disulfidisomeren durchgeführt. Das Koelutionsprofil



Abbildung 5.5: HPLC-Koelutionsprofile der Trideginisomere A-C (links) und entsprechender -analoga (rechts). Im Vergleich sind die pufferoxidierten Isomerenmischungen (jeweils oben dahinter) dargestellt. HPLC-Chromatogramme bei einem Gradienten von 20-60 % (links) bzw. 20-50 % (rechts) Eluent B (0,1 % TFA in Acetonitril) in 40 (links) bzw. 30 (rechts) Minuten (Eluent A: 0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O). Modifiziert nach Bäuml, Schmitz *et al.* 2019 und Bäuml *et al.* 2020.<sup>393,394</sup>

einer äquimolaren Mischung der dreifach disulfidverbrückten Trideginisomere A-C wies einen einzelnen Peak auf. In diesem Chromatogramm war eine leichte Schulter vor dem Hauptpeak zu erkennen (Abbildung 5.5). Diese leichte Schulter reichte allerdings nicht aus, um eine Trennung der verschiedenen Isomere per RP-HPLC zu gewährleisten. Dies unterstützt die Annahme vorheriger Arbeiten,<sup>384, 391</sup> dass die drei Disulfidisomere mit den verfügbaren chromatographischen Methoden nicht getrennt werden können. Das entsprechende Koelutionsprofil der zweifach disulfidverbrückten Trideginanaloga  $A_{[C19S, C25S]}$ - $C_{[C19S, C25S]}$  zeigte ebenfalls einen einzelnen Peak (Abbildung 5.5).<sup>393</sup> Folglich besitzen auch die drei Trideginanaloga sehr ähnliche physikochemische Eigenschaften und können daher durch RP-HPLC nicht getrennt werden.

Somit ist Tridegin ein weiteres Beispiel dafür, dass es mitunter nicht möglich ist, vom Elutionsverhalten eines disulfidverbrückten Peptids auf seine Disulfidverbrückung zu schließen. Zur Aufklärung der Disulfidverbrückung sind demnach weitere Analysen mittels MS (vgl. Abschnitt 5.1.2 und Abschnitt 5.1.3) und/oder Kernresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR)<sup>29</sup> notwendig.

# 5.2 Funktionelle Studien

In früheren Studien wurde mittels eines chromogenen und eines fluorogenen Enzymassays bereits die Bedeutung des disulfidstabilisierten N-terminalen Trideginsegments und die seines flexiblen C-terminalen Gegenstücks für die inhibitorische Aktivität des Tridegin untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Disulfidbrücken im Allgemeinen sowie von einzelnen Aminosäuren im C-terminalen Trideginfragment im Speziellen auf die inhibitorische Aktivität des Tridegin analysiert (vgl. Abschnitt 2.7.2).<sup>383,384</sup> In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung einzelner Disulfidbrücken sowie verschiedener Disulfidisomere für die Wirkung von Tridegin auf FXIIIa eruiert werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene enzymatische Assays durchgeführt. Die Analyse dieser Verbindungen erfolgte dabei in Zusammenarbeit mit Thomas Schmitz (Arbeitsgruppe Prof. Diana Imhof, Universität Bonn). Die Experimente wurden im Arbeitskreis von Prof. Torsten Steinmetzer an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

## 5.2.1 Enzymatische Aktivitätsassays

Die inhibitorische Potenz der verschiedenen Trideginvarianten wurde sowohl bezüglich der Isopeptidase- als auch der Transamidaseaktivität des FXIIIa untersucht. Zur Untersuchung der Spezifität wurde außerdem die Wirkung ausgewählter Peptide auf die Gewebetransglutaminase TGase 2 analysiert.

#### Fluorimetrischer FXIIIa-Isopeptidaseaktivitätsassay

In einigen FXIIIa-Aktivitätsassays macht man sich die Eigenschaft von FXIIIa zunutze, neben der Transglutaminaseaktivität auch über eine Isopeptidaseaktivität zu verfügen, durch die Isopeptidbindungen hydrolytisch gespalten werden können.<sup>450</sup> Mithilfe eines solchen FXIIIa-Isopeptidaseaktivitätsassays wurde bereits in vorherigen Analysen mittels chromogener und fluorogener Substrate die inhibitorische Aktivität verschiedener Trideginabkömmlinge untersucht.<sup>378, 383, 384, 451</sup>

Zum Vergleich des inhibitorischen Potentials der verschiedenen Trideginvarianten wurde ein fluorimetrischer FXIIIa-Aktivitätsassay in Zusammenarbeit mit Prof. Torsten Steinmetzer (Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Die zuvor von Dr. M. Reuleaux (geb. Böhm) charakterisierte Mischung dreifach verbrückter Isomere (**ABC**) sowie die ebenfalls bereits beschriebene Variante **All-Ser** dienten als Kontrollen.<sup>383,384</sup>

Die Daten des fluorimetrischen FXIIIa-Isopeptidaseaktivitätsassays wurden zu zwei unterschiedlichen Messzeitpunkten ermittelt. Bei der Analyse der Daten fiel auf, dass in Messung 1 durchweg niedrigere IC<sub>50</sub>-Werte als in Messung 2 bestimmt wurden. Die wiederholte Messung aller Peptide zum gleichen Zeitpunkt kam aufgrund von Substanzknappheit verbunden mit der Komplexität der Synthese nicht in Frage. Um die beiden Messeniehen dennoch miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte der beiden Messungen anhand zweier Peptide, die zu beiden Zeitpunkten gemessen worden waren ( $C_{[C19S, C25S]}$ und Z), normalisiert. Die ursprünglich ermittelten IC<sub>50</sub>-Daten sowie die normalisierten

Trideginvariante	$IC_{50}^{1}$	$1C_{50}^{2}$	IC <sub>50</sub> <sup>N2</sup>
Α	_	$0,82\pm0,05\mu\text{M}$	$0,82\pm0,05\mu\text{M}$
В	_	$0,69\pm0,04\mu M$	$0,69\pm0,04\mu M$
С	_	$0,59\pm0,04\mu M$	$0,59\pm0,04\mu M$
D	_	$0,64\pm0,06\mu M$	$0,64\pm0,06\mu M$
E	_	$0,83\pm0,06\mu M$	$0,83\pm0,06\mu M$
ABC	_	$0,45\pm0,03\mu\textrm{M*}$	$0,45\pm0,03\mu M$
A <sub>[C19S, C25S]</sub>	$0,55\pm0,05\mu\textrm{M*}$	_	$0,72\pm0,06\mu M$
B <sub>[C19S, C25S]</sub>	$0,50\pm0,05\mu\text{M*}$	-	$0,66\pm0,06\mu M$
C <sub>[C19S, C25S]</sub>	$0,48\pm0,06\mu\textrm{M*}$	$0,62\pm0,01\mu M$	$0,63\pm0,07\mu M$
ABC <sub>[C195, C255]</sub>	_	$0,51\pm0,02\mu\textrm{M*}$	$0,51\pm0,02\mu M$
All-Ser	$0,72\pm0,05\mu\textrm{M*}$	-	$0,95\pm0,06\mu M$
Z	$0,71\pm0,04\mu\text{M}$	$0,94\pm0,17\mu M$	$0,93\pm0,11\mu\text{M}$

**Tabelle 5.6:** IC<sub>50</sub>-Werte der Trideginvarianten im fluorimetrischen FXIIIa-Isopeptidaseaktivitätsassay. Modifiziert nach Bäuml *et al.* 2020.<sup>394</sup>

<sup>1</sup> Werte aus Messung 1 <sup>2</sup> Werte aus Messung 2

<sup>N2</sup> auf Niveau von Messung 2 normalisierte Werte (Faktor = 1,307) \* Werte aus Bäuml, Schmitz *et al.* 2019<sup>393</sup>

Werte aller analysierten Trideginvarianten sind in Tabelle 5.6 zur besseren Nachvollziehbarkeit zusammengefasst. Alle Unterschiede zwischen den Trideginvarianten, die im Folgenden diskutiert werden, verstehen sich als Tendenzen.

Die Auswertung der Messungen ergab für die fünf dreifach disulfidverbrückten Trideginisomere IC<sub>50</sub>-Werte von  $0.82 \pm 0.05 \,\mu$ M (**A**),  $0.69 \pm 0.04 \,\mu$ M (**B**),  $0.59 \pm 0.04 \,\mu$ M (**C**),  $0.64 \pm 0.06 \,\mu$ M (**D**) und  $0.83 \pm 0.06 \,\mu$ M (**E**). Die pufferoxidierte Mischung **ABC** inhibierte FXIIIa im gleichen Assay im Vergleich dazu mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $0.45 \pm 0.03 \,\mu$ M (Tabelle 5.6 und Abbildung 5.6). **C** scheint folglich der aktivste Isomer zu sein, dicht gefolgt von **D** und **B**, die tendenziell geringere Aktivität aufweisen. Die beiden Isomere **A** und **E** inhibieren FXIIIa mit tendenziell höheren IC<sub>50</sub>-Werten. Der Vergleich mit der pufferoxidierten Mischung **ABC**, in der in früheren Studien die Isomere **A**, **B** und **C** identifiziert wurden, macht zunächst stutzig, da die Isomerenmischung aktiver als die einzelnen enthaltenen Isomere zu sein scheint. Eine Erklärung hierfür ist einerseits das mögliche Vorkommen weiterer, aktiverer Isomere in **ABC**, die lediglich nicht zweifelsfrei identifiziert werden konnten. Andererseits ist über das Verhältnis dieser drei Isomere zueinander in **ABC** nichts bekannt, da die einzelnen Isomere nicht quantitativ bestimmt werden



Abbildung 5.6: Inhibitorische Wirkung der Trideginvarianten auf die FXIIIa-Isopeptidaseaktivität. Links: Balkendiagramm aller normalisierten IC<sub>50</sub>-Werte der Trideginvarianten im FXIIIa-Assay; dreifach disulfidverbrückte Tridegine A, B, C, D, E, ABC und Z sowie die All-Ser-Mutante (S) (alle schwarz) sind im Vergleich zu den zugehörigen zweifach verbrückten Analoga  $A_{[C19S, C25S]}$ ,  $B_{[C19S, C25S]}$ ,  $C_{[C19S, C25S]}$  und  $ABC_{[C19S, C25S]}$  (grau) dargestellt.<sup>393</sup> Die gestrichelte rote Linie zeigt den IC<sub>50</sub>-Wert der zuvor charakterisierten Isomerenmischung ABC an.<sup>384</sup> Rechts: Umsetzung des verwendeten fluorogenen Substrats,<sup>384</sup> katalysiert durch die FXIIIa-Isopeptidaseaktivität. Modifiziert nach Bäuml *et al.* 2020.<sup>394</sup>

konnten.<sup>384, 391</sup> Darüber hinaus kann spekuliert werden, ob mögliche Wechselwirkungen der verschiedenen Isomere untereinander zu einer gesteigerten Aktivität beispielsweise durch Dimeren- oder Multimerenbildung führen könnten. Es bleibt festzuhalten, dass weitere Studien notwendig sind, um diese Kausalzusammenhänge aufzuklären.

Beim Vergleich der fünf Isomere untereinander fällt auf, dass die beiden Isomere **A** und **E**, die eine Disulfidbrücke zwischen C5 und C17 aufweisen und infolgedessen flexiblerer Natur als **B**, **C** und **D** sind, eine tendenziell geringere inhibitorische Aktivität als die drei konformationell eingeschränkteren Isomere aufweisen. Diese Beobachtung sowie die bemerkenswerte Aktivität des konformationell sehr eingeschränkten *Knottin*-Isomers **D**, der in der Isomerenmischung **ABC** nicht identifiziert wurde und nicht die in **A**, **B** und **C** 'konservierte' Brücke C19–C25 trägt (Abbildung 5.1),<sup>384,391</sup> sind Hinweise darauf, dass eine konformationelle Einschränkung des N-terminalen Trideginsegments zu seiner inhibitorischen Potenz gegenüber FXIIIa beiträgt. Im Gegenzug scheint ein 'zu flexibler' N-terminaler Sequenzabschnitt die Aktivität von Tridegin zu beeinträchtigen. Im Einklang mit diesen Hypothesen steht der normalisierte IC<sub>50</sub>-Wert der **All-Ser**-Mutante (0,95 ± 0,06 µM). Diese Trideginvariante ohne Disulfidbrücken, die somit ein flexibles N-terminales Segment aufweist, inhibiert FXIIIa mit einer tendenziell noch geringeren Potenz als **A** und **E** (Tabelle 5.6

und Abbildung 5.6). Eine positive Korrelation zwischen eingeschränkter Flexibilität eines Peptids und der Aktivität gegenüber seinem Zielprotein konnte auch im ebenfalls dreifach disulfidverbrückten µ-Conotoxin PIIIA nachgewiesen werden.<sup>29,30</sup>

Betrachtet man die normalisierten  $IC_{50}$ -Werte der zweifach disulfidverbrückten Analoga  $A_{[C19S, C25S]}$  (0,72±0,06 µM),  $B_{[C19S, C25S]}$  (0,66±0,06 µM) und  $C_{[C19S, C25S]}$  (0,63±0,07 µM), so lässt sich zunächst feststellen, dass das Fehlen der C19–C25-Brücke sich nicht erheblich auf das inhibitorische Potential der Analoga auswirkt. Im Vergleich zu ihren jeweiligen dreifach disulfidverbrückten Isomeren weisen die drei Analoga eine ähnliche Aktivität auf (Tabelle 5.6 und Abbildung 5.6). Vergleicht man die drei Analoga untereinander, lässt sich die gleiche Tendenz wie in den dreifach verbrückten Isomeren feststellen:  $C_{[C19S, C25S]}$  ist das aktivste Analogon, dicht gefolgt von  $B_{[C19S, C25S]}$ . Analogon  $A_{[C19S, C25S]}$  ist etwas weniger aktiv. Interessanterweise weist auch die Mischung  $ABC_{[C19S, C25S]}$  (IC<sub>50</sub> = 0,51±0,02 µM) ein tendenziell höheres inhibitorisches Potential als die einzelnen Analoga auf. Diese Tendenz kann (im Gegensatz zu den dreifach disulfidverbrückten Isomeren) in diesem Fall nicht durch das Vorliegen weiterer Isomere begründet werden, da mit vier Cysteinen nur die drei beschriebenen Isomere gebildet werden können. Auch hier könnte eine Interaktion der Isomere untereinander sowie eine Dimeren- und Multimerenbildung diskutiert werden, was allerdings rein spekulativ ist.

Das im Handel erhältliche Z-Tridegin zeigte im getesteten Assay mit  $0.93 \pm 0.11 \,\mu\text{M}$  einen  $IC_{50}$ -Wert vergleichbar mit der All-Ser-Mutante (Tabelle 5.6 und Abbildung 5.6). Diese Diskrepanz kann nur begrenzt auf das Vorkommen einer abweichenden Isomerenmischung (1-4 entsprechend A-D sowie 10 mit C1–C4, C2–C3, C5–C6; Tabelle 5.5) zurückgeführt werden. Drei der fünf identifizierten Isomere (2, 3 und 4 entsprechend B-D) sollten eine höhere Aktivität aufweisen, während Isomer 1 (entsprechend A) weniger aktiv sein sollte. Zur Aktivität des Isomers 10 mit der Disulfidverbrückung C1–C4, C2–C3 und C5–C6 kann keine fundierte Aussage gemacht werden, da es nicht gezielt dargestellt und getestet wurde. Verglichen mit den Isomeren **B-D** kann eine geringere inhibitorische Potenz aufgrund seiner höheren Flexibilität im N-terminalen Sequenzteil vermutet werden, was bereits für Isomere des µ-Conotoxins PIIIA gezeigt wurde.<sup>29,30</sup> Es bleibt außerdem zu erwähnen, dass der His<sub>6</sub>-Tag am C-Terminus sowie das zusätzliche Methionin am N-Terminus des Peptids sich negativ auf die inhibitorische Aktivität des Tridegin  ${f Z}$  auswirken könnten. Hinzu kommt, dass die durchgeführte Analytik zu Tridegin  $\mathbf{Z}$  sowohl im HPLC-Chromatogramm als auch im MS-Spektrum (Abbildung 5.3) auf Nebenprodukte hinweist, die möglicherweise eine Verringerung der inhibitorischen Aktivität zur Folge haben. Abschließend kann auf eine vorherige rekombinante Herstellung von Tridegin verwiesen werden, in der das Produkt ebenfalls weniger aktiv war als das synthetische Peptid.<sup>384,391</sup>



**Abbildung 5.7:** FXIIIa-Enzymaktivität im FXIIIa-Isopeptidaseaktivitätsassay in Gegenwart der untersuchten Trideginvarianten. Modifiziert nach Bäuml, Schmitz *et al.* 2019 und Bäuml *et al.* 2020.<sup>393,394</sup>

In früheren Studien war ein Substratverhalten verkürzter Trideginvarianten festgestellt worden, was mit einer Abnahme der inhibitorischen Aktivität im Laufe der Zeit einherging. Bei Volllängen-Tridegin wurde ein ähnlicher Effekt nicht beobachtet. Auch die einzelnen Isomere A-E sowie die Analoga  $A_{[C19S, C25S]}$ - $C_{[C19S, C25S]}$  zeigen stabile Hemmkurven während einer Messzeit von 30 min. Bei der All-Ser-Mutante scheint es, als ob die Umsatzkurven ganz leicht parabolisch gekrümmt sind, was auf eine leichte Abnahme der Hemmwirkung mit zunehmender Zeit hinweist (Abbildung 5.7). Dieser Effekt ist beim

im Handel erhältlichen Tridegin  $\mathbf{Z}$  prominenter ausgebildet, was auf einen Rückgang der Aktivität mit zunehmender Zeit deutet. Dieses Phänomen könnte auf den C-terminalen His<sub>6</sub>-*Tag* zurückzuführen sein, da sich das Peptid in diesem Attribut von allen anderen Trideginvarianten unterscheidet.

Zusammenfassend weisen die vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass einerseits die C19–C25-Brücke nicht essentiell für die Aktivität des Tridegin ist und andererseits ein konformationell eingeschränktes N-terminales Segment das inhibitorische Potential des Peptids erhöht.

#### Fluoreszenzanisotropie-basierter FXIII-Transamidaseaktivitätsassay

Da die beschriebenen Studien sich auf die Messung der Isopeptidaseaktivität des FXIIIa beschränkten (Abbildung 5.6), wurde exemplarisch eine Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes von **ABC**<sub>[C198, C258]</sub> in einem Fluoreszenzanisotropie-Assay durchgeführt, der die FXIIIa-Transamidaseaktivität abbildete. Diese Analysen wurden durch Dr. Markus Pietsch und Paul Sommerfeld (Universitätsklinikum Köln) durchgeführt. Es konnte neben der bereits gezeigten Hemmung der Isopeptidaseaktivität von FXIIIa auch eine Hemmung der Transamidaseaktivität von FXIIIa durch **ABC**<sub>[C198, C258]</sub> festgestellt werden, welche im getesteten System einen IC<sub>50</sub>-Wert von 2,16  $\pm$  0,21 µM aufwies (Abbildung 5.8).

#### Fluoreszenzanisotropie-basierter TGase 2-Transamidaseaktivitätsassay

Zur Abklärung der Spezifität der synthetisierten Trideginvarianten wurde – abgesehen von den beschrieben Studien an FXIIIa – auch exemplarisch die Wirkung einzelner an FXIIIa sehr aktiver Trideginvarianten auf die verwandte Gewebetransglutaminase TGase 2 untersucht. Diese Arbeiten wurden von Dr. Markus Pietsch und Paul Sommerfeld am Universitätsklinikum Köln mittels des dort etablierten Assaysystems durchgeführt.<sup>396,452</sup> Als Substrat wurde Rhodamin-B-Isonipecotylcadaverin (R-I-Cad) verwendet. Für **B** und **ABC**<sub>[C195, C255]</sub> konnte bei Inhibitorkonzentrationen von 10 und 30 µM keine Hemmung der TGase 2 im getesteten Fluoreszenzanisotropie-Assay festgestellt werden (Abbildung 5.8). Im Standardprotokoll dieses Assays wird mit einer relativ hohen DTT-Konzentration (0,5 mM) gearbeitet, durch die die Trideginvarianten reduziert werden können und somit ihre Aktivität verringert werden kann. Daher wurde dieser Assay für **ABC**<sub>[C195, C255]</sub> mit einer deutlich niedrigeren DTT-Konzentration (0,1 mM) wiederholt, die auch im Fluoreszenzanisotropie-Assay mit FXIIIa verwendet wurde. Bei einer Inhibitorkonzentration von 40 µM wurde lediglich eine TGase 2-Inhibition von 12 % ermittelt (Abbildung 5.6).



Abbildung 5.8: Inhibitorische Wirkung der Trideginvarianten auf die FXIIIa- und TGase 2-Transamidaseaktivität. Oben: das für beide Assays verwendete Substrat Rhodamin-B-Isonipecotylcadaverin.<sup>396</sup> Unten links: IC<sub>50</sub>-Kurve von  $ABC_{[C19S, C25S]}$  im FXIIIa-Transamidaseaktivitätsassay. Unten rechts: Balkendiagramm zur TGase 2-Aktivität in Gegenwart von B und  $ABC_{[C19S, C25S]}$ . Modifiziert nach Bäuml *et al.* 2020.<sup>394</sup>

Somit handelt es sich bei den synthetisierten Trideginanaloga sowie vermutlich auch bei den wegen Substanzknappheit nicht getesteten dreifach disulfidverbrückten Trideginisomeren um spezifische FXIIIa-Inhibitoren. Weiterhin bleibt festzuhalten, dass durch die unterschiedliche Lokalisation von pFXIII (Plasma) und der Gewebetransglutaminase TGase 2 (hauptsächlich intrazellulär, vgl. Abschnitt 2.4.1) im Organismus eine zusätzliche Spezifität der Inhibition gegeben sein sollte, da das Miniprotein Tridegin nicht ohne weiteres Zellmembranen passieren und dadurch Kompartimente wechseln kann (z. B. vom Blut ins Gewebe).

## 5.2.2 Zellbasierte Assays

Die Erkenntnis, dass die dritte Disulfidbrücke C19–C25 nicht essentiell für die Potenz und Spezifität von Tridegin ist, vereinfachte die Trideginsynthese und ermöglichte die Herstellung größerer Mengen der disulfidreduzierten Analoga durch Thomas Schmitz (Arbeitsgruppe Prof. Diana Imhof Universität Bonn), die nun für weitergehende Analysen verwendet wurden. In zellbasierten Assays wurde die Wirkung der Trideginanaloga in humanem Plasma und Vollblut untersucht. Diese Messungen wurden durch Prof. Alisa S. Wolberg und Dr. Lori A. Holle an der *University of North Carolina* (UNC at Chapel Hill, NC, USA) durchgeführt. Statt der **All-Ser**-Mutante wurde in diesem Zusammenhang aufgrund der kurzfristigeren synthetischen Darstellbarkeit der benötigten Mengen eine verkürzte Trideginvariante ( $\mathbf{P^{39}}$ - $\mathbf{P^{64}}$ ) mit vergleichbarer inhibitorischer Potenz eingesetzt, die in früheren Studien hergestellt worden war.<sup>383,384</sup>



Abbildung 5.9: Wirkung der Trideginanaloga in zellbasierten Assays. Oben links: Änderung ( $\Delta$ ) der Peakturbidität in Plasma nach Zugabe verschiedener Konzentrationen der Trideginvarianten. Oben rechts und unten: IC<sub>50</sub>-Kurven der untersuchten Trideginvarianten im Vollblutgerinnselkontraktionsassay (norm., normalisiert). Modifiziert nach Bäuml, Schmitz *et al.* 2019.<sup>393</sup>

#### Turbiditätsassay (Turbidity Assay)

Zunächst wurde die Wirkung der vier verschiedenen Trideginvarianten  $A_{[C19S, C25S]}$ ,  $B_{[C19S, C25S]}$ ,  $C_{[C19S, C25S]}$  und  $P^{39}-P^{64}$  auf grundlegende Prozesse der sekundären Hämostase (vgl. Abschnitt 2.2), auf die FXIIIa keinen Einfluss hat, untersucht. Im Einklang mit Finney *et al.* 1997<sup>6</sup> wurde kein Effekt der Trideginvarianten auf die Fibrinbildungskinetik oder die finale Gerinnselturbidität im Plasma beobachtet (Abbildung 5.9, oben links). Dieses Resultat ist ein zusätzlicher Nachweis der Spezifität der getesteten Trideginvarianten.

#### Vollblutgerinnselkontraktionsassay (Whole Blood Clot Contraction Assay)

Der Effekt der Trideginanaloga auf FXIIIa in Vollblut wurde anschließend in einem Vollblutgerinnselkontraktionsassay (*Whole Blood Clot Contraction Assay*) im Labor von Prof. Alisa S. Wolberg analysiert. Der verwendete Assay beruht auf der Beobachtung, dass FXIIIa die Retention von Erythrozyten in kontrahierten Vollblutgerinnseln fördert und daher bestimmend für die Größe und das Gewicht des entstehenden Blutgerinnsels ist.<sup>170, 178</sup>

Alle getesteten Trideginvarianten sorgten für eine Reduktion der Erythrozytenretention im Blutgerinnsel sowie für eine Verringerung des Thrombusgewichts. Die dabei ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte betrugen  $0.7 \pm 0.4 \,\mu\text{M}$  ( $\mathbf{A}_{[C19S, C25S]}$ ),  $1.1 \pm 0.1 \,\mu\text{M}$  ( $\mathbf{B}_{[C19S, C25S]}$ ),  $2.3 \pm 2.2 \,\mu\text{M}$ ( $\mathbf{C}_{[C19S, C25S]}$ ) und  $2.2 \pm 2.0 \,\mu\text{M}$  ( $\mathbf{P}^{39}$ - $\mathbf{P}^{64}$ ) (Abbildung 5.9). Aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen der ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte können keine Rückschlüsse auf unterschiedliche Aktivitäten der einzelnen Trideginanaloga gezogen werden.

Die Ergebnisse des Vollblutgerinnselkontraktionsassays liefern die wichtige Erkenntnis, dass die getesten Trideginanaloga auch in humanem Vollblut die erhoffte Wirkung entfalten. Zur detaillierten Aufklärung der Aktivitäten einzelner Analoga sind weitere Analysen notwendig, die nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind. Hierzu gehören auch Testungen in *Invivo*-Modellen.

# 5.3 Computerbasierte Studien

Abgesehen von den bereits vorgestellten funktionellen Analysen zu den verschiedenen Trideginvarianten wurden außerdem zahlreiche computergestützte Studien zur Charakterisierung des Tridegin durchgeführt. Zunächst wurden die dreifach disulfidverbrückten Isomere **D** und **E** analog zu **A-C**<sup>384</sup> modelliert (vgl. Abschnitt 5.3.1). Zudem wurden verschiedene Molekulardynamik(MD-)simulationen ausgeführt, um die dreifach disulfidverbrückten Isomere sowohl untereinander als auch mit Isomeren mit *in silico* geöffneter C19–C25-Disulfidbrücke und mit den entsprechenden zweifach disulfidverbrückten Serinmutanten hinsichtlich ihrer strukturellen Konformation zu vergleichen (vgl. Abschnitt 5.3.2). Schließlich wurden die verschiedenen Trideginvarianten an die Kristallstruktur von FXIIIa gedockt, um die jeweiligen Bindungsmodi analysieren zu können (vgl. Abschnitte 5.3.3 und 5.3.4). Diese Arbeiten wurden von PD Dr. Arijit Biswas (Universitätsklinikum Bonn) und Ajay A. Paul George (Arbeitsgruppe Prof. Diana Imhof, Universität Bonn) durchgeführt.

## 5.3.1 Molekulare Modellierung und Blind Docking der Isomere D und E

Die beiden Trideginisomere **D** und **E** wurden analog zu  $\mathbf{A}$ - $\mathbf{C}^{384}$  per *Threading* computergestützt modelliert und an die Kristallstruktur des FXIIIa (FXIII-A°, PDB 4KTY)<sup>137</sup> gedockt (Abbildung 5.10). Diese *In-silico*-Studien wurden von PD Dr. Arijit Biswas (Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt. Die modellierten Strukturen unterscheiden sich untereinander sowie von den zuvor modellierten Strukturen der Isomere **A**-**C**. Anhand der *Docking*-Studien lässt sich feststellen, dass beide Isomere vermutlich in der Nähe



**Abbildung 5.10:** Molekulare Modellierung (mittig) und starres *Docking* an FXIIIa (FXIIIA°, PDB 4KTY, rechts)<sup>137</sup> der Trideginisomere **D** (oben) und **E** (unten). Die Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt. Zusätzlich sind Strukturen und Disulfidverbrückungen jeweils schematisch dargestellt (links). Das katalytische Zentrum von FXIIIa ist durch die farbliche und strukturelle Hervorhebung der Aminosäuren Cys314 (gelb), His373 (blau) und Asp396 (rot) markiert.

des aktiven Zentrums von FXIIIa binden. Außerdem deuten die *Docking*-Ergebnisse auf unterschiedliche Bindungsmodi beider Isomere untereinander sowie im Vergleich zu den Isomeren **A-C** (vgl. Abschnitt 2.7.3) hin. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den experimentell erhaltenen Ergebnissen (vgl. Abschnitt 5.2.1).

## 5.3.2 Molekulardynamiksimulationen der Trideginisomere und -analoga

Es wurden zwei verschiedene MD-Simulationsstudien durchgeführt. Zunächst wurde die Bedeutung der C19–C25-Disulfidbrücke in vergleichenden MD-Simulationen der Isomere A-C mit zwei bzw. drei Disulfidbrücken über eine Gesamtsimulationsdauer von 400 ns untersucht. Darüber hinaus wurden die Strukturmodelle der dreifach disulfidverbrückten Isomere **A-E** in einer 1 µs-langen MD-Simulation analysiert, um verschiedene Strukturkonformationen für die anschließenden *Docking*-Studien zu generieren. Diese Arbeiten wurden durch Ajay A. Paul George (Arbeitsgruppe Prof. Diana Imhof, Universität Bonn) in Kooperation mit PD Dr. Arijit Biswas (Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt und werden im Folgenden nacheinander beschrieben.

## Vergleich der Trideginisomere A-C mit ihren disulfidreduzierten Analoga

Zur Analyse des Effekts der C19–C25-Disulfidbrücke auf die konformationelle Integrität der Trideginstruktur wurden zwei parallele Ansätze verfolgt. Zum einen wurde diese Brücke in den Isomeren **A-C** *in silico* geöffnet und die daraus resultierenden strukturellen

Trideginvariante	RMSD <sub>gesamt</sub> [Å]	RMSD <sub>1-37</sub> [Å]	RMSD <sub>38-66</sub> [Å]
Α	3,331	2,357	3,939
A*	2,805	2,147	2,597
A <sub>[C19S, C25S]</sub>	2,589	1,171	2,925
В	2,704	1,768	3,024
B*	3,102	1,425	3,928
B <sub>[C19S, C25S]</sub>	10,747	1,539	8,250
С	1,707	1,544	1,682
C*	2,462	2,276	1,622
C <sub>[C19S, C25S]</sub>	7,033	2,634	6,524

**Tabelle 5.7:** Durchschnittliche RMSD-Werte der Trideginvarianten der Isomere A-C in der 300 ns-Molekulardynamiksimulation. Modifiziert nach Bäuml, Schmitz *et al.* 2019.<sup>393</sup>

\* Isomere mit in silico geöffneter C19-C25-Disulfidbrücke

Änderungen in Molekulardynamiksimulationen beobachtet. Zum anderen wurden entsprechend der experimentellen Herangehensweise (vgl. Abschnitt 5.1) die Serinmutanten  $\mathbf{A}_{[C19S, C25S]}$ - $\mathbf{C}_{[C19S, C25S]}$  mittels Molekulardynamiksimulationen bezüglich ihrer strukturellen Integrität untersucht. Beide Ansätze wurden schließlich untereinander und mit den Molekulardynamiksimulationen der Isomere **A**-**C** verglichen (Tabelle 5.7, Abbildung 5.11). Isomer **A** zeigte im Verlauf der Molekulardynamiksimulationen mit einem *root-mean square* 



Abbildung 5.11: MD-Simulations-*Snapshots* der disulfidreduzierten Trideginvarianten. Oben: Superposition der simulierten Strukturen der Isomere A (blau), B (rot) und C (grün) mit *in silico* geöffneter Disulfidbrücke C19–C25 auf der jeweiligen Startstruktur (transparent). Mitte: Superposition der simulierten Analoga  $A_{[C195, C255]}$  (blau),  $B_{[C195, C255]}$  (rot) und  $C_{[C195, C255]}$ (grün) auf ihren Startstrukturen (transparent). Unten: Superposition der simulierten Analoga auf ihren dreifach verbrückten *Pendants* (grau). Modifiziert nach Bäuml, Schmitz *et al.* 2019.<sup>393</sup>

deviation (RMSD)-Wert von 3,3 Å eine moderate Abweichung von seiner Startstruktur. Im Vergleich dazu zeigen das Isomer A mit *in silico* geöffneter C19–C25-Disulfidbrücke (RMSD 2,81 Å) und das Analogon  $\mathbf{A}_{[C19S, C25S]}$  (RMSD 2,59 Å) leicht geringere Werte, die auf eine etwas größere konformationelle Einschränkung dieser Peptide hinweisen (Tabelle 5.7). Die größere konformationelle Einschränkung des Analogons  $\mathbf{A}_{[C19S, C25S]}$  im Vergleich zu seinem dreifach disulfidverbrückten *Pendant* ( $\mathbf{A}$ ) – sowohl in Bezug auf den Gesamt-RMSD als auch auf den RMSD des N-terminalen Segments (AS 1-37) – ist möglicherweise eine Erklärung für seine tendenziell leicht erhöhte inhibitorische Potenz gegenüber FXIIIa im Vergleich zum Isomer  $\mathbf{A}$ . Dieser Effekt wird interessanterweise nur für Analogon  $\mathbf{A}_{[C19S, C25S]}$  beobachtet, die Folgerung hieraus ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt eher spekulativer Natur.

Isomer **B** wies mit einem Gesamt-RMSD von 2,7 Å eine etwas geringere Abweichung von seiner Startstruktur auf. Analogon  $\mathbf{B}_{[C19S, C25S]}$  zeigte mit einem Gesamt-RMSD von 10,74 Å innerhalb der je drei Varianten der Isomere A-C die größte strukturelle Abweichung von seiner Startstruktur (Tabelle 5.7). Hiervon sind allerdings 8,25 Å auf den C-terminalen Teil des Peptids (AS 38-66) zurückzuführen. Das N-terminale Peptidsegment (AS 1-37), in dem sich die (mutierten) Cysteine befinden, weicht lediglich leicht von der Startstruktur ab (RMSD<sub>1-37</sub> 1,54 Å).

Für das Isomer **C** wurde ein Gesamt-RMSD von 1,71 Å ermittelt. Somit weicht dieses Isomer im Vergleich zu **A** und **B** am wenigsten von seiner Startstruktur ab. Wie ebenfalls in **B**<sub>[**C19S**, **C25S**] beobachtet, zeigt auch **C**<sub>[**C19S**, **C25S**]</sub> mit einem Gesamt-RMSD von 7,03 Å eine vergleichsweise hohe Abweichung von seiner Startstruktur (Tabelle 5.7). Auch in diesem Fall kann ein Großteil dieser Abweichung dem unstrukturierten C-terminalen Peptidteil (RMSD<sub>38-66</sub> 6,52 Å) zugeschrieben werden, während das N-terminale Fragment nur marginal von seiner Startstruktur abweicht (RMSD<sub>1-37</sub> 1,09 Å).</sub>

In einer weiteren Analyse, die die verantwortlichen Regionen für die konformationelle Flexibilität näher eingrenzen sollte, wurde der *per-residue root mean square fluctuation* (RMSF)-Wert mit Konformations-*Snapshots* während der Simulation korreliert (Abbildung 5.12). Die verschiedenen Strukturanalysen der Isomere A-C mittels Molekulardynamiksimulationen lassen zwei Rückschlüsse zu. Einerseits wird die strukturelle Integrität der N-terminalen Peptidregion (AS 1-37) durch die Öffnung der C19–C25-Disulfidbrücke nicht erheblich beeinflusst. Andererseits ist in den Isomeren B und C ein deutlicher Effekt auf die strukturelle Konformation des C-terminalen Peptidsegments ersichtlich. Diese und weitere strukturelle Untersuchungen sind im Manuskript Bäuml, Schmitz *et al.* 2019 detailliert dargestellt.<sup>393</sup>


Abbildung 5.12: Analyse der konformationellen Flexibilität der Trideginisomere A-C (links, von oben nach unten) und der entsprechenden zweifach verbrückten Analoga  $A_{[C19S, C25S]}$ - $C_{[C19S, C25S]}$  (rechts, von oben nach unten) in Zusammenhang mit *per-residue root mean square fluctuation* (RMSF-)Werten. Jeweils links ist der RMSF-Wert des jeweiligen Aminosäurerests aufgetragen. In den Strukturen sind jeweils 100 Simulations-*Snapshots* übereinandergelagert. Sekundärstrukturelemente sind farblich markiert (*Coil*: weiß, Schleife: cyan,  $\alpha$ -Helix: violett, 3<sub>10</sub>-Helix: blau). In der rechten Darstellung der Trideginisomere A-C ist der N-terminale Sequenzabschnitt (AS 1-37) zur Verdeutlichung als Oberflächenstruktur (rot) dargestellt. C- und N-Termini sind durch Buchstaben 'C' und 'N' markiert. Modifiziert nach Bäuml, Schmitz *et al.* 2019.<sup>393</sup>

Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Analysen, dass weder die *In-silico*-Öffnung der C19–C25-Disulfidbrücke noch die Mutation der entsprechenden Cysteine zu Serin eine vollständige Entfaltung oder strukturelle Unterbrechung der Peptide zur Folge hat. Diese *In-silico*-Beobachtungen sind im Einklang mit den experimentell generierten Daten zur inhibitorischen Aktivität der Trideginvarianten (vgl. Abschnitt 5.2.1).

#### **MD-Simulationen der Isomere A-E**

Die Strukturmodelle der Isomere **A-E** wurden mittels Molekulardynamiksimulation über einen Zeitraum von 1 µs untersucht. Dies war durch Verbesserungen bezüglich der Leistung des GROMACS-MD-Pakets (Version 2018) für das etwa 15 000 Atome umfassende System

Isomer	RMSD [Å]	R <sub>G</sub> [Å]	SASA [Å <sup>2</sup> ]	ΔG <sub>solv</sub> [kJ/mol]
Α	$4,84\pm0.68$	11,91 $\pm$ 0,42	$5194\pm283$	$-10,8\pm3,0$
В	$\textbf{6,85} \pm \textbf{1,72}$	$11,\!67\pm0,\!28$	$5189\pm249$	$-7,7\pm3,1$
С	$7,\!55\pm0,\!72$	$12,\!30\pm0,\!43$	$5488\pm202$	$-6,1\pm3,8$
D	$7,\!28\pm2,\!02$	$13,\!34\pm1,\!38$	$5438\pm221$	$-1,7\pm4,0$
Е	$\textbf{7,68} \pm \textbf{1,13}$	$11,\!98\pm0,\!28$	$5193\pm198$	$-5,1\pm3,0$

**Tabelle 5.8:** MD-abgeleitete Parameter (Mittelwerte) der Isomere A-E in der 1 µs-Simulation.Modifiziert nach Bäuml *et al.* 2020.

 $\mathsf{R}_{\mathsf{G}} \text{ Gyrationsradius} \qquad \mathsf{SASA} \text{ Lösungsmittel-zugänglicher Oberflächenbereich} \qquad \Delta \mathsf{G}_{\mathsf{solv}} \text{ freie Solvatationsenergie}$ 

**Tabelle 5.9:** Gromos-Cluster-Analyse der 1 µs-MD-Simulationstrajektorie (Toleranzgrenze 2 Å RMSD). Modifiziert nach Bäuml *et al.* 2020.<sup>394</sup>

lsomer	Anzahl <i>Cluster</i>	Zeitpunkte der Top 5 <i>Cluster</i> <i>Centroids</i> [ns]	Abdeckung der Trajektorie durch Top 5 <i>Cluster</i> <i>Centroids</i> [%]	RMSD der Top 5 <i>Cluster Centroids</i> [Å]
Α	120	953,4; 221,4; 680,9; 36,1; 422,5	55,86	5,07±0,82
В	75	213,6; 504,5; 890,0; 730,4; 53,1	76,79	$5,53\pm2,43$
С	248	726,4; 241,5; 588,0; 422,7; 925,3	40,85	$5,27\pm1,77$
D	174	424,5; 769,4; 610,8; 963,5; 826,7	49,68	$\textbf{4,45} \pm \textbf{0,31}$
E	59	829,1; 167,3; 936,5; 76,5; 305,0	81,26	4,71±2,24

möglich.<sup>415</sup> Ziel dieser Analyse war es, eine Zusammenstellung vielfältiger Konformationen der verschiedenen Isomere zu erhalten, die als *Ensemble* für das anschließende molekulare *Docking* verwendet werden konnte. Diese Herangehensweise gewährleistete die umfassende Studie der Strukturaktivitätsbeziehungen zwischen verschiedenen Konformationen der Trideginisomere und ihrem Zielprotein FXIIIa.

Zur Quantifizierung der strukturellen Veränderungen der Trideginmodelle im Laufe der Simulationszeit wurden verschiedene Parameter zu Rate gezogen, unter anderem RMSD,



**Abbildung 5.13:** Superpositionen der Top 5 *Cluster Centroids* der Isomere **A-E** (von links nach rechts) aus den 1 µs-MD-Simulationen. Strukturen sind im Bändermodell dargestellt und Disulfidbrücken sind gelb markiert. C- und N-Termini sind durch Buchstaben 'C' und 'N' gekennzeichnet. Modifiziert nach Bäuml *et al.* 2020.<sup>394</sup>

RMSF, Gyrationsradius (*radius of gyration*, R<sub>G</sub>), Lösungsmittel-zugänglicher Oberflächenbereich (*solvent-accessible surface area*, SASA)<sup>453</sup> und freie Solvatationsenergie ( $\Delta G_{solv}$ ).<sup>454</sup> Eine Zusammenfassung dieser Daten, die im Manuskript Bäuml *et al.* 2020 in Gänze aufgeführt sind,<sup>394</sup> ist in Tabelle 5.8 dargestellt.

Die mittlere  $\Delta G_{solv}$ , die zur Unterscheidung zwischen thermodynamisch günstigen und ungünstigen Strukturen verwendet werden kann, wies tendenziell niedrigere Werte für die Isomere A-C auf (Tabelle 5.8), was mit ihrem Auftreten in der pufferbasierten Selbstfaltungsstrategie von Tridegin (vgl. Abschnitt 2.7.3) im Einklang ist. In jeder MD-Simulation wurden 10 000 *Snapshots* generiert, welche zur weiteren Analyse verwendet wurden. Zur Auswahl repräsentativer und gleichzeitig strukturell vielfältiger Konformationen wurde die *Gromos-clustering*-Methode verwendet.<sup>455</sup> Methodische Details können dem Manuskript Bäuml *et al.* 2020<sup>394</sup> entnommen werden. Durch dieses Verfahren wurde die Anzahl der *Snapshots* auf 248 (C) bis 59 (E) verringert (Tabelle 5.9). Anschließend wurden für jedes Isomer die fünf besten *Cluster Centroids* ausgewählt (Abbildung 5.13) und für die *Docking*-Studien (vgl. Abschnitt 5.3.4) verwendet.

#### 5.3.3 Semi-flexibles molekulares Docking der Trideginanaloga an FXIIIa

Verschiedene *Snapshots* der Molekulardynamiksimulationen der disulfidreduzierten Analoga sowie der Isomere mit *in silico* geöffneter C19–C25-Disulfidbrücke wurden an calciumaktivierten FXIIIa (FXIII-A°, PDB 4KTY)<sup>137</sup> gedockt und mit den Daten von Isomer A, B und C aus vorherigen Studien<sup>384</sup> verglichen. Es wurde ein *Ensemble-Docking*-Protokoll durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.9.4), wodurch die besten *Docking*-Positionen der Tridegin-FXIIIa-Komplexe anhand der vorhergesagten Bindungsenergien ausgewählt und analysiert wurden.



Abbildung 5.14: Molekulares *Docking* zweifach disulfidverbrückter Trideginvarianten an FXIIIa (FXIII-A°, PDB 4KTY, graues Bändermodell). Oben: *Docking* der Isomere A (blau), B (rot) und C (grün) mit *in silico* geöffneter Disulfidbrücke C19–C25. Mitte: Zwei um 180° rotierte Ansichten des molekularen *Dockings* der korrespondierenden Serinmutanten  $A_{[C19S, C25S]}$  (blau),  $B_{[C19S, C25S]}$  (rot) und  $C_{[C19S, C25S]}$  (grün). Die katalytische Triade des FXIIIa ist als Oberfläche dargestellt (C314: rosa, H373: gelb, D396: orange) Unten: Detailansichten des *Dockings* von  $A_{[C19S, C25S]}$ . Modifiziert nach Bäuml, Schmitz *et al.* 2019.<sup>393</sup>

Die verschiedenen disulfidreduzierten Tridegine binden alle ungefähr in derselben Region des FXIIIa-Enzyms (Abbildung 5.14). So ist der Cysteinrest 314, der zur katalytischen Triade des FXIIIa (Cys314, His373, Asp396)<sup>137</sup> gehört (vgl. Abschnitt 2.4.1 und Abbildung

2.4), in allen Fällen in räumlicher Nähe zu den gedockten Trideginvarianten. Dies wurde zuvor auch für die Isomere **A** und **B** beobachtet.<sup>384</sup> Die Beobachtung, dass auch das disulfidreduzierte Tridegin C in der Nähe des katalytischen Zentrums von FXIIIa bindet, steht jedoch im Widerspruch zu früheren Studien, in denen Isomer **C** an eine andere Region des FXIIIa gebunden hat.<sup>384</sup> Diese Diskrepanz ist eventuell auf die unterschiedlichen *Docking*-Techniken (Böhm *et al.* 2014: starres *Docking*; vorliegende Studie: semi-flexibles *Docking*) zurückzuführen und wird in Abschnitt 5.3.4 nochmals thematisiert. Die Mehrheit der per molekularem *Docking* analysierten *Snapshots* von **A**<sub>[C195, C255]</sub>, **B**<sub>[C195, C255]</sub> und **C**<sub>[C195, C255]</sub> binden nahe dem katalytischen Zentrum von FXIIIa. Diese Daten unterstützen die experimentellen Daten der enzymatischen Assays, in denen ähnliche inhibitorische Aktivitäten der drei disulfidreduzierten Trideginanaloga gegenüber FXIIIa beobachtet wurden.

Auf Grundlage der experimentellen und *In-silico*-Daten kann vermutet werden, dass die Trideginanaloga FXIIIa durch eine Blockierung des Zugangs zum aktiven Zentrum hemmen. Eine direkte Interaktion mit einzelnen Aminosäureresten des katalytischen Zentrums konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Die generierten *Docking*-Daten, in denen die aktiven Trideginanaloga alle etwas unterschiedlich, jedoch alle in der gleichen Region an FXIIIa binden, unterstützen diese Hypothese.

#### 5.3.4 Semi-flexibles molekulares Docking der Trideginisomere an FXIIIa

Für die semi-flexiblen *Docking*-Studien der Isomere **A-E** wurde abweichend vom zuvor beschriebenen molekularen *Docking* (vgl. Abschnitt 5.3.3) nicht die Kristallstruktur von FXIIIa (PDB 4KTY),<sup>137</sup> sondern eine daraus abgeleitete MD-simulierte und equilibrierte Struktur aus einer kürzlich von Singh *et al.*<sup>417</sup> publizierten Arbeit verwendet. Grund hierfür war die Annahme, dass die FXIIIa-Struktur in einer energetisch günstigeren Konformation vorliegen würde. Ein *Alignment* der beiden Strukturen ergab nur eine geringe konformationelle Abweichung von 1,5 Å. Weitere Details hierzu können dem Manuskript Bäuml *et al.* 2020 entnommen werden.<sup>394</sup>

Es wurde für das molekulare *Docking* der fünf Trideginisomere **A-E** (ähnlich wie für die zweifach disulfidverbrückten Trideginvarianten, vgl. Abschnitt 5.3.3) ein *Ensemble-Docking*-Protokoll durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.9.4 in Material und Methoden). Folglich wurden die jeweils besten *Docking*-Positionen der Tridegin-FXIIIa-Komplexe mithilfe der vorhergesagten Bindungsenergien selektiert und anschließend analysiert.

Wie schon bei den zweifach disulfidverbrückten Trideginvarianten beobachtet (vgl. Abschnitt 5.3.3), binden auch die dreifach disulfidverbrückten Trideginisomere **A-E** alle



**Abbildung 5.15:** Molekulares *Docking* der dreifach disulfidverbrückten Trideginisomere an FXIIIa (FXIII-A°, aus Singh *et al.* 2019,<sup>417</sup> graues Bändermodell). Oben: Die bestbewerteten *Docking*-Komplexe der Isomere **A** (blau), **B** (rot), **C** (grün), **D** (magenta) und **E** (cyan) an FXIIIa in der Gesamtansicht. Darunter: Detailansichten der einzelnen *Docking*-Komplexe sowie die Angabe der jeweils ermittelten Bindungsenergien ( $E_{bind}$ ). Aminosäurereste, die im Komplex Wasserstoffbrückenbindungen (gelbe gestrichelte Linie) eingehen, sind im Stäbchenmodell dargestellt und beschriftet. Die katalytische Triade von FXIIIa (C314, H373 und D396) ist im Stäbchenmodell dargestellt und ihre molekulare Oberfläche zusätzlich in transparent-grün gekennzeichnet, um ihre Nähe zu den gedockten Strukturen zu zeigen. Modifiziert nach Bäuml *et al.* 2020.<sup>394</sup>

ungefähr an der gleichen Stelle oberhalb der katalytischen Triade des FXIIIa (Abbildung 5.15 oben). Für die Isomere A, B, D und E wurde bereits im starren Blind-Docking-Ansatz eine Bindung in dieser Region gezeigt (vgl. Böhm et al. 2014 und Abschnitt 5.3.1),<sup>384</sup> während für Isomer  $\mathbf{C}$  im starren *Docking* die Bindung an eine Region entfernt vom katalytischen Zentrum beobachtet wurde.<sup>384</sup> Diese Diskrepanz kann auf die unterschiedlichen Docking-Methoden in den verschiedenen Experimenten zurückgeführt werden: Im starren Blind Docking wurde nur eine Konformation des Isomers (die modellierte Startstruktur der MD-Simulation) an FXIIIa gedockt.<sup>384</sup> In der hier beschriebenen semi-flexiblen Docking-Studie wurden hingegen aus 10000 Snapshots der 1 us langen MD-Simulation fünf repräsentative Centroid Cluster (vgl. Abschnitt 5.3.2) mehrfach gedockt und der bestbewertete Komplex ausgewählt. Folglich ist davon auszugehen, dass die hier beschriebenen Docking-Komplexe besser widerspiegeln, welche Wechselwirkungen tatsächlich auf molekularer Ebene zwischen Isomer und FXIIIa stattfinden als die zuvor durchgeführten Blind-Docking-Untersuchungen.<sup>384</sup> Die hier vorgestellten Ergebnisse stehen zudem auch im Einklang mit der in experimentellen Studien ermittelten inhibitorischen Potenz von Isomer  $\mathbf{C}$  (vgl. Abschnitt 5.2.1).

Alle fünf ermittelten Isomer-FXIIIa-Komplexe werden durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Abbildung 5.15 unten). Die berechneten theoretischen Bindungsenergien (Poisson-Boltzmann,  $E_{bind}$ )<sup>456</sup> geben bemerkenswerterweise den gleichen Trend innerhalb der fünf Isomere wieder, wie er schon im fluorimetrischen Enzymassay (vgl. Abschnitt 5.2.1) beobachtet wurde: Isomer **C** zeigt die höchste Bindungsenergie ( $E_{bind} = 952 \text{ kJ/mol}$ ), was mit dem geringsten IC<sub>50</sub>-Wert im Enzymassay korreliert. Dahinter folgen Isomer **D** ( $E_{bind} = 422 \text{ kJ/mol}$ ) und Isomer **B** ( $E_{bind} = 403 \text{ kJ/mol}$ ) sowie schließlich Isomer **A** ( $E_{bind} = 301 \text{ kJ/mol}$ ) und Isomer **E** ( $E_{bind} = 281 \text{ kJ/mol}$ ). Die Relationen der Werte untereinander verstehen sich – wie auch im fluorimetrischen Enzymassay (vgl. Abschnitt 5.2.1) – als Tendenzen. Die Übereinstimmung des generellen Trends der experimentellen mit den computerbasierten Studien zeigt, dass die angewandten bioinformatischen Analysen in der Lage sind, die experimentell ermittelten Ergebnisse abzubilden und möglicherweise sogar vorherzusagen.

### 5.4 Bedeutung der Disulfidverbrückung in Tridegin

Die beschriebenen experimentellen und computerbasierten Studien demonstrieren, dass verschiedene Disulfidisomere des FXIIIa-Inhibitors Tridegin inhibitorische Aktivität gegenüber ihrem Zielprotein aufweisen. Da aufgrund der synthetischen Komplexität nur fünf von 15 theoretisch möglichen Disulfidisomeren experimentell charakterisiert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Disulfidisomere des Tridegin gegenüber FXIIIa aktiver bzw. kaum aktiv sind. Nichtsdestotrotz ist es möglich, anhand der vorgestellten Studien verschiedene Folgerungen abzuleiten.

Durch die Auswahl der fünf synthetisierten Trideginisomere  $(\mathbf{A}-\mathbf{E})$  wurde ein relativ breites Spektrum an konformationeller Flexibilität der Trideginstruktur abgedeckt: Die Disulfidverbrückung von Isomer  $\mathbf{A}$  schränkt das Peptid am wenigsten in seiner konformationellen Flexibilität ein. Isomer  $\mathbf{D}$  ist mit der *Knottin*-Disulfidverbrückung hingegen konformationell sehr eingeschränkt. Da auch Isomere  $\mathbf{B}$  und  $\mathbf{C}$  mehrere überlappende Disulfidbrücken aufweisen, ist hier von einer relativ hohen konformationellen Einschränkung auszugehen. Isomer  $\mathbf{E}$  ist als moderat konformationell flexibel einzuschätzen.

Die umfassende Analyse dieser fünf unterschiedlichen Isomere weist darauf hin, dass eine Einschränkung der konformationellen Flexibilität im N-terminalen Teil des Peptids (K1-C37) mit einer höheren inhibitorischen Potenz gegenüber FXIIIa korreliert. Daher können auch hypothetische Rückschlüsse auf nicht untersuchte Disulfidisomere gezogen werden, welche allerdings durch experimentelle Studien verifiziert werden sollten.

Hinsichtlich der C19–C25-Disulfidbrücke, die in vorherigen Studien in allen drei im Selbstfaltungsansatz identifizierten Trideginisomeren detektiert wurde,<sup>384,391</sup> weisen die vorgestellten *In-vitro-* und *In-silico*-Ergebnisse darauf hin, dass sie weder für die strukturelle Integrität des Peptids (vgl. Abschnitt 5.3.2) noch für seine inhibitorische Potenz oder Spezifität gegenüber FXIIIa (vgl. Abschnitt 5.2.1) eine gewichtige Rolle spielt. Diese Erkenntnis steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu den Studien von Böhm *et al.*,<sup>384</sup> in denen aufgrund verschiedener Beobachtungen vermutet wurde, dass die Bildung der Disulfidbrücke C19–C25 für die korrekte Faltung des Peptids und folglich auch für seine strukturelle und funktionelle Integrität von Bedeutung ist (vgl. Abschnitt 5.1).

Schaut man etwas genauer hin, löst sich dieser Widerspruch allerdings recht zügig auf: Es wurde eine C25–C37-Disulfidbrücke in partiell-oxidiertem Tridegin vorgefunden, welches offensichtlich in einem fehlgefaltetem Stadium arretiert war. Sowohl die Bildung der Brücke C19–C25 als auch die Mutation der zugehörigen Cysteine zu Serin beugen der Bildung der C25–C37-Disulfidbrücke vor. Folglich ergibt sich aus den bis heute durchgeführten Studien zu Tridegin, dass die C19–C25-Brücke zwar möglicherweise essentiell für seine Faltung ist, nicht jedoch *per se* für seine Struktur und Funktion. Interessant sind diesbezüglich auch die Isomere, die im rekombinant hergestellten Tridegin **Z** identifiziert wurden: Nach der Datenlage erscheint das Vorkommen keines der drei Isomere mit der Disulfidbrücke entsprechend der C25–C37-Brücke (C4–C6) als sehr wahrscheinlich (vgl. Abschnitt 5.1.3). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Ausbildung dieser Disulfidbrücke während des Faltungsprozesses möglicherweise zu einem fehlgefaltetem Stadium führt.

Die Tatsache, dass Isomer **D** eine ähnliche inhibitorische Potenz wie die Isomere **B** und **C** aufweist, zeigt zudem, dass auch Isomere, die nicht während einer Pufferoxidation gebildet wurden (bzw. identifiziert wurden), aktiv sein können. Im Falle von Tridegin scheint folglich die Einschränkung der konformationellen Flexibilität des N-terminalen Peptidteils bedeutender zu sein als einzelne Disulfidverbrückungen wie C19–C25.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vorliegenden Studien viele Einblicke in Strukturaktivitätsbeziehungen des peptidischen FXIIIa-Inhibitors liefern, insbesondere hinsichtlich verschiedener Disulfidverbrückungen. Zudem wirft die vorliegende Arbeit auch neue Fragen auf. So lässt beispielsweise die Beobachtung, dass pufferoxidierte Isomerenmischungen tendenziell aktiver als ihre einzelnen Komponenten sind, potentielle Interaktionen der Isomere untereinander sowie mögliche Dimeren- und Multimerenbildung vermuten. Da in früheren Studien eine erhöhte Aktivität von Tridegindimeren verglichen mit Trideginmonomeren gezeigt wurde,<sup>384,391</sup> wäre eine perspektivische Untersuchung dieses Phänomens wünschenswert. Allerdings sind bislang keine analytischen Methoden zur Aufklärung der Disulfidverbrückung in Disulfiddimeren verfügbar, wodurch eine solche Analyse schwer zu bewerkstelligen ist.

## 5.5 Identifizierung der nativen Trideginsequenz in H. ghilianii

Wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben und in Abbildung 2.8 gezeigt, sind einige Aminosäurepositionen der Trideginsequenz, wie sie nativ im *H. ghilianii* vorkommt, unklar. Zwar wurde in zwei Patentschriften<sup>382, 386</sup> eine vollständige Trideginsequenz veröffentlicht, allerdings wurde in diesem Zusammenhang nicht gezeigt, wie die fraglichen Aminosäurepositionen aus Finney *et al.* 1997<sup>6</sup> bestimmt wurden. Der Arbeitskreis von Prof. Diana Imhof verwendet für seine Studien zum Thema Tridegin seit 2009 eine 66 Aminosäuren lange Sequenz, in der fragliche Positionen durch den Vergleich mit einem homologen cDNA-Sequenzabschnitt aus *H. depressa* ermittelt wurden.<sup>383, 387, 388</sup> Diese Sequenz hat die gleiche Länge wie das ursprünglich von Finney *et al.*<sup>6</sup> beschriebene Peptid und weicht somit um zwei Aminosäuren (Methionin am N-Terminus und Glutaminsäure am C-Terminus) von der in den beiden Patentschriften beschriebenen 68 Aminosäuren langen Sequenz ab.<sup>382, 386</sup>

Da auch die ursprünglich beschriebene Potenz des Tridegin gegenüber FXIIIa in späteren Studien nicht mehr beobachtet werden konnte (vgl. Abschnitt 2.7), existieren Zweifel darüber, ob die Sequenz, mit der zum jetzigen Zeitpunkt gearbeitet wird, dem entspricht, was nativ im *H. ghilianii* vorkommt. Weiterhin beschäftigen sich aktuelle Studien über Tridegin mit den strukturellen und funktionellen Auswirkungen seiner sechs Cysteine. Zwei davon sitzen an Positionen, die in der Erstbeschreibung von Tridegin nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden konnten (C19, C37). Außerdem existieren in der Sequenz möglicherweise zwei weitere Cysteine an Positionen, die ursprünglich nicht eindeutig zugeordnet werden konnten und schließlich – basierend auf dem Sequenzvergleich mit *H. depressa* – als Glutaminsäure postuliert wurden (E56, E66).<sup>6,383</sup> In der Konsequenz scheint es überfällig, die vollständige Sequenz des Tridegin aus nativem *H. ghilianii*-Material zu ermitteln. Ein Grund für das Fehlen der genannten Informationen ist der erschwerte Zugang zu

nativem Material aus *H. ghilianii*. Die Recherche nach sowie der Kontakt mit verschiedenen an der ursprünglichen Forschungsarbeit zu *H. ghilianii* beteiligten Personen, Forschungseinrichtungen und Unternehmen brachte die Erkenntnis, dass keine lebenden *H. ghilianii*-Exemplare in den involvierten Instituten und Firmen zur Verfügung stehen. Die einzige Option, an lebendes Material und somit möglicherweise auch an verwertbare mRNA- und Peptidproben zu gelangen, schien somit eine Expedition nach Französisch-Guyana, wo die letzten beschriebenen Exemplare dieser seltenen Blutegelart entdeckt wurden. Die Untersuchung 'frischer' Amazonas-Riesenblutegel konnte im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit mangels Regenwald-Expertise und geeigneter Kooperationspartner vor Ort nicht realisiert werden.

Im Zuge des Austauschs mit Biopharm Leeches (Biopharm UK Ltd., Hendy, Wales), die ihre *H. ghilianii*-Zucht schon vor langer Zeit eingestellt hatten, ergab sich jedoch die Möglichkeit, tiefgefrorenes isoliertes Speicheldrüsengewebe dieses Blutegels zu erwerben. Diese Option wurde wahrgenommen in der Hoffnung, zumindest verwertbare genomische DNA aus dem Gewebe isolieren und analysieren zu können.

Aus der Proboscis des Blutegels (Abbildung 5.16) wurde genomische DNA isoliert, mittels *single-molecule real-time sequencing* sequenziert (vgl. Abschnitt 4.10) und anschließend analysiert. Diese Arbeiten wurden in enger Kooperation mit PD Dr. Lars Podsiadlowski und Anja Bodenheim (Zoologisches Forschungsmuseum Koenig, Bonn) durchgeführt.

#### 5.5.1 Isolation genomischer DNA aus H. ghilianii-Gewebe

Zur Analyse standen die posteriore und anteriore Speicheldrüse sowie die Proboscis des *H. ghilianii* zur Verfügung (Abbildung 5.16). Tridegin wurde von Finney *et al.* in der posterioren Speicheldrüse identifiziert.<sup>6</sup> Die Qualität des tiefgefrorenen Gewebes aus 1994 reichte allerdings aufgrund seines Alters nicht zur RNA- oder Peptidisolation aus. Zur Isolation genomischer DNA wurde Proboscis-Gewebe verwendet, da hiervon das meiste Material vorhanden war. Die DNA-Isolation erfolgte mittels magnetischer *Beads* in Kooperation mit PD Dr. Lars Podsiadlowski und Anja Bodenheim (Zoologisches Forschungsmuseum Koenig, Bonn).



**Abbildung 5.16:** Isolierte Speicheldrüsen aus *H. ghilianii*. Links: Nahaufnahme der präparierten Speicheldrüsen. Zu erkennen sind die Proboscis (P) sowie die anterioren (AG) und posterioren (PG) Speicheldrüsenpaare.<sup>457</sup> Rechts: erworbene isolierte Speicheldrüsensets. (Bild: Biopharm UK Ltd.)

#### 5.5.2 PCR-Barcoding und Analyse der DNA-Fragmentgrößen

Die Identität der Species wurde durch *Barcoding* mittels PCR an der isolierten DNA bestätigt. Hierbei wurde die mitochondriale *cytochrome oxidase subunit I* (COI) nachgewiesen, welche klassischerweise zur Identifizierung verschiedener Species verwendet wird. Die Analyse wurde mithilfe der BOLD-Datenbank (v3.boldystems.org) durchgeführt und bestätigte die Species *Haementeria ghilianii* mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,4% (Tabelle 5.10). Der beste Treffer mit einer anderen Art war lediglich zu 92,5% ähnlich, was eine Artidentifizierung recht eindeutig zulässt (Tabelle 5.11 und Abbildung 5.17).

Zur qualitativen Überprüfung der gewonnenen genomischen DNA wurde eine Analyse der DNA-Fragmentgrößen durchgeführt (Abbildung 5.18). Der weitaus größte Teil der DNA lag in Fragmentgrößen von über 10000 bp vor. Diese Fragmentgrößen waren für eine Genomanalyse mit langen *Reads*, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden sollte, optimal.

Diese Arbeiten wurden durch PD Dr. Lars Podsiadlowski und Anja Bodenheim (Zoologisches Forschungsmuseum Koenig, Bonn) ausgeführt.

Taxonomische Ebene	Zuordnung	Wahrscheinlichkeit [%]	
Phylum	Annelida	100	
Klasse	Clitellata	100	
Ordnung	Rhynchobdellida	100	
Familie	Glossiphoniidae	100	
Genus	Haementeria	100	
Species	Haementeria ghilianii	99,4	

 Tabelle 5.10:
 Speciesidentifikation per PCR-Barcoding – Zusammenfassung der BOLD-Datenbank

 (v3.boldystems.org)

**Tabelle 5.11:** Speciesidentifikation per PCR-*Barcoding* – Top 5 Übereinstimmungen der BOLD-Datenbank (v3.boldystems.org)

Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Genus	Species	Ähnlichkeit [%]
						[/•]
Annelida	Clitellata	Rhynchobdellida	Glossiphoniidae	Haementeria	ghilianii	99,38
Annelida	Clitellata	Branchiobdellida	Branchiobdellidae	Magmatodrilus	obscurus	92,53
Annelida	Clitellata	Rhynchobdellida	Glossiphoniidae	Haementeria	officinalis	88,20
Annelida	Clitellata	Rhynchobdellida	Glossiphoniidae	Haementeria	officinalis	88,04
Annelida	Clitellata	Rhynchobdellida	Glossiphoniidae	Haementeria	officinalis	87,94



**Abbildung 5.17:** Speciesidentifikation per PCR-*Barcoding* – Ähnlichkeiten der Top 99 Treffer. Modifiziert aus BOLD-Datenbank (v3.boldystems.org).



Abbildung 5.18: Fragment-Analyse der genomischen *H. ghilianii*-DNA aus Proboscisgewebe. *Relative fluorescent units* (RFU) sind gegen die DNA-Fragmentgröße (in Basenpaaren, bp) aufgetragen. Die gestrichelte violette Linie markiert eine Größe von 10000 bp. Alle darüber liegenden DNA-Fragmente sind optimal für eine Genomsequenzierung mittels langer *Reads* geeignet. LM (*lower marker*) definiert den Bereich, in dem die Fragmengrößen geeicht werden.

#### 5.5.3 Sequenzierung der genomischen DNA aus H. ghilianii

Laut der Online-Datenbank www.genomesize.com wird die Größe des *H. ghilianii*-Genoms auf 520 Mb geschätzt.<sup>458,459</sup> Dieser Wert liegt (zum Vergleich) zwischen der Genomgröße des Bakteriums *Escherichia coli* (4,6 Mb) und der des *Homo sapiens* (3 235 Mb).<sup>460,461</sup> Nach erfolgter *Library*-Generierung (vgl. Abschnitt 4.10.4) wurden in drei verschiedenen Sequenzierungsläufen insgesamt 11,823 Gb Sequenzdaten generiert, was ausgehend von der geschätzten Genomgröße (520 Mb) einer Sequenzabdeckung von etwa 22,7 x entspricht. Diese Arbeiten wurden am ZFMK Bonn in Zusammenarbeit mit Anja Bodenheim und PD Dr. Lars Podsiadlowski durchgeführt. Die einzelnen *Reads* wurden miteinander überlappt (*raw read overlap* mittels minimap2), assembliert (*assembly* mittels miniasm), kartiert (*read mapping* mittels ngmlr) und das zusammengesetzte Genom schließlich korrigiert (*error correction* mittels racon).<sup>462</sup> Das so generierte Genom-*Assembly* umfasste 380 Mb bestehend aus 4 500 *Contigs* und wies einen n50-Wert von 400 000 bp auf. Die Assemblierung des Genoms erfolgte durch PD Dr. Lars Podsiadlowski (Zoologisches Forschungsmuseum Koenig, Bonn). Weitergehende Studien bezüglich des sequenzierten Blutegelgenoms werden aktuell realisiert und sind nicht Bestandteil der vorliegenden Dissertation.

#### 5.5.4 Identifizierung des für Tridegin kodierenden Gens

Mittels tBLASTn wurde die in offiziellen Datenbanken hinterlegte Trideginsequenz (68 Aminosäuren, analog zu Linxweiler *et al.* 2000,<sup>382</sup> vgl. Abbildung 2.8) im generierten Genom des *H. ghilianii* gesucht. Es wurde ein *Contig* identifiziert, das große Teile der Trideginsequenz beinhaltete (E-Wert =  $1 \cdot 10^{-9}$ , Score [Bits] = 55,1). Die Trideginsequenz ist auf diesem *Contig* in drei Teile aufgeteilt, zwischen denen möglicherweise nicht kodierende DNA-Abschnitte (Introns) liegen (Abbildung 5.19). Dass die betreffenden Teilabschnitte der Trideginsequenz auf dem selben *Contig* liegen, ist ein Hinweis darauf, dass es sich um ein zusammenhängendes Gen handelt.

Im Vergleich zur Trideginsequenz, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Diana Imhof verwendet wird (vgl. Abschnitt 2.7.1 und Abbildung 2.8), konnten 62 der 66 Aminosäuren des Tridegin bestätigt werden, was 94 % der Sequenz entspricht (Abbildung 5.19). Alle Cysteinreste sowie die für die inhibitorische Potenz von Tridegin wichtigen Aminosäuren Ile50, Gln52 und Leu62 wurden nachgewiesen.<sup>383</sup> Die vier Aminosäurereste, die im Genom nicht identifiziert wurden, sind Lys1 und Leu2 sowie Arg40 und Glu66.

Somit wurde die Trideginsequenz im Genom des *H. ghilianii* zu großen Teilen (94%) bestätigt. Insbesondere die Verifizierung der Cysteinpositionen sowie der aktivitätsbestimmenden Positionen im N-terminalen Sequenzabschnitt sind in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung. Zur Beantwortung der Frage, ob die vier Aminosäurepositionen, die nicht im Genom bestätigt werden konnten, tatsächlich im nativen Trideginpeptid fehlen oder durch andere Aminosäuren ersetzt werden, bedarf es weiterer Studien, die nicht Bestandteil der vorliegenden Dissertation sind.

```
      1
      KLLPCKEXHQ GIPNPRCXCG ADLEXAQDQY CAFIPQC/ERPR SELIKPMDDI YQRPVC/EFPNL PLKPRC/E

      2
      KLLPCKEWHQ GIPNPRCWCG ADLECAQDQY CAFIPQ C RPR SELIKPMDDI YQRPV E FPNL PLKPR E

      3a
      LPCKEWHQ GIPNPRCWCG

      3b
      ADLECAQDQY CAFIPQ C RP

      3c
      SELIKPMDDI YQRPV E FPNL PLKPR
```

**Abbildung 5.19:** Bestätigung der Trideginsequenz im generierten Genom des *H. ghilianii* durch einen Vergleich mit zuvor postulierten Sequenzen. 1: ursprünglich von Finney *et al.* 1997<sup>6</sup> postulierte Trideginsequenz mit Unsicherheiten an den in rot markierten Positionen. 2: verwendete Sequenz auf Grundlage eines Homologievergleichs von Böhm *et al.* 2012.<sup>383</sup> Zuvor unklare Aminosäuren sind in fett markiert. 3a-3c: im Genom des *H. ghilianii* identifizierte Sequenz, die auf einem zusammenhängenden DNA-Abschnitt (*Contig*) liegt. Zwischen a, b und c liegen vermutlich nicht-kodierende DNA-Abschnitte (Introns). Bestätigte Aminosäuren, deren Funktion für die inhibitorische Potenz des Tridegin gegenüber FXIIIa bereits näher charakterisiert wurde,<sup>383,384,393</sup> sind in grün markiert.

## 6 Fazit und Ausblick

Der Blutgerinnungsfaktor XIIIa stellt aufgrund seiner Beteiligung an einer Vielzahl (patho-) physiologischer Prozesse und insbesondere durch die Katalyse des letzten Schrittes der Blutgerinnungskaskade ein außerordentlich interessantes pharmakologisches Zielprotein dar. In Ermangelung eines spezifischen FXIIIa-Inhibitors in der medizinischen Anwendung war das Ziel der vorliegenden Dissertation daher die detaillierte Charakterisierung des bis dato einzigen beschriebenen natürlichen peptidischen FXIIIa-Inhibitors: Tridegin aus dem Amazonas-Riesenblutegel *H. ghilianii.*<sup>6</sup> Zu diesem Zweck wurde einerseits die Bedeutung verschiedener Disulfidverbrückungen im cysteinreichen Tridegin für seine Faltung, Struktur und inhibitorische Potenz gegenüber FXIIIa analysiert sowie andererseits der Frage nach der tatsächlichen Aminosäuresequenz des Tridegin im Rahmen einer Genomsequenzierung des *H. ghilianii* auf den Grund gegangen.

Böhm *et al.* hatten in früheren Studien verschiedene dreifach disulfidverbrückte Disulfidisomere des Tridegin in einem Selbstfaltungsansatz in Puffer identifiziert, die durch HPLC nicht getrennt werden konnten und daher nicht individuell experimentell analysiert wurden.<sup>384,391</sup> Hierauf basierend wurden nun die drei identifizierten Disulfidisomere (**A**, **B** und **C**) sowie zwei weitere Isomere mit bekannten Disulfidverbrückungsmustern (*Knottin*-Motiv in Isomer **D** und LAP-Motiv in Isomer **E**) mithilfe einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie gezielt synthetisiert, um sie im Anschluss funktionell und strukturell zu charakterisieren.

Diese Synthese stellte eine besondere Herausforderung der vorliegenden Arbeit dar. Von großer Bedeutung war in diesem Zusammenhang die effektive Entfernung des Iods durch Extraktion nach den iodkatalysierten Oxidationsreaktionen zur Ausbildung der ersten und zweiten Disulfidbrücke, da vermutlich sowohl Iod- als auch Ascorbinsäurerückstände die Abspaltung der tBu-Schutzgruppe im Zuge der dritten Oxidation behinderten. Die fünf Trideginisomere wurden in für eine Charakterisierung ausreichenden Mengen hergestellt. Eine Optimierung der Synthesestrategie war nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit und könnte perspektivisch durch leichte Modifizierungen der verschiedenen Oxidationsschritte erfolgen. Die Synthese zweifach disulfidverbrückter Trideginanaloga, welche eine vergleichbare Aktivität gegenüber FXIIIa besitzen, ist allerdings deutlich weniger kostspielig und komplex,<sup>393</sup> weshalb die weitere Optimierung dieser Synthese im Vergleich wesentlich

sinnvoller ist. Hierbei könnte der Fokus z. B. auf den Austausch der Disulfidbrücken durch Laktam- und/oder Selenosulfidbrücken gelegt werden, um Syntheseaufwand und -kosten zu reduzieren.

Die Disulfidverbrückungen der fünf verschiedenen Trideginisomere wurden zunächst in einem enzymatischen Verdau mit anschließender massenspektrometrischer Analyse bestätigt. Anschließend wurden sie in einem fluorogenen FXIIIa-Assay untereinander sowie mit der zuvor charakterisierten Isomerenmischung ABC und dem kommerziell verfügbaren Tridegin  $\mathbf{Z}$  (Zedira<sup>®</sup>) bezüglich ihrer inhibitorischen Potenz verglichen. Während alle fünf Isomere FXIIIa in einem  $IC_{50}$ -Bereich von 0,59 bis 0,83 µM inhibierten, fiel auf, dass die beiden Isomere  $\mathbf{A}$  und  $\mathbf{E}$  eine vergleichsweise geringere inhibitorische Potenz als Isomere B, C und D aufwiesen. Bemerkenswerterweise wurde diese Tendenz auch in den parallel durchgeführten computerbasierten Docking-Studien beobachtet, in denen theoretische Bindungsenergien der einzelnen Trideginisomere zu FXIIIa ermittelt wurden. Dieser Unterschied ist vermutlich auf die größere konformationelle Flexibilität im N-Terminus der Isomere A und E zurückzuführen, da B, C und D nicht die gleichen Disulfidverbrückungen aufweisen, jedoch allesamt durch die Überlappung der Disulfidbrücken über eine deutlich geringere konformationelle Flexibilität im N-terminalen Trideginsegment verfügen. Eine konformationelle Einschränkung des N-terminalen Trideginteils (AS 1-37) korreliert demnach positiv mit der inhibitorischen Potenz gegenüber FXIIIa. Weiterhin ist bemerkenswert, dass mit Isomer  $\mathbf{D}$  ein zuvor nicht identifiziertes Isomer eine ähnliche Potenz wie das aktivste identifizierte Isomer ( $\mathbf{C}$ ) aufwies. Die vergleichsweise geringe Aktivität des an das LAP-Motiv angelehnten Isomers E ist hingegen neben bereits beschriebenen anderen Anhaltspunkten<sup>384,391</sup> ein weiterer Hinweis dafür, dass Tridegin – trotz der ähnlichen Verteilung der Cysteinreste im Peptid – nicht mit dem Thrombininhibitor Hirudin vergleichbar ist. Die Isomerenmischung ABC zeigte im Vergleich zu den einzelnen Isomeren eine höhere inhibitorische Aktivität gegenüber FXIIIa. Dies deutet einerseits auf das potentielle Vorkommen weiterer nicht-identifizierter aktiver Isomere in ABC hin sowie andererseits auf mögliche Interaktionen der Isomere untereinander, die beispielsweise durch Dimeren- oder Multimerenbildung die inhibitorische Wirkung erhöhen. Da frühere Studien ebenfalls auf die höhere Potenz eines Tridegindimers deuten,<sup>384,391,392</sup> wäre es sinnvoll, dieses Phänomen perspektivisch näher zu untersuchen.

Parallel zum synthetisch komplexen Ansatz zur Darstellung dreifach disulfidverbrückter Trideginisomere wurden außerdem drei zweifach disulfidverbrückte Analoga herangezogen, in denen die Disulfidbrücke C19–C25, welche in allen drei Isomeren **A**, **B** und **C** detektiert worden war, durch einen Cystein-Serin-Austausch an den Positionen C19 und C25 eliminiert wurde. Diese Analoga (**A**<sub>[C195, C255]</sub>, **B**<sub>[C195, C255]</sub>, **C**<sub>[C195, C255]</sub> und **ABC**<sub>[C195, C255]</sub>) wurden ebenfalls bezüglich ihrer Faltung, Struktur und inhibitorischen Potenz gegenüber FXIIIa analysiert. Die drei Analoga und die Analogamischung  $ABC_{[C19S, C25S]}$  inhibierten FXIIIa im fluorogenen Assay mit vergleichbaren IC<sub>50</sub>-Werten wie ihre dreifach disulfidverbrückten *Pendants*. Zudem wurde anhand von  $ABC_{[C19S, C25S]}$  gezeigt, dass alle Analoga eine deutlich geringere Hemmwirkung gegenüber TGase 2 haben, was ihre Spezifität unterstreicht. Auch computergestützte Studien bestätigten, dass die C19–C25-Disulfidbrücke nicht essentiell für die strukturelle und funktionelle Integrität des Tridegin ist.

Die vereinfachte Trideginsynthese ermöglichte folglich die Bereitstellung größerer Mengen dieses potenten FXIIIa-Inhibitors, dessen spezifische Wirksamkeit auch in verschiedenen Testungen mit humanem Vollblut bestätigt werden konnte. Künftig können diese Studien auf das Mausmodell ausgeweitet werden, um die inhibitorische Potenz der Trideginanaloga gegenüber FXIIIa *in vivo* zu bestätigen und dadurch perspektivisch eine Leitstruktur für die Entwicklung eines spezifischen FXIIIa-Inhibitors zu etablieren.

Darüber hinaus wurde genomische DNA aus nativem Material des *H. ghilianii* isoliert und sequenziert, um das für Tridegin kodierende Gen zu identifizieren und mit der bis dato verwendeten Aminosäuresequenz zu vergleichen. Durch diese Analyse wurden 62 der 66 Aminosäurepositionen (=94%) bestätigt, darunter sowohl alle postulierten Cysteinreste im N-terminalen Peptidteil (AS 1-37) als auch die drei vermutlich für die Aktivität des Tridegin bedeutsamen Aminosäuren Ile50, Gln52 und Leu62 im C-terminalen Peptidteil (AS 38-66). Die vier Aminosäuren Lys1, Lys2, Arg40 und Glu66 wurden nicht bestätigt, waren aber bislang hinsichtlich der Aufklärung der Strukturwirkungsbeziehungen des Tridegin nicht von expliziter Bedeutung gewesen. Die Identifizierung des für Tridegin kodierenden Gens sowie die Bestätigung des Großteils der zuvor postulierten Trideginsequenz bilden einen wichtigen Baustein für weitere Studien über den FXIIIa-Inhibitor Tridegin.

Perspektivisch ermöglicht außerdem die Sequenzierung des *H. ghilianii*-Genoms – als erste Genomanalyse eines blutsaugenden Egels – die detaillierte Analyse des Genoms und somit die potentielle Identifizierung weiterer pharmakologisch interessanter Wirkstoffe. Aufgrund der bekannten Potenz und Spezifität cysteinreicher Peptide könnte in diesem Zusammenhang hierauf ein Fokus gelegt werden und mittels bekannter Substanzen könnten ähnlich wirkende bzw. ähnlich aufgebaute Peptide detektiert und analysiert werden. Zudem können anhand der ermittelten genomischen Daten phylogenetische Studien durchgeführt werden, die Auskunft über die Evolution und somit den Verwandtschaftsgrad verschiedener Species geben.

Die vorliegende Dissertation liefert somit substantielle Einblicke in Strukturwirkungsbeziehungen der oxidativen Faltung des peptidischen FXIIIa-Inhibitors Tridegin, der basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen als Leitstruktur für die medizinische Anwendung weiterentwickelt werden kann. Zudem ermöglicht die Reduzierung der Synthesekomplexität die Darstellung größerer Mengen an Tridegin, das als Werkzeug in der FXIII-Forschung eingesetzt werden kann. Darüber hinaus wurde durch die Identifizierung des für Tridegin kodierenden Gens im Genom des *H. ghilianii* eine längst überfällige Lücke der Trideginforschung geschlossen. Durch die Genomsequenzierung des *H. ghilianii* wurde außerdem eine breite Basis für phylogenetische Studien sowie für die Suche nach weiteren potenten Wirkstoffen geschaffen.

Die folgende Abbildung fasst den Ertrag dieser Arbeit abschließend optisch zusammen.



Abbildung 6.1: Übersicht der gewonnenen Erkenntnisse (Farbkodierung analog zu Kapitel 5). Zentral ist das aktivste Trideginisomer C abgebildet. Links: dreifach disulfidverbrückte Isomere A-E, geordnet nach ihrer Aktivität gegenüber FXIIIa. Oben rechts: zweifach disulfidverbrückte Analoga  $A_{[C19S, C25S]}$ - $C_{[C19S, C25S]}$ , die in der FXIII-Forschung verwendet und als Wirkstoff weiterentwickelt werden können. Unten rechts: Bestätigung der Trideginsequenz durch die Genomsequenzanalyse des *H. ghilianii*. Die Genomsequenz bildet die Basis für phylogenetische Studien sowie für die Suche nach weiteren potenten Wirkstoffen.

# Literaturverzeichnis

- R. F. Mould. Thomas Edison (1847-1931). Biography with special reference to X-rays. NOWOTWORY Journal of Oncology 2016, 66, 499–507.
- [2] I. S. Whitaker, J. Rao, D. Izadi, P. E. Butler. Historical article: Hirudo medicinalis: Ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2004, 42, 133–137.
- [3] F. de Filippi. Sopra un nuovo genere (Haementeria) di anellidi della famiglia delle sanguisughe - Observazioni. Memorie della Reale Accademia delle Scienze di Torino 1848, 391–404.
- [4] R. T. Sawyer. Domestication of the world's largest leech for developmental neurobiology. Yearbook of the American Philosophical Society 1978, 212–213.
- [5] A. Z. Budzynski. Interaction of hementin with fibrinogen and fibrin. Blood Coagulation and Fibrinolysis 1991, 2, 149–152.
- [6] S. Finney, L. Seale, R. T. Sawyer, R. B. Wallis. Tridegin, a new peptidic inhibitor of factor XIIIa, from the blood-sucking leech Haementeria ghilianii. *The Biochemical Journal* 1997, 324, 797–805.
- [7] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VHC, 2002.
- [8] E. Oh, A. H. Becker, A. Sandikci, D. Huber, R. Chaba, F. Gloge, R. J. Nichols, A. Typas, C. A. Gross, G. Kramer, J. S. Weissman, B. Bukau. Selective ribosome profiling reveals the cotranslational chaperone action of trigger factor in vivo. *Cell* 2011, 147, 1295–1308.
- [9] A. Hoffmann, A. H. Becker, B. Zachmann-Brand, E. Deuerling, B. Bukau, G. Kramer. Concerted Action of the Ribosome and the Associated Chaperone Trigger Factor Confines Nascent Polypeptide Folding. *Molecular Cell* 2012, 48, 63–74.

- [10] A. Mashaghi, G. Kramer, P. Bechtluft, B. Zachmann-Brand, A. J. Driessen, B. Bukau, S. J. Tans. Reshaping of the conformational search of a protein by the chaperone trigger factor. *Nature* **2013**, 500, 98–101.
- [11] A. Sandikci, F. Gloge, M. Martinez, M. P. Mayer, R. Wade, B. Bukau, G. Kramer. Dynamic enzyme docking to the ribosome coordinates N-terminal processing with polypeptide folding. *Nature Structural and Molecular Biology* **2013**, 20, 843–850.
- [12] K. Döring, N. Ahmed, T. Riemer, H. G. Suresh, Y. Vainshtein, M. Habich, J. Riemer, M. P. Mayer, E. P. O'Brien, G. Kramer, B. Bukau. Profiling Ssb-Nascent Chain Interactions Reveals Principles of Hsp70-Assisted Folding. *Cell* **2017**, *170*, 298–311.
- [13] G. Kramer, A. Shiber, B. Bukau. Mechanisms of Cotranslational Maturation of Newly Synthesized Proteins. Annual Review of Biochemistry 2019, 88, 337–364.
- [14] K. Kojer, J. Riemer. Balancing oxidative protein folding: The influences of reducing pathways on disulfide bond formation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014, 1844, 1383–1390.
- [15] J. Y. Chang. Diverse pathways of oxidative folding of disulfide proteins: Underlying causes and folding models. *Biochemistry* 2011, 50, 3414–3431.
- [16] O. B. Ptitsyn. Stages in the mechanism of self-organization of protein molecules. Doklady Akademii Nauk SSSR 1973, 210, 1213–1215.
- [17] O. B. Ptitsyn. How does protein synthesis give rise to the 3D-structure? *FEBS Letters* 1991, 285, 176–181.
- [18] K. A. Dill, S. Bromberg, K. Yue, H. S. Chan, K. M. Fiebig, D. P. Yee, P. D. Thomas. Principles of protein folding – A perspective from simple exact models. *Protein Science* 1995, 4, 561–602.
- [19] O. B. Ptitsyn. How molten is the molten globule? Nature Structural Biology 1996, 3, 488–490.
- [20] A. R. Fersht. Nucleation mechanisms in protein folding. Current Opinion in Structural Biology 1997, 7, 3–9.
- [21] J.-Y. Chang. Distinct Folding Pathways of Two Homologous Disulfide Proteins: Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor and Tick Anticoagulant Peptide. Antioxidants & Redox Signaling 2011, 14, 127–135.

- [22] J. Y. Chang. Structural Heterogeneity of 6 M GdmCl-Denatured Proteins: Implications for the Mechanism of Protein Folding. *Biochemistry* 2009, 48, 9340–9346.
- [23] P. J. M. Folkers, G. M. Clore, P. C. Driscoll, J. Dodt, S. Köhler, A. M. Gronenborn. Solution Structure of Recombinant Hirudin and the Lys-47 → Glu Mutant: A Nuclear Magnetic Resonance and Hybrid Distance Geometry-Dynamical Simulated Annealing Study. *Biochemistry* 1989, 28, 2601–2617.
- [24] R. St. Charles, K. Padmanabhan, R. V. Arni, K. P. Padmanabhan, A. Tulinsky. Structure of tick anticoagulant peptide at 1.6 Å resolution complexed with bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Protein Science* 2000, 9, 265–272.
- [25] C. E. Correnti, M. M. Gewe, C. Mehlin, A. D. Bandaranayake, W. A. Johnsen, P. B. Rupert, M. Y. Brusniak, M. Clarke, S. E. Burke, W. De Van Der Schueren, K. Pilat, S. M. Turnbaugh, D. May, A. Watson, M. K. Chan, C. D. Bahl, J. M. Olson, R. K. Strong. Screening, large-scale production and structure-based classification of cystine-dense peptides. *Nature Structural and Molecular Biology* **2018**, *25*, 270–278.
- [26] K. B. Akondi, M. Muttenthaler, S. Dutertre, Q. Kaas, D. J. Craik, R. J. Lewis, P. F. Alewood. Discovery, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Conotoxins. *Chemical Reviews* 2014, 114, 5815–5847.
- [27] M. Sanford. Intrathecal ziconotide: A review of its use in patients with chronic pain refractory to other systemic or intrathecal analgesics. CNS Drugs 2013, 27, 989–1002.
- [28] A. A. Tietze, D. Tietze, O. Ohlenschläger, E. Leipold, F. Ullrich, T. Kühl, A. Mischo, G. Buntkowsky, M. Görlach, S. H. Heinemann, D. Imhof. Structurally Diverse μ-Conotoxin PIIIA Isomers Block Sodium Channel NaV1.4. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 4058–4061.
- [29] P. Heimer, A. A. Tietze, C. A. Bäuml, A. Resemann, F. J. Mayer, D. Suckau, O. Ohlenschläger, D. Tietze, D. Imhof. Conformational μ-Conotoxin PIIIA Isomers Revisited: Impact of Cysteine Pairing on Disulfide-Bond Assignment and Structure Elucidation. Analytical Chemistry 2018, 90, 3321–3327.
- [30] A. A. Paul George, P. Heimer, E. Leipold, T. Schmitz, D. Kaufmann, D. Tietze, S. H. Heinemann, D. Imhof. Effect of conformational diversity on the bioactivity of µ-conotoxin PIIIA disulfide isomers. *Marine Drugs* **2019**, *17*, 1–18.

- [31] A. A. Paul George, P. Heimer, A. Maa
  ß, J. Hamaekers, M. Hofmann-Apitius, A. Biswas, D. Imhof. Insights into the Folding of Disulfide-Rich μ-Conotoxins. ACS Omega 2018, 3, 12330–12340.
- [32] U. Rester, W. Bode, C. A. M. Sampaio, E. A. Auerswald, A. P. Y. Lopes. Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the antistasintype inhibitor ghilanten (domain I) from Haementeria ghilianii in complex with porcine β-trypsin. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 2001, D57, 1038–1041.
- [33] A. M. Krezel, G. Wagner, J. Seymour-Ulmer, R. A. Lazarus. Structure of the RGD protein decorsin: Conserved motif and distinct function in leech proteins that affect blood clotting. *Science* 1994, 264, 1944–1947.
- [34] J. L. Richardson, B. Kröge, W. Hoeffken, J. E. Sadler, P. Pereira, R. Huber, W. Bode, P. Fuentes-Prior. Crystal structure of the human alpha-thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor. *The EMBO Journal* 2000, 19, 5650–5660.
- [35] F. Markwardt. Untersuchungen über Hirudin. Die Naturwissenschaften 1955, 42, 537–538.
- [36] F. Markwardt. Hirudin As Alternative Anticoagulant A Historical Review. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2002, 28, 405–414.
- [37] D. D. Callas, D. Hoppensteadt, J. Fareed. Comparative Studies on the Anticoagulant and Protease Generation Inhibitory Actions of Newly Developed Site-Directed Thrombin Inhibitor Drugs. Efegatran, & Argatroban, Hirulog, and Hirudin. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 1995, 21, 177–183.
- [38] A.-C. Teger-Nilsson, R. Bylund, D. Gustafsson, E. Gyzander, U. Eriksson. In vitro effects of Inogatran, a selective low molecular weight thrombin inhibitor. *Thrombosis Research* 1997, 85, 133–145.
- [39] A. Greinacher, T. E. Warkentin. The direct thrombin inhibitor hirudin. Thrombosis and Haemostasis 2008, 99, 819–829.
- [40] K. A. Arsenault, J. Hirsh, R. P. Whitlock, J. W. Eikelboom. Direct thrombin inhibitors in cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology* 2012, 9, 402–414.
- [41] J. M. Hyson. Leech therapy: a history. Journal of the History of Dentistry 2005, 53, 25–27.

- [42] E. P. Cherniack. Bugs as drugs, part two: worms, leeches, scorpions, snails, ticks, centipedes, and spiders. *Alternative Medicine Review* 2011, 16, 50–58.
- [43] C. Dunwiddie, N. A. Thornberry, H. G. Bull, M. Sardana, P. A. Friedman, J. W. Jacobs, E. Simpson. Antistasin, a leech-derived inhibitor of factor Xa. Kinetic analysis of enzyme inhibition and identification of the reactive site. *The Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 16694–16699.
- [44] H. I. Jung, S. I. Kim, K.-S. Ha, C. O. Joe, K. W. Kang. Isolation and characterization of guamerin, a new human leukocyte elastase inhibitor from Hirudo nipponia. *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270, 13879–13884.
- [45] H. Kim, T. T. T. Chu, D. Y. Kim, D. R. Kim, C. M. T. Nguyen, J. Choi, J. R. Lee, M. J. Hahn, K. K. Kim. The Crystal Structure of Guamerin in Complex with Chymotrypsin and the Development of an Elastase-specific Inhibitor. *Journal of Molecular Biology* 2008, 376, 184–192.
- [46] C. T. Dunwiddie, L. Waxman, G. P. Vlasuk, P. A. Friedman. Purification and Characterization of Inhibitors of Blood Coagulation Factor Xa from Hematophagous Organisms. *Methods in Enzymology* **1993**, 223, 291–312.
- [47] C. Söllner, R. Mentele, C. Eckerskorn, H. Fritz, C. P. Sommerhoff. Isolation and characterization of hirustasin, an antistasin-type serine-proteinase inhibitor from the medical leech Hirudo medicinalis. *European Journal of Biochemistry* 1994, 219, 937–943.
- [48] D. R. Kim, K. W. Kang. Amino acid sequence of piguamerin, an antistasin-type protease inhibitor from the blood sucking leech Hirudo nipponia. *European Journal* of Biochemistry 1998, 254, 692–697.
- [49] V. Chopin, M. Salzet, J.-L. Baert, F. Vandenbulcke, P.-E. Sautière, J.-P. Kerckaert, J. Malecha. Therostasin, a novel clotting factor Xa inhibitor from the rhynchobdellid leech, Theromyzon tessulatum. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275, 32701–32707.
- [50] R. Kornowski, A. Eldor, M. M. Werber, N. Ezov, E. Zwang, A. Nimrod, A. Chernine, A. Finkelstein, A. Panet, S. Laniado, G. Keren. Enhancement of recombinant tissuetype plasminogen activator thrombolysis with a selective factor Xa inhibitor derived from the leech Hirudo medicinalis: comparison with heparin and hirudin in a rabbit thrombosis model. *Coronary Artery Disease* **1996**, *7*, 903–909.

- [51] A. Electricwala, R. Hartwell, M. D. Scawen, T. Atkinson. The complete amino acid sequence of a hirudin variant from the leech Hirudinaria manillensis. *Journal of Protein Chemistry* 1993, 12, 365–370.
- [52] J. Dodt, H.-P. Müller, U. Seemüller, J.-Y. Chang. The complete amino acid sequence of hirudin, a thrombin specific inhibitor. Application of colour carboxymethylation. *FEBS Letters* 1984, 165, 180–184.
- [53] J. L. Krstenansky, T. J. Owen, M. T. Yates, S. J. T. Mao. The C-terminal binding domain of hirullin P18: Antithrombin activity and comparison to hirudin peptides. *FEBS Letters* 1990, 269, 425–429.
- [54] P. Mazur, W. J. Henzel, J. L. Seymour, R. A. Lazarus. Ornatins: potent glycoprotein IIb-IIIa antagonists and platelet aggregation inhibitors from the leech Placobdella ornata. *European Journal of Biochemistry* 1991, 202, 1073–1082.
- [55] E. Fink, H. Rehm, C. Gippner, W. Bode, M. Eulitz, W. Machleidt, H. Fritz. The Primary Structure of Bdellin B-3 from the Leech Hirudo medicinalis. *Biological Chemistry* 1986, 367, 1235–1242.
- [56] F.-J. Roters, E. Zebe. Protease inhibitors in the alimentary tract of the medicinal leech Hirudo medicinalis: In vivo and in vitro studies. *Journal of Comparative Physiology* B 1992, 162, 85–92.
- [57] S. J. Hong, K. W. Kang. Purification of granulin-like polypeptide from the bloodsucking leech, Hirudo nipponia. *Protein Expression and Purification* **1999**, *16*, 340– 346.
- [58] D. Reverter, J. Vendrell, F. Canals, J. Horstmann, F. X. Avilés, H. Fritz, C. P. Sommerhoff. A carboxypeptidase inhibitor from the medical leech Hirudo medicinalis: Isolation, sequence analysis, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. *The Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 32927–32933.
- [59] J. L. Arolas, V. Castillo, S. Bronsoms, F. X. Avilés, S. Ventura. Designing Out Disulfide Bonds of Leech Carboxypeptidase Inhibitor: Implications for Its Folding, Stability and Function. *Journal of Molecular Biology* **2009**, *392*, 529–546.
- [60] T. C. White, M. A. Berny, D. K. Robinson, H. Yin, W. F. DeGrado, S. R. Hanson, O. J. T. McCarty. The leech product saratin is a potent inhibitor of platelet integrin α2β1 and von Willebrand factor binding to collagen. *FEBS Journal* 2007, 274, 1481–1491.

- [61] W. Gronwald, J. Bomke, T. Maurer, B. Domogalla, F. Huber, F. Schumann, W. Kremer, F. Fink, T. Rysiok, M. Frech, H. R. Kalbitzer. Structure of the Leech Protein Saratin and Characterization of Its Binding to Collagen. *Journal of Molecular Biology* 2008, 381, 913–927.
- [62] M. Salzet, V. Chopin, J.-L. Baert, I. Matias, J. Malecha. Theromin, a novel leech thrombin inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275, 30774–30780.
- [63] World Health Organization. Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region. 2000-2016. Genf 2018.
- [64] Statistisches Bundesamt (Destatis). Todesursachen nach Krankheitsarten 2017. Wiesbaden 2019, https://www.destatis.de.
- [65] A. S. Wolberg. Fibrinogen and factor XIII: newly recognized roles in venous thrombus formation and composition. *Current Opinion in Hematology* 2018, 25, 358–364.
- [66] A. J. Gale. Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis. *Toxicologic Pathology* 2011, 39, 273–280.
- [67] M. Hoffman, D. M. Monroe III. A cell-based model of hemostasis. Thrombosis and Haemostasis 2001, 85, 958–965.
- [68] D. D. Monkovic, P. B. Tracy. Activation of Human Factor V by Factor Xa and Thrombin. *Biochemistry* 1990, 29, 1118–1128.
- [69] G. M. Rodgers, J. Cong, D. E. Goll, W. H. Kane. Activation of coagulation Factor V by calcium-dependent proteinase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1987, 929, 263–270.
- [70] D. H. Allen, P. B. Tracy. Human Coagulation Factor V Is Activated to the Functional Cofactor by Elastase and Cathepsin G Expressed at the Monocyte Surface. *Journal* of Biological Chemistry 1995, 270, 1408–1415.
- [71] D. M. Monroe III, M. Hoffman, H. R. Roberts. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. *Blood coagulation & Fibrinolysis* 1996, 7, 459–464.
- [72] M. Díaz-Ricart, E. Estebanell, M. Lozano, J. Aznar-Salatti, J. G. White, A. Ordinas, G. Escolar. Thrombin facilitates primary platelet adhesion onto vascular surfaces in the absence of plasma adhesive proteins: studies under flow conditions. *Haematologica* 2000, 85, 280–288.

- [73] D. T. Hung, T.-K. H. Vu, V. I. Wheaton, K. Ishii, S. R. Coughlin. Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation. *Journal of Clinical Investigation* **1992**, *89*, 1350–1353.
- [74] D. D. Monkovic, P. B. Tracy. Functional Characterization of Human Platelet-released Factor V and Its Activation by Factor Xa and Thrombin. *The Journal of Biological Chemistry* 1990, 28, 17132–17140.
- [75] M. B. Hultin. Modulation of Thrombin-Mediated Activation of FVIII:C by Calcium Ions, Phospholipid, and Platelets. *Blood* 1985, 66, 53–58.
- [76] K. Madlener, B. Pötzsch. Hämostasesystem. Hämostaseologie Grundlagen, Diagnostik und Therapie 2010, 2. Auflage, Springer Berlin Heidelberg, 8–12.
- [77] W. Schößler. Phospholipide und phospholipidbindende Proteine. Hämostaseologie -Grundlagen, Diagnostik und Therapie 2010, 2. Auflage, Springer Berlin Heidelberg, 237–244.
- [78] R. Rawala-Sheikh, S. S. Ahmad, D. M. Monroe III, H. R. Roberts, P. N. Walsh. Structural requirements for Factor IXa binding to platelets. *FASEB Journal* 1990, 4, A2276.
- [79] G. Cirino, C. Cicala, M. Bucci, L. Sorrentino, G. Ambrosini, G. DeDominicis, D. C. Altieri. Factor Xa as an interface between coagulation and inflammation: Molecular mimicry of factor Xa association with effector cell protease receptor-1 induces acute inflammation in vivo. *Journal of Clinical Investigation* **1997**, *99*, 2446–2451.
- [80] J. S. Greengard, M. J. Heeb, E. Ersdal, P. N. Walsh, J. H. Griffin. Binding of Coagulation Factor XI to Washed Human Platelets. *Biochemistry* 1986, 25, 3884– 3890.
- [81] J. A. Oliver, D. M. Monroe III, H. R. Roberts, M. Hoffman. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 1999, 19, 170–177.
- [82] S. R. Fraser, N. A. Booth, N. J. Mutch. The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through α2-antiplasmin cross-linking. *Blood* 2011, 117, 6371–6374.
- [83] S. L. Carpenter, P. Mathew. α2-antiplasmin and its deficiency: Fibrinolysis out of balance. *Haemophilia* 2008, 14, 1250–1254.

- [84] J. M. Forrester. Malpighi's De Polypo Cordis : An Annotated Translation. Medical History 1995, 39, 477–492.
- [85] J. W. Weisel. 350th Anniversary of the Discovery of Fibrin (1666-2016) History of Fibrin(ogen). XXIVth International Fibrinogen Workshop 2016, Nombolo Mdhluli Conference Centre, South Africa.
- [86] M. Pieters, A. S. Wolberg. Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis 2019, 3, 161–172.
- [87] J. W. Weisel, R. I. Litvinov. Fibrin Formation, Structure and Properties. Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms 2017, 82, Springer International Publishing, 405–456.
- [88] D. W. Chung, M. W. Rixon, B. G. Que, E. W. Davie. Cloning of fibrinogen genes and their cDNA. Annals of the New York Academy of Sciences 1983, 408, 449–456.
- [89] D. W. Chung, J. E. Harris, E. W. Davie. Nucleotide sequences of the three genes coding for human fibrinogen. Advances in Experimental Medicine and Biology 1990, 281, 39–48.
- [90] Y. Takeda. Studies of the metabolism and distribution of fibrinogen in healthy men with autologous 125-I-labeled fibrinogen. The Journal of Clinical Investigation 1966, 45, 103–111.
- [91] J.-Z. Zhang, C. Redman. Fibrinogen Assembly and Secretion. Role of Intrachain Disulfide Loops. *Journal of Biological Chemistry* 1996, 271, 30083–30088.
- [92] J. R. Byrnes, C. Wilson, A. M. Boutelle, C. B. Brandner, M. J. Flick, H. Philippou, A. S. Wolberg. The interaction between fibrinogen and zymogen FXIII-A2B2 is mediated by fibrinogen residues γ390-396 and the FXIII-B subunits. *Blood* 2016, 128, 1969–1979.
- [93] A. Henschen, J. McDonagh. Fibrinogen, fibrin and factor XIII. Blood Coagulation 1986, Elsevier Science Amsterdam, 171–241.
- [94] R. F. Doolittle. Fibrinogen and Fibrin. Annual Review of Biochemistry 1984, 53, 195–229.
- [95] J. M. Kollman, L. Pandi, M. R. Sawaya, M. Riley, R. F. Doolittle. Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry* 2009, 48, 3877–3886.

- [96] V. C. Yee, K. P. Pratt, H. C. F. Côté, I. Le Trong, D. W. Chung, E. W. Davie, R. E. Stenkamp, D. C. Teller. Crystal structure of a 30 kDa C-terminal fragment from the  $\gamma$  chain of human fibrinogen. *Structure* **1997**, *5*, 125–138.
- [97] G. Spraggon, S. J. Everse, R. F. Doollttle. Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature* 1997, 389, 455–462.
- [98] G. Spraggon, D. Applegate, S. J. Everse, J.-Z. Zhang, L. Veerapandian, C. Redman, R. F. Doolittle, G. Grieninger. Crystal structure of a recombinant αEC domain from human fibrinogen-420. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) 1998, 95, 9099–9104.
- [99] J. H. Brown, N. Volkmann, G. Jun, A. H. Henschen-Edman, C. Cohen. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 2000, 97, 85–90.
- [100] Z. Yang, J. M. Kollman, L. Pandi, R. F. Doolittle. Crystal structure of native chicken fibrinogen at 2.7 Å resolution. *Biochemistry* 2001, 40, 12515–12523.
- [101] V. Nussenzweig, M. Seligmann, J. Pelmont, P. Grabar. Les produits de dégradation du fibrinogène humain par la plasmine. I. - Séparation et propriétés physico-chimiques. Annales de l'Institut Pasteur 1961, 100, 377–389.
- [102] A. Zhmurov, A. E. X. Brown, R. I. Litvinov, R. I. Dima, J. W. Weisel, V. Barsegov. Mechanism of fibrin(ogen) forced unfolding. *Structure* **2011**, *19*, 1615–1624.
- [103] Y. I. Veklich, O. V. Gorkunzs, L. V. Medved, W. Nieuwenhuizen, J. W. Weisel. Carboxyl-terminal Portions of the α Chains of Fibrinogen and Fibrin: Localization by Electron Microscopy and the Effects of Isolated αC Fragments on Polymerization. The Journal of Biological Chemistry 1993, 268, 13577–13585.
- [104] A. D. Protopopova, N. A. Barinov, E. G. Zavyalova, A. M. Kopylov, V. I. Sergienko, D. V. Klinov. Visualization of fibrinogen αC regions and their arrangement during fibrin network formation by high-resolution AFM. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2015, 13, 570–579.
- [105] S. J. Everse, G. Spraggon, L. Veerapandian, M. Riley, R. F. Doolittle. Crystal Structure of Fragment Double-D from Human Fibrin with Two Different Bound Ligands. *Biochemistry* 1998, 37, 8637–8642.

- [106] S. J. Everse, G. Spraggon, L. Veerapandian, R. F. Doolittle. Conformational Changes in Fragments D and Double-D from Human Fibrin(ogen) upon Binding the Peptide Ligand Gly-His-Arg-Pro-Amide. *Biochemistry* 1999, 38, 2941–2946.
- [107] B. Ly, H. C. Godal. Denaturation of fibrinogen, the protective effect of calcium. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis 1972, 1, 204–209.
- [108] T. M. Odrljin, B. J. Rybarczyk, C. W. Francis, S. O. Lawrence, M. Hamaguchi, P. J. Simpson-Haidaris. Calcium modulates plasmin cleavage of the fibrinogen D fragment  $\gamma$  chain N-terminus: mapping of monoclonal antibody J88B to a plasmin sensitive domain of the  $\gamma$  chain. *Biochimica et Biophysica Acta* **1996**, 69–77.
- [109] S. O. Brennan, R. L. Davis, M. W. Mosesson, I. Hernandez, R. Lowen, S. J. Alexander. Congenital hypodysfibrinogenaemia (Fibrinogen Des Moines) due to a γ320Asp deletion at the Ca<sup>2+</sup> binding site. *Thrombosis and Haemostasis* **2007**, *98*, 467–469.
- [110] M. S. Kostelansky, K. C. Lounes, L. F. Ping, S. K. Dickerson, O. V. Gorkun, S. T. Lord. Calcium-Binding Site β2, Adjacent to the "b" Polymerization Site, Modulates Lateral Aggregation of Protofibrils during Fibrin Polymerization. *Biochemistry* 2004, 43, 2475–2483.
- [111] R. F. Doolittle, L. Pandi. Binding of Synthetic B Knobs to Fibrinogen Changes the Character of Fibrin and Inhibits Its Ability to Activate Tissue Plasminogen Activator and Its Destruction by Plasmin. *Biochemistry* 2006, 45, 2657–2667.
- [112] J. Martinez, P. M. Keane, P. B. Gilman, J. E. Palascak. The abnormal carbohydrate composition of the dysfibrinogenemia associated with liver disease. Annals of the New York Academy of Sciences 1983, 408, 388–396.
- [113] B. G. Langer, J. W. Weisel, P. A. Dinauer, C. Nagaswami, W. R. Bell. Deglycosylation of fibrinogen accelerates polymerization and increases lateral aggregation of fibrin fibers. *The Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263*, 15056–15063.
- [114] C. V. Dang, C. K. Shin, W. R. Bell, C. Nagaswami, J. W. Weisel. Fibrinogen sialic acid residues are low affinity calcium-binding sites that influence fibrin assembly. *The Journal of Biological Chemistry* 1989, 264, 15104–15108.
- [115] S. O. Brennan. Variation of fibrinogen oligosaccharide structure in the acute phase response: Possible haemorrhagic implications. BBA Clinical 2015, 3, 221–226.

- [116] A. Zhmurov, A. D. Protopopova, R. I. Litvinov, P. Zhukov, J. W. Weisel, V. Barsegov. Atomic Structural Models of Fibrin Oligomers. *Structure* 2018, *26*, 857–868.
- [117] B. Blomback, B. Hessel, D. Hogg, L. Therkildsen. A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. *Nature* 1978, 275, 501–505.
- [118] A. C. Brown, S. R. Baker, A. M. Douglas, M. Keating, M. B. Alvarez-Elizondo, E. L. Botvinick, M. Guthold, T. H. Barker. Molecular interference of fibrin's divalent polymerization mechanism enables modulation of multiscale material properties. *Biomaterials* 2015, 49, 27–36.
- [119] G. Tsurupa, A. Mahid, Y. Veklich, J. W. Weisel, L. Medved. Structure, Stability, and Interaction of Fibrin αC-Domain Polymers. *Biochemistry* 2011, 50, 8028–8037.
- [120] G. Tsurupa, I. Pechik, R. I. Litvinov, R. R. Hantgan, N. Tjandra, J. W. Weisel, L. Medved. On the Mechanism of αC Polymer Formation in Fibrin. *Biochemistry* 2012, 51, 2526–2538.
- [121] J.-P. Collet, J. L. Moen, Y. I. Veklich, O. V. Gorkun, S. T. Lord, G. Montalescot, J. W. Weisel. The αC domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis. *Blood* **2005**, *106*, 3824–3830.
- [122] M. W. Mosesson, J. P. DiOrio, K. R. Siebenlist, J. S. Wall, J. F. Hainfeld. Evidence for a second type of fibril branch point in fibrin polymer networks, the trimolecular junction. *Blood* **1993**, *82*, 1517–1521.
- [123] A. L. Fogelson, J. P. Keener. Toward an understanding of fibrin branching structure. Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics 2010, 81, 1–9.
- [124] E. A. Ryan, L. F. Mockros, J. W. Weisel, L. Lóránd. Structural Origins of Fibrin Clot Rheology. *Biophysical Journal* 1999, 77, 2813–2826.
- [125] J. R. Byrnes, A. S. Wolberg. Newly-Recognized Roles of Factor XIII in Thrombosis. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2016, 42, 445–454.
- [126] M. A. Rosenfeld, V. B. Leonova, A. N. Shchegolikhin, A. V. Bychkova, E. A. Kostanova, M. I. Biryukova. Covalent structure of single-stranded fibrin oligomers cross-linked by FXIIIa. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015, 461, 408– 412.

- [127] Y. V. Matsuka, L. V. Medved, M. M. Migliorini, K. C. Ingham. Factor XIIIA-Catalyzed Cross-Linking of Recombinant αC Fragments of Human Fibrinogen. *Biochemistry* **1996**, 35, 5810–5816.
- [128] K. F. Standeven, A. M. Carter, P. J. Grant, J. W. Weisel, I. Chernysh, L. Masova, S. T. Lord, R. A. Ariëns. Functional analysis of fibrin γ-chain cross-linking by activated factor XIII: Determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness. Blood 2007, 110, 902–907.
- [129] I. N. Chernysh, C. Nagaswami, P. K. Purohit, J. W. Weisel. Fibrin clots are equilibrium polymers that can be remodeled without proteolytic digestion. *Scientific Reports* 2012, 2, 879.
- [130] K. Laki, L. Lóránd. On the solubility of fibrin clots. Science 1948, 108, 280.
- [131] L. Lóránd. A study on the solubility of fibrin clots in urea. *Hungarica Acta Physiologica* 1948, 1, 192–196.
- [132] L. Lóránd. Factor XIII and the clotting of fibrinogen: from basic research to medicine. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2005, 3, 1337–1348.
- [133] L. Lóránd, K. Konishi. Activation of the fibrin stabilizing factor of plasma by thrombin. Archives of Biochemistry and Biophysics 1964, 105, 58–67.
- [134] K. Konishi, L. Lóránd. Separation of activated fibrin-stabilizing factor from thrombin. Biochimica et Biophysica Acta 1966, 121, 177–180.
- [135] L. C. Pedersen, V. C. Yee, P. D. Bishop, I. Le Trong, D. C. Teller, R. E. Stenkamp. Transglutaminase factor XIII uses proteinase-like catalytic triad to crosslink macromolecules. *Protein Science* 1994, *3*, 1131–1135.
- [136] M. Griffin, R. Casadio, C. M. Bergamini. Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochemical Journal* 2002, 396, 377–396.
- [137] M. Stieler, J. Weber, M. Hils, P. Kolb, A. Heine, C. Büchold, R. Pasternack, G. Klebe. Structure of Active Coagulation Factor XIII Triggered by Calcium Binding: Basis for the Design of Next-Generation Anticoagulants. *Angewandte Chemie International Edition* 2013, 52, 11930–11934.
- [138] H. Thomas, K. Beck, M. Adamczyk, P. Aeschlimann, M. Langley, R. C. Oita, L. Thiebach, M. Hils, D. Aeschlimann. Transglutaminase 6: A protein associated

with central nervous system development and motor function. Amino Acids 2013, 44, 161–177.

- [139] R. L. Eckert, M. T. Kaartinen, M. Nurminskaya, A. M. Belkin, G. Colak, G. V. Johnson, K. Mehta. Transglutaminase regulation of cell function. *Physiological Reviews* 2014, 94, 383–417.
- [140] L. Lóránd, R. M. Graham. Transglutaminases: Crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003, 4, 140–156.
- [141] M. Siegel, P. Strnad, R. E. Watts, K. Choi, B. Jabri, M. B. Omary, C. Khosla. Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury. *PLoS One* 2008, *3*, e1861.
- [142] J. Stamnaes, D. M. Pinkas, B. Fleckenstein, C. Khosla, L. M. Sollid. Redox regulation of transglutaminase 2 activity. *Journal of Biological Chemistry* 2010, 285, 25402– 25409.
- [143] C. Klöck, C. Khosla. Regulation of the activities of the mammalian transglutaminase family of enzymes. *Protein Science* 2012, 21, 1781–1791.
- [144] L. Muszbek, Z. Bereczky, Z. Bagoly, I. Komáromi, É. Katona. Factor XIII: A Coagulation Factor With Multiple Plasmatic and Cellular Functions. *Physiological Reviews* 2011, 91, 931–972.
- [145] L. Muszbek, G. Haramura, J. Polgár. Transformation of Cellular Factor XIII into an Active Zymogen Transglutaminase in Thrombin-Stimulated Platelets. *Thrombosis* and Haemostasis 1995, 73, 702–705.
- [146] S. A. Piercy-Kotb, A. Mousa, H. F. Al-Jallad, V. D. Myneni, F. Chicatun, S. N. Nazhat, M. T. Kaartinen. Factor XIIIA transglutaminase expression and secretion by osteoblasts is regulated by extracellular matrix collagen and the MAP kinase signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology* 2012, 227, 2936–2946.
- [147] B. A. Anokhin, W. L. Dean, K. A. Smith, M. J. Flick, R. A. S. Ariëns, H. Philippou, M. C. Maurer. Proteolytic and nonproteolytic activation mechanisms result in conformationally and functionally different forms of coagulation factor XIII A. *The FEBS Journal* 2019, 287, 452–464.
- [148] B. A. Anokhin, V. Stribinskis, W. L. Dean, M. C. Maurer. Activation of factor XIII is accompanied by a change in oligomerization state. *The FEBS Journal* 2017, 284, 3849–3861.

- [149] J. A. Nagy, P. Henriksson, J. McDonagh. Biosynthesis of factor XIII B subunit by human hepatoma cell lines. *Blood* 1986, 68, 1272–1279.
- [150] J. L. Mitchell, N. J. Mutch. Let's cross-link: diverse functions of the promiscuous cellular transglutaminase factor XIII-A. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2019, 17, 19–30.
- [151] H. Kaetsu, T. Hashiguchi, D. Foster, A. Ichinose. Expression and release of the a and b subunits for human coagulation factor XIII in baby hamster kidney (BHK) cells. *Journal of Biochemistry* 1996, 119, 961–969.
- [152] M.-C. Poon, J. A. Russell, S. Low, G. D. Sinclair, A. R. Jones, W. Blahey, B. A. Ruether, D. I. Hoar. Hemopoietic Origin of Factor XIII A Subunits in Platelets, Monocytes, and Plasma: Evidence from Bone Marrow Transplantation Studies. *The Journal of Clinical Investigation* **1989**, *84*, 787–792.
- [153] A. Inbal, L. Muszbek, A. Lubetsky, É. Katona, I. Levi, L. Kárpáti, A. Nagler. Platelets but not monocytes contribute to the plasma levels of factor XIII subunit A in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Blood Coagulation* and Fibrinolysis 2004, 15, 249–253.
- [154] P. A. Cordell, B. T. Kile, K. F. Standeven, E. C. Josefsson, R. J. Pease, P. J. Grant. Association of coagulation factor XIII-A with Golgi proteins within monocytemacrophages: implications for subcellular trafficking and secretion. *Blood* 2010, 115, 2674–2681.
- [155] K. Griffin, K. Simpson, C. Beckers, J. Brown, J. Vacher, W. Ouwehand, W. Alexander, R. Pease, P. J. Grant. Use of a novel floxed mouse to characterise the cellular source of plasma coagulation FXIII-A. *The Lancet* **2015**, *385*, S39.
- [156] C. M. Beckers, K. R. Simpson, K. J. Griffin, J. M. Brown, L. T. Cheah, K. A. Smith, J. Vacher, P. A. Cordell, M. T. Kearney, P. J. Grant, R. J. Pease. Cre/lox Studies Identify Resident Macrophages as the Major Source of Circulating Coagulation Factor XIII-A. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2017, 37, 1494–1502.
- [157] S. Singh, J. Dodt, P. Volkers, E. Hethershaw, H. Philippou, V. Ivaskevicius, D. Imhof, J. Oldenburg, A. Biswas. Structure functional insights into calcium binding during the activation of coagulation factor XIII A. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 11324.
- [158] V. C. Yee, L. C. Pedersen, I. Le Trong, P. D. Bishop, R. E. Stenkamp, D. C. Teller. Three-dimensional structure of a transglutaminase: Human blood coagulation factor

XIII. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) **1994**, *91*, 7296–7300.

- [159] E. L. Hethershaw, P. J. Adamson, K. A. Smith, W. N. Goldsberry, R. J. Pease, S. E. Radford, P. J. Grant, R. A. S. Ariëns, M. C. Maurer, H. Philippou. The role of β-barrels 1 and 2 in the enzymatic activity of factor XIII A-subunit. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2018**, *16*, 1391–1401.
- [160] É. Katona, K. Pénzes, A. Csapó, F. Fazakas, M. L. Udvardy, Z. Bagoly, Z. Z. Orosz,
   L. Muszbek. Interaction of factor XIII subunits. *Blood* 2014, *123*, 1757–1763.
- [161] A. D. Protopopova, A. Ramirez, D. V. Klinov, R. I. Litvinov, J. W. Weisel. Factor XIII topology: organization of B subunits and changes with activation studied with single-molecule atomic force microscopy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2019, 17, 737–748.
- [162] S. I. Chung, M. S. Lewis, J. E. Folk. Relationships of the Catalytic Properties of Human Plasma and Platelet Transglutaminases (Activated Blood Coagulation Factor XIII) to Their Subunit Structures. *The Journal of Biological Chemistry* 1974, 249, 940–950.
- [163] T. J. Hornyak, J. A. Shafer. Role of Calcium Ion in the Generation of Factor XIII Activity. *Biochemistry* 1991, 30, 6175–6182.
- [164] S. Gupta, A. Biswas, M. S. Akhter, C. Krettler, C. Reinhart, J. Dodt, A. Reuter, H. Philippou, V. Ivaskevicius, J. Oldenburg. Revisiting the mechanism of coagulation factor XIII activation and regulation from a structure/functional perspective. *Scientific Reports* 2016, 6, 30105.
- [165] V. Schroeder, H. P. Kohler. New developments in the area of factor XIII. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2013, 11, 234–244.
- [166] M. Souri, T. Osaki, A. Ichinose. The non-catalytic B subunit of coagulation factor XIII accelerates fibrin cross-linking. *Journal of Biological Chemistry* 2015, 290, 12027–12039.
- [167] S. Singh, M. S. Akhter, J. Dodt, A. Sharma, S. Kaniyappan, H. Yadegari, V. Ivaskevicius, J. Oldenburg, A. Biswas. Disruption of structural disulfides of coagulation FXIII-B subunit; functional implications for a rare bleeding disorder. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, 20, 1956.
- [168] S. Singh, M. S. Akhter, J. Dodt, P. Volkers, A. Reuter, C. Reinhart, C. Krettler, J. Oldenburg, A. Biswas. Identification of potential novel interacting partners for coagulation factor XIII B (FXIII-B) subunit, a protein associated with a rare bleeding disorder. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 2682.
- [169] B. Li, R. Billur, M. C. Maurer, H. P. Kohler, P. Raddatz Müller, L. Alberio, V. Schroeder. Proline 36 of the Factor XIII Activation Peptide Plays a Crucial Role in Substrate Recognition and Zymogen Activation. *Thrombosis and Haemostasis* 2018, 118, 2037–2045.
- [170] M. M. Aleman, B. L. Walton, J. R. Byrnes, A. S. Wolberg. Fibrinogen and red blood cells in venous thrombosis. *Thrombosis Research* 2014, 133, S38–S40.
- [171] D. B. Cines, T. Lebedeva, C. Nagaswami, V. Hayes, W. Massefski, R. I. Litvinov, L. Rauova, T. J. Lowery, J. W. Weisel. Clot contraction: Compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood* 2014, 123, 1596–1603.
- [172] V. Tutwiler, A. R. Mukhitov, A. D. Peshkova, G. Le Minh, R. R. Khismatullin, J. Vicksman, C. Nagaswami, R. I. Litvinov, J. W. Weisel. Shape changes of erythrocytes during blood clot contraction and the structure of polyhedrocytes. *Scientific Reports* 2018, 8, 17907.
- [173] A. S. Wolberg, D. M. Monroe, H. R. Roberts, M. Hoffman. Elevated prothrombin results in clots with an altered fiber structure: a possible mechanism of the increased thrombotic risk. *Blood* 2003, 101, 3008–3013.
- [174] A. Janion-Sadowska, J. Natorska, J. Siudut, M. Zabczyk, A. Stanisz, A. Undas. Plasma fibrin clot properties in the G20210A prothrombin mutation carriers following venous thromboembolism: the effect of rivaroxaban. *Thrombosis and Haemostasis* 2017, 117, 1739–1749.
- [175] M. M. Aleman, B. L. Walton, J. R. Byrnes, J.-G. Wang, M. J. Heisler, K. R. Machlus, B. C. Cooley, A. S. Wolberg. Elevated prothrombin promotes venous, but not arterial, thrombosis in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2013, 33, 1829–1836.
- [176] M. M. Aleman, J. R. Byrnes, J.-G. Wang, R. Tran, W. A. Lam, J. Di Paola, N. Mackman, J. L. Degen, M. J. Flick, A. S. Wolberg. Factor XIII activity mediates

red blood cell retention in venous thrombi. *The Journal of Clinical Investigation* **2014**, *124*, 3590–3600.

- [177] S. Kattula, J. R. Byrnes, S. M. Martin, L. A. Holle, B. C. Cooley, M. J. Flick, A. S. Wolberg. Factor XIII in plasma, but not in platelets, mediates red blood cell retention in clots and venous thrombus size in mice. *Blood Advances* 2018, *2*, 25–35.
- [178] J. R. Byrnes, C. Duval, Y. Wang, C. E. Hansen, B. Ahn, M. J. Mooberry, M. A. Clark, J. M. Johnsen, S. T. Lord, W. A. Lam, J. C. Meijers, H. Ni, R. A. Ariëns, A. S. Wolberg. Factor XIIIa-dependent retention of red blood cells in clots is mediated by fibrin α-chain crosslinking. *Blood* **2015**, *126*, 1940–1948.
- [179] M. Hanna. Congenital deficiency of FXIII: Report of a family from Newfoundland with associated mild deficiency of factor XII. *Pediatrics* 1970, 46, 611–619.
- [180] E. L. Hethershaw, A. L. Cilia La Corte, C. Duval, M. Ali, P. J. Grant, R. A. Ariëns, H. Philippou. The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2014, 12, 197–205.
- [181] C. C. Helms, R. A. Ariëns, S. Uitte de Willige, K. F. Standeven, M. Guthold. α-α Cross-links increase fibrin fiber elasticity and stiffness. *Biophysical Journal* 2012, 102, 168–175.
- [182] V. Schroeder, H. P. Kohler. Thrombelastographic studies on factor XIII. Thrombosis and Haemostasis 2010, 104, 1277–1279.
- [183] K. A. Smith, P. J. Adamson, R. J. Pease, J. M. Brown, A. J. Balmforth, P. A. Cordell, R. A. Ariëns, H. Philippou, P. J. Grant. Interactions between factor XIII and the αC region of fibrinogen. *Blood* **2011**, *117*, 3460–3468.
- [184] R. B. Credo, C. G. Curtis, L. Lóránd. α-Chain Domain of Fibrinogen Controls Generation of Fibrinoligase (Coagulation Factor XIIIa). Calcium Ion Regulatory Aspects. *Biochemistry* 1981, 20, 3770–3778.
- [185] T. J. Hornyak, J. A. Shafer. Interactions of Factor XIII with Fibrin as Substrate and Cofactor. *Biochemistry* 1992, 31, 423–429.
- [186] K. A. Smith, R. J. Pease, C. A. Avery, J. M. Brown, P. J. Adamson, E. J. Cooke, S. Neergaard-Petersen, P. A. Cordell, R. A. Ariëns, C. W. Fishwick, H. Philippou, P. J. Grant. The activation peptide cleft exposed by thrombin cleavage of FXIII-A2 contains a recognition site for the fibrinogen α chain. *Blood* 2013, 121, 2117–2126.

- [187] K. Kasahara, M. Souri, M. Kaneda, T. Miki, N. Yamamoto, A. Ichinose. Impaired clot retraction in factor XIII A subunit-deficient mice. *Blood* 2010, 115, 1277–1279.
- [188] V. Tutwiler, R. I. Litvinov, A. P. Lozhkin, A. D. Peshkova, T. Lebedeva, F. I. Ataullakhanov, K. L. Spiller, D. B. Cines, J. W. Weisel. Kinetics and mechanics of clot contraction are governed by the molecular and cellular composition of the blood. Blood 2016, 127, 149–159.
- [189] D. C. Rijken, S. Abdul, J. J. Malfliet, F. W. Leebeek, S. Uitte de Willige. Compaction of fibrin clots reveals the antifibrinolytic effect of factor XIII. *Journal of Thrombosis* and Haemostasis 2016, 14, 1453–1461.
- [190] S. Lopaciuk, K. M. Lovette, J. McDonagh, H. Y. K. Chuang, R. P. McDonagh. Subcellular distribution of fibrinogen and factor XIII in human blood platelets. *Thrombosis Research* 1976, 8, 453–465.
- [191] J. J. Sixma, A. van den Berg, M. Schiphorst, H. J. Geuze, J. McDonagh. Immunocytochemical Localization of Albumin and Factor XIII in Thin Cryo Sections of Human Blood Platelets. *Thrombosis and Haemostasis* 1984, 52, 388–391.
- [192] É. Katona, É. Ajzner, K. Tóth, L. Kárpáti, L. Muszbek. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *Journal of Immunological Methods* **2001**, 258, 127–135.
- [193] G. Marx, G. Korner, X. Mou, R. Gorodetsky. Packaging Zinc, Fibrinogen, and Factor XIII in Platelet α-Granules. Journal of Cellular Physiology 1993, 156, 437–442.
- [194] J. H. Joist, S. Niewiarowski. Retention of Platelet Fibrin Stabilizing Factor during the Platelet Release Reaction and Clot Retraction. *Thrombosis and Haemostasis* 1973, 29, 679–683.
- [195] J. L. Mitchell, A. S. Lionikiene, S. R. Fraser, C. S. Whyte, N. A. Booth, N. J. Mutch. Functional factor XIII-A is exposed on the stimulated platelet surface. *Blood* 2014, 124, 3982–3990.
- [196] J. L. Mitchell, N. J. Mutch. Novel aspects of platelet factor XIII function. Thrombosis Research 2016, 141, S17–S21.
- [197] G. Reed, G. R. Matsueda, E. Haber. Fibrin-fibrin and alpha 2-antiplasmin-fibrin crosslinking by platelet factor XIII increases the resistance of platelet clots to fibrinolysis. *Transactions of the Association of American Physicians* 1991, 104, 21–28.

- [198] G. L. Reed, G. R. Matsueda, E. Haber. Platelet Factor XIII Increases the Fibrinolytic Resistance of Platelet-Rich Clots by Accelerating the Crosslinking of α2-Antiplasmin to Fibrin. *Thrombosis and Haemostasis* **1992**, *68*, 315–320.
- [199] C. W. Francis, V. J. Marder. Rapid formation of large molecular weight α-polymers in cross-linked fibrin induced by high Factor XIII concentrations: Role of platelet Factor XIII. The Journal of Clinical Investigation 1987, 80, 1459–1465.
- [200] F. D. Rubens, D. W. Perry, M. W. C. Hatton, P. D. Bishop, M. A. Packham, R. L. Kinlough-Rathbone. Platelet Accumulation on Fibrin-coated Polyethylene: Role of Platelet Activation and Factor XIII. *Thrombosis and Haemostasis* 1995, 74, 850–856.
- [201] Z. Hevessy, G. Haramura, Z. Boda, M. Udvardy, L. Muszbek. Promotion of the Crosslinking of Fibrin and α2-antiplasmin by Platelets. *Thrombosis and Haemostasis* 1996, 75, 161–167.
- [202] J. P. Collet, G. Montalescot, C. Lesty, J. W. Weisel. A structural and dynamic investigation of the facilitating effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in dissolving platelet-rich clots. *Circulation Research* 2002, 90, 428–434.
- [203] B. Shenkman, Y. Einav, T. Livnat, I. Budnik, U. Martinowitz. In vitro evaluation of clot quality and stability in a model of severe thrombocytopenia: effect of fibrinogen, factor XIII and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Blood Transfusion* 2014, 12, 78–84.
- [204] M. H. Ginsberg, X. Du, E. F. Plow. Inside-out integrin signalling. Current Opinion in Cell Biology 1992, 4, 766–771.
- [205] K. Kasahara, M. Kaneda, T. Miki, K. Iida, N. Sekino-Suzuki, I. Kawashima, H. Suzuki, M. Shimonaka, M. Arai, Y. Ohno-Iwashita, S. Kojima, M. Abe, T. Kobayashi, T. Okazaki, M. Souri, A. Ichinose, N. Yamamoto. Clot retraction is mediated by factor XIII-dependent fibrin αIIbβ3-myosin axis in platelet sphingomyelin-rich membrane rafts. *Blood* **2013**, *122*, 3340–3348.
- [206] I. Knezevic, T. M. Leisner, S. C.-T. Lam. Direct binding of the platelet integrin  $\alpha$ (IIb) $\beta$ 3 (GPIIb-IIIa) to talin: Evidence that interaction is mediated through the cytoplasmic domains of both  $\alpha$ (IIb) and  $\beta$ 3. The Journal of Biological Chemistry **1996**, 271, 16416–16421.
- [207] I. Cohen, J. M. Gerrard, J. G. White. Ultrastructure of clots during isometric contraction. *Journal of Cell Biology* 1982, 93, 775–787.

- [208] K. Serrano, D. V. Devine. Intracellular Factor XIII Crosslinks Platelet Cytoskeletal Elements upon Platelet Activation. *Thrombosis and Haemostasis* 2002, 88, 315–320.
- [209] N. J. A. Mattheij, F. Swieringa, T. G. Mastenbroek, M. A. Berny-Lang, F. May, C. C. F. M. J. Baaten, P. E. J. van der Meijden, Y. M. C. Henskens, E. A. M. Beckers, D. P. L. Suylen, M. W. Nolte, T. M. Hackeng, O. J. T. McCarty, J. W. M. Heemskerk, J. M. E. M. Cosemans. Coated platelets function in platelet-dependent fibrin formation via integrin αIIbβ3 and transglutaminase factor XIII. *Haematologica* **2016**, 101, 427–436.
- [210] F. Swieringa, H. M. H. Spronk, J. W. M. Heemskerk, P. E. J. van der Meijden. Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* 2018, 2, 450–460.
- [211] Y. N. Kotova, N. A. Podoplelova, S. I. Obydennyy, E. A. Kostanova, A. A. Ryabykh, A. S. Demyanova, M. I. Biriukova, M. A. Rosenfeld, A. V. Sokolov, H. Chambost, M. A. Kumskova, F. I. Ataullakhanov, M.-C. Alessi, M. A. Panteleev. Binding of Coagulation Factor XIII Zymogen to Activated Platelet Subpopulations: Roles of Integrin αIIbβ3 and Fibrinogen. *Thrombosis and Haemostasis* **2019**, *119*, 906–915.
- [212] I. Cohen, T. Glaser, A. Veis, J. Bruner-Lóránd. Ca<sup>2+</sup>-dependent cross-linking processes in human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta* 1981, 676, 137–147.
- [213] G. Dickneite, H. Herwald, W. Korte, Y. Allanore, C. P. Denton, M. M. Cerinic. Coagulation factor XIII: A multifunctional transglutaminase with clinical potential in a range of conditions. *Thrombosis and Haemostasis* 2015, 113, 686–697.
- [214] A. Inbal, A. Lubetsky, T. Krapp, D. Castel, A. Shaish, L. Modis, L. Muszbek, A. Inbal. Impaired wound healing in factor XIII deficient mice. *Thrombosis and Haemostasis* 2005, 94, 432–437.
- [215] V. R. Richardson, P. Cordell, K. F. Standeven, A. M. Carter. Substrates of Factor XIII-A: roles in thrombosis and wound healing. *Clinical Science* 2013, 124, 123–137.
- [216] R. Dardik, J. Loscalzo, A. Inbal. Factor XIII (FXIII) and angiogenesis. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2006, 4, 19–25.
- [217] Z. Bagoly, É. Katona, L. Muszbek. Factor XIII and inflammatory cells. Thrombosis Research 2012, 129, S77–S81.

- [218] B. Hoppe. Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Thrombosis and Haemostasis* 2014, 112, 649–658.
- [219] M. Nahrendorf, E. Aikawa, J.-L. Figueiredo, L. Stangenberg, S. W. van den Borne, W. M. Blankesteijn, D. E. Sosnovik, F. A. Jaffer, C.-H. Tung, R. Weissleder. Transglutaminase activity in acute infarcts predicts healing outcome and left ventricular remodelling: implications for FXIII therapy and antithrombin use in myocardial infarction. *European Heart Journal* 2008, 29, 445–454.
- [220] D. Gemmati, G. Zeri, E. Orioli, R. Mari, S. Moratelli, M. Vigliano, J. Marchesini, M. E. Grossi, A. Pecoraro, A. Cuneo, R. Ferrari, M. Pinotti, M. L. Serino, L. Ansani. Factor XIII-A dynamics in acute myocardial infarction: A novel prognostic biomarker? *Thrombosis and Haemostasis* 2015, 114, 123–132.
- [221] A. Mousa, C. Cui, A. Song, V. D. Myneni, H. Sun, J. J. Li, M. Murshed, G. Melino, M. T. Kaartinen. Transglutaminases factor XIII-A and TG2 regulate resorption, adipogenesis and plasma fibronectin homeostasis in bone and bone marrow. *Cell Death and Differentiation* 2017, 24, 844–854.
- [222] H. Sun, M. T. Kaartinen. Transglutaminase activity regulates differentiation, migration and fusion of osteoclasts via affecting actin dynamics. *Journal of Cellular Physiology* 2018, 233, 7497–7513.
- [223] A. Inbal, L. Muszbek. Coagulation factor deficiencies and pregnancy loss. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2003, 29, 171–174.
- [224] M. Al-Khabori, A. Pathare, M. Menegatti, F. Peyvandi. Recombinant factor XIII A-subunit in a patient with factor XIII deficiency and recurrent pregnancy loss. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2018, 16, 1052–1054.
- [225] T. H. Kiesselbach, R. H. Wagner. Fibrin-stabilizing factor: a thrombin-labile platelet protein. American Journal of Physiology 1966, 211, 1472–1476.
- [226] T. H. Kiesselbach, R. H. Wagner. Demonstration of Factor XIII in Human Megakaryocytes By a Fluorescent Antibody Technique. Annals of the New York Academy of Sciences 1972, 202, 318–328.
- [227] P. Henriksson, S. Becker, G. Lynch, J. MacDonagh. Identification of intracellular factor XIII in human monocytes and macrophages. *The Journal of Clinical Investigation* 1985, 76, 528–534.

- [228] L. Muszbek, R. Ádány, G. Szegedi, J. Polgár, M. Kávai. Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thrombosis Research* 1985, 37, 401–410.
- [229] F. O. Nestle, X.-G. Zheng, C. B. Thompson, L. A. Turka, B. J. Nickoloff. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *Journal of Immunology* **1993**, 151, 6535–6545.
- [230] A. K. Rosenthal, I. Masuda, C. M. Gohr, B. A. Derfus, M. Le. The transglutaminase, Factor XIIIA, is present in articular chondrocytes. Osteoarthritis and Cartilage 2001, 9, 578–581.
- [231] M. Nurminskaya, M. T. Kaartinen. Transglutaminases in mineralized tissues. Frontiers in Bioscience 2006, 11, 1591–1606.
- [232] V. D. Myneni, K. Hitomi, M. T. Kaartinen. Factor XIII-A transglutaminase acts as a switch between preadipocyte proliferation and differentiation. *Blood* 2014, 124, 1344–1353.
- [233] A. Dorgalaleh, J. Rashidpanah. Blood coagulation factor XIII and factor XIII deficiency. Blood Reviews 2016, 30, 461–475.
- [234] V. Schroeder, H. P. Kohler. Factor XIII: Structure and Function. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2016, 42, 422–428.
- [235] L. Paragh, D. Törőcsik. Factor XIII Subunit A in the Skin: Applications in Diagnosis and Treatment. *BioMed Research International* 2017, 2017, 3571861.
- [236] D. Törőcsik, H. Bárdos, L. Nagy, R. Ádány. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005, 62, 2132–2139.
- [237] D. Törőcsik, L. Széles, G. Paragh Jr., Z. Rákosy, H. Bárdos, L. Nagy, M. Balázs, A. Inbal, R. Ádány. Factor XIII-A is involved in the regulation of gene expression in alternatively activated human macrophages. *Thrombosis and Haemostasis* 2010, 104, 709–717.
- [238] A. Ichinose. Factor XIII is a key molecule at the intersection of coagulation and fibrinolysis as well as inflammation and infection control. *International Journal of Hematology* 2012, 362–370.

- [239] R. Dardik, A. Solomon, J. Loscalzo, R. Eskaraev, A. Bialik, I. Goldberg, G. Schiby, A. Inbal. Novel proangiogenic effect of factor XIII associated with suppression of thrombospondin 1 expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003, 23, 1472–1477.
- [240] A. Inbal, R. Dardik. Role of coagulation factor XIII (FXIII) in angiogenesis and tissue repair. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis 2006, 35, 162–165.
- [241] T. G. Loof, M. Mörgelin, L. Johansson, S. Oehmcke, A. I. Olin, G. Dickneite, A. Norrby-Teglund, U. Theopold, H. Herwald. Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense. *Blood* 2011, 118, 2589–2598.
- [242] A. Krarup, K. C. Gulla, P. Gál, K. Hajela, R. B. Sim. The action of MBL-associated serine protease 1 (MASP1) on factor XIII and fibrinogen. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008, 1784, 1294–1300.
- [243] K. Hess, R. Ajjan, F. Phoenix, J. Dobó, P. Gál, V. Schroeder. Effects of MASP-1 of the Complement System on Activation of Coagulation Factors and Plasma Clot Formation. *PLoS One* 2012, 7, e35690.
- [244] K. C. Gulla, K. Gupta, A. Krarup, P. Gál, W. J. Schwaeble, R. B. Sim, C. D. O'Connor, K. Hajela. Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot. *Immunology* 2010, 129, 482–495.
- [245] V. R. Richardson, V. Schroeder, P. J. Grant, K. F. Standeven, A. M. Carter. Complement C3 is a substrate for activated factor XIII that is cross-linked to fibrin during clot formation. *British Journal of Haematology* 2012, 160, 116–119.
- [246] M. Okamoto, T. Yamamoto, S. Matsubara, I. Kukita, M. Takeya, Y. Miyauchi, T. Kambara. Factor XIII-dependent generation of 5th complement component(C5)derived monocyte chemotactic factor coinciding with plasma clotting. *Biochimica et Biophysica Acta* 1992, 1138, 53–61.
- [247] M. Nonaka, Y. Matsuda, T. Shiroishi, K. Moriwaki, M. Nonaka, S. Natsuume-Sakai. Molecular Cloning of the b Subunit of Mouse Coagulation Factor XIII and Assignment of the Gene to Chromosome 1: Close Evolutionary Relationship to Complement Factor H. Genomics 1993, 15, 535–542.
- [248] A. Biswas, A. Thomas, C. G. Bevans, V. Ivaskevicius, J. Oldenburg. In Vitro Secretion Deficits are Common Among Human Coagulation Factor XIII Subunit B Missense

Mutants: Correlations with Patient Phenotypes and Molecular Models. *Human Mutation* **2013**, *34*, 1490–1500.

- [249] A. Thomas, A. Biswas, V. Ivaskevicius, J. Oldenburg. Structural and functional influences of coagulation factor XIII subunit B heterozygous missense mutants. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2015, 3, 258–271.
- [250] M. S. Akhter, S. Singh, H. Yadegari, V. Ivaskevicius, J. Oldenburg, A. Biswas. Exploring the structural similarity yet functional distinction between coagulation factor XIII-B and complement factor H sushi domains. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2019, 48, 95–102.
- [251] M. Kávai, R. Ádány, G. Pásti, P. Surányi, G. Szűcs, L. Muszbek, F. Boján, G. Szegedi. Marker profile, enzyme activity, and function of a human myelomonocytic leukemia cell line. *Cellular Immunology* **1992**, *139*, 531–540.
- [252] A. Jayo, I. Conde, P. Lastres, V. Jiménez-Yuste, C. González-Manchón. Possible role for cellular FXIII in monocyte-derived dendritic cell motility. *European Journal of Cell Biology* 2009, 88, 423–431.
- [253] A. Sárváry, S. Szűcs, I. Balogh, Á. Becsky, H. Bárdos, M. Kávai, U. Seligsohn, R. Egbring, S. Lopaciuk, L. Muszbek, R. Ádány. Possible role of factor XIII subunit A in Fcγ and complement receptor-mediated phagocytosis. *Cellular Immunology* 2004, 228, 81–90.
- [254] M. Nahrendorf, D. E. Sosnovik, P. Waterman, F. K. Swirski, A. N. Pande, E. Aikawa, J.-L. Figueiredo, M. J. Pittet, R. Weissleder. Dual Cannel Optical Tomographic Imaging of Leukocyte Recruitment and Protease Activity in the Healing Myocardial Infarct. *Circulation Research* 2007, 100, 1218–1225.
- [255] Y. Nakano, H. F. Al-Jallad, A. Mousa, M. T. Kaartinen. Expression and localization of plasma transglutaminase factor XIIIA in bone. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2007, 55, 675–685.
- [256] H. F. Al-Jallad, Y. Nakano, J. L. Chen, E. McMillan, C. Lefebvre, M. T. Kaartinen. Transglutaminase activity regulates osteoblast differentiation and matrix mineralization in MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Matrix Biology* 2006, 25, 135–148.
- [257] C. Cui, S. Wang, V. D. Myneni, K. Hitomi, M. T. Kaartinen. Transglutaminase activity arising from Factor XIIIA is required for stabilization and conversion of plasma fibronectin into matrix in osteoblast cultures. *Bone* 2014, 59, 127–138.

- [258] H. F. Al-Jallad, V. D. Myneni, S. A. Piercy-Kotb, N. Chabot, A. Mulani, J. W. Keillor, M. T. Kaartinen. Plasma membrane factor XIIIA transglutaminase activity regulates osteoblast matrix secretion and deposition by affecting microtubule dynamics. *PLoS One* 2011, 6, e15893.
- [259] S. Wang, C. Cui, K. Hitomi, M. T. Kaartinen. Detyrosinated Glu-tubulin is a substrate for cellular Factor XIIIA transglutaminase in differentiating osteoblasts. *Amino Acids* 2014, 46, 1513–1526.
- [260] H. Raghu, C. Cruz, C. L. Rewerts, M. D. Frederick, S. Thornton, E. S. Mullins, J. G. Schoenecker, J. L. Degen, M. J. Flick. Transglutaminase factor XIII promotes arthritis through mechanisms linked to inflammation and bone erosion. *Blood* 2015, 125, 427–437.
- [261] P. A. Cordell, L. M. Newell, K. F. Standeven, P. J. Adamson, K. R. Simpson, K. A. Smith, C. L. Jackson, P. J. Grant, R. J. Pease. Normal Bone Deposition Occurs in Mice Deficient in Factor XIII-A and Transglutaminase 2. *Matrix Biology* 2015, 43, 85–96.
- [262] M. Nahrendorf, K. Hu, S. Frantz, F. A. Jaffer, C.-H. Tung, K.-H. Hiller, S. Voll, P. Nordbeck, D. Sosnovik, S. Gattenlöhner, M. Novikov, G. Dickneite, G. L. Reed, P. Jakob, A. Rosenzweig, W. R. Bauer, R. Weissleder, G. Ertl. Factor XIII Deficiency Causes Cardiac Rupture, Impairs Wound Healing, and Aggravates Cardiac Remodeling in Mice With Myocardial Infarction. *Circulation* **2006**, *113*, 1196–1202.
- [263] F. A. Jaffer, D. E. Sosnovik, M. Nahrendorf, R. Weissleder. Molecular imaging of myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2006, 41, 921–933.
- [264] M. Souri, S. Koseki-Kuno, N. Takeda, M. Yamakawa, Y. Takeishi, J. L. Degen, A. Ichinose. Male-specific cardiac pathologies in mice lacking either the A or B subunit of factor XIII. *Thrombosis and Haemostasis* 2008, 99, 401–408.
- [265] D. Gemmati, M. Vigliano, F. Burini, R. Mari, H. H. A. El Mohsein, F. Parmeggiani, M. L. Serino. Coagulation Factor XIIIA (F13A1): Novel Perspectives in Treatment and Pharmacogenetics. *Current Pharmaceutical Design* **2016**, *22*, 1449–1459.
- [266] L. A. T. Sharief, R. A. Kadir. Congenital factor XIII deficiency in women: a systematic review of literature. *Haemophilia* 2013, 19, e349–e357.

- [267] S. Bouttefroy, S. Meunier, V. Milien, M. Boucekine, D. Desprez, A. Harroche, A. Hochart, M. F. Thiercelin-Legrand, B. Wibaut, H. Chambost, L. Rugeri, CodeC study group. Congenital factor XIII deficiency: comprehensive overview of the FranceCoag cohort. *British Journal of Haematology* **2019**, *188*, 317–320.
- [268] T. Asahina, T. Kobayashi, Y. Okada, J. Goto, T. Terao. Maternal Blood Coagulation Factor XIII is Associated with the Development of Cytotrophoblastic Shell. *Placenta* 2000, 21, 388–393.
- [269] A. Ichinose, T. Asahina, T. Kobayashi. Congenital Blood Coagulation Factor XIII Deficiency and Perinatal Management. *Current Drug Targets* 2005, 6, 541–549.
- [270] M. S. Ogasawara, K. Aoki, K. Katano, Y. Ozaki, K. Suzumori. Factor XII but not protein C, protein S, antithrombin III, or factor XIII is a predictor of recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility* 2001, 75, 916–919.
- [271] G. Cohen, R. Hadas, R. Stefania, A. Pagoto, S. Ben-Dor, F. Kohen, D. Longo, M. Elbaz, N. Dekel, E. Gershon, S. Aime, M. Neeman. Magnetic Resonance Imaging Reveals Distinct Roles for Tissue Transglutaminase and Factor XIII in Maternal Angiogenesis During Early Mouse Pregnancy. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2019, 39, 1602–1613.
- [272] A. S. Lawrie, L. Green, I. J. Mackie, R. Liesner, S. J. Machin, F. Peyvandi. Factor XIII - an under diagnosed deficiency - are we using the right assays? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2010, 8, 2478–2482.
- [273] H. P. Kohler, A. Ichinose, R. Seitz, R. A. Ariëns, L. Muszbek. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2011, 9, 1404–1406.
- [274] M. Karimi, F. Peyvandi, M. Naderi, A. Shapiro. Factor XIII deficiency diagnosis: Challenges and tools. International Journal of Laboratory Hematology 2018, 40, 3–11.
- [275] V. Schroeder, H. P. Kohler. Factor XIII Deficiency: An Update. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2013, 39, 632–641.
- [276] L. Muszbek, É. Katona. Diagnosis and Management of Congenital and Acquired FXIII Deficiencies. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2016, 42, 429–439.

- [277] F. Peyvandi, D. Di Michele, P. H. B. Bolton-Maggs, C. A. Lee, A. Tripodi, A. Srivastava. Classification of rare bleeding disorders (RBDs) based on the association between coagulant factor activity and clinical bleeding severity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2012, 10, 1938–1943.
- [278] A. Biswas, V. Ivaskevicius, A. Thomas, J. Oldenburg. Coagulation factor XIII deficiency: Diagnosis, prevalence and management of inherited and acquired forms. *Hämostaseologie* 2014, 34, 160–166.
- [279] A. Ichinose. Hemorrhagic acquired factor XIII (13) deficiency and acquired hemorrhaphilia 13 revisited. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2011, 37, 382–388.
- [280] L. Muszbek, K. Pénzes, É. Katona. Auto- and alloantibodies against factor XIII: laboratory diagnosis and clinical consequences. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2018, 16, 822–832.
- [281] K. Pénzes, C. Vezina, Z. Bereczky, E. Katona, M. Kun, L. Muszbek, G. E. Rivard. Alloantibody developed in a factor XIII A subunit deficient patient during substitution therapy; characterization of the antibody. *Haemophilia* **2016**, *22*, 268–275.
- [282] L. Muszbek, Z. Bereczky, Z. Bagoly, A. H. Shemirani, É. Katona. Factor XIII and Atherothrombotic Diseases. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2010, 1, 18–33.
- [283] A. van Hylckama Vlieg, N. Komanasin, R. A. S. Ariëns, S. R. Poort, P. J. Grant, R. M. Bertina, F. R. Rosendaal. Factor XIII Val34Leu polymorphism, factor XIII antigen levels and activity and the risk of deep venous thrombosis. *British Journal* of Haematology 2002, 119, 169–175.
- [284] M. Cushman, E. S. O'Meara, A. R. Folsom, S. R. Heckbert. Coagulation factors IX through XIII and the risk of future venous thrombosis: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology. *Blood* 2009, 114, 2878–2883.
- [285] N. Kucher, V. Schroeder, H. P. Kohler. Role of blood coagulation factor XIII in patients with acute pulmonary embolism. Correlation of factor XIII antigen levels with pulmonary occlusion rate, fibrinogen, D-dimer, and clot firmness. *Thrombosis* and Haemostasis 2003, 90, 434–438.
- [286] Z. Bereczky, E. Balogh, É. Katona, I. Czuriga, I. Édes, L. Muszbek. Elevated factor XIII level and the risk of myocardial infarction in women. *Haematologica* 2007, 92, 287–288.

- [287] S. A. Shaya, L. J. Saldanha, N. Vaezzadeh, J. Zhou, R. Ni, P. L. Gross. Comparison of the effect of dabigatran and dalteparin on thrombus stability in a murine model of venous thromboembolism. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2016, 14, 143–152.
- [288] S. A. Shaya, D. M. Gani, J. I. Weitz, P. Y. Kim, P. L. Gross. Factor XIII Prevents Pulmonary Emboli in Mice by Stabilizing Deep Vein Thrombi. *Thrombosis and Haemostasis* 2019, 119, 992–999.
- [289] H. Mikkola, M. Syrjälä, V. Rasi, E. Vahtera, E. Hämäläinen, L. Peltonen, A. Palotie. Deficiency in the A-subunit of coagulation factor XIII: Two novel point mutations demonstrate different effects on transcript levels. *Blood* **1994**, *84*, 517–525.
- [290] R. A. S. Ariëns, H. Philippou, C. Nagaswami, J. W. Weisel, D. A. Lane, P. J. Grant. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood* **2000**, *96*, 988–995.
- [291] L. Muszbek. Deficiency Causing Mutations and Common Polymorphisms in the Factor XIII-A Gene. *Thrombosis and Haemostasis* 2000, 84, 524–527.
- [292] T. A. Trumbo, M. C. Maurer. Examining thrombin hydrolysis of the Factor XIII activation peptide segment leads to a proposal for explaining the cardioprotective effects observed with the Factor XIII V34L mutation. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275, 20627–20631.
- [293] B. C. Lim, R. A. Ariëns, A. M. Carter, J. W. Weisel, P. J. Grant. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *The Lancet* 2003, *361*, 1424–1431.
- [294] P. S. Wells, J. L. Anderson, D. K. Scarvelis, S. P. Doucette, F. Gagnon. Factor XIII Val34Leu Variant is Protective against Venous Thromboembolism: A HuGE Review and Meta-Analysis. *American Journal of Epidemiology* 2006, 164, 101–109.
- [295] Z. Vokó, Z. Bereczky, É. Katona, R. Ádány, L. Muszbek. Factor XIII Val34Leu variant protects against coronary artery disease. *Thrombosis and Haemostasis* 2007, 97, 458–463.
- [296] C. Duval, M. Ali, W. W. Chaudhry, V. C. Ridger, R. A. S. Ariëns, H. Philippou. Factor XIII A-Subunit V34L Variant Affects Thrombus Cross-Linking in a Murine Model of Thrombosis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2016, 36, 308–316.

- [297] B. Li, L. Zhang, Y. Yin, Y. Pi, Q. Yang, C. Gao, C. Fang, J. Wang, J. Li. Lack of evidence for association between factor XIII-A Val34Leu polymorphism and ischemic stroke: A meta-analysis of 8,800 subjects. *Thrombosis Research* 2012, 130, 654–660.
- [298] J. Ma, H. Li, C. You, Y. Liu, L. Ma, S. Huang. Blood coagulation factor XIII-A subunit Val34Leu polymorphisms and intracerebral hemorrhage risk: A meta-analysis of case-control studies. *British Journal of Neurosurgery* 2015, 29, 672–677.
- [299] J. Zhou, P. C. Y. Tang, L. Qin, P. M. Gayed, W. Li, E. A. Skokos, T. R. Kyriakides, J. S. Pober, G. Tellides. CXCR3-dependent accumulation and activation of perivascular macrophages is necessary for homeostatic arterial remodeling to hemodynamic stresses. *Journal of Experimental Medicine* **2010**, 207, 1951–1966.
- [300] P. K. Mehta, K. K. Griendling. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology -Cell Physiology* 2007, 292, C82–C97.
- [301] S. AbdAlla, H. Lother, A. Langer, Y. el Faramawy, U. Quitterer. Factor XIIIA Transglutaminase Crosslinks AT<sub>1</sub> Receptor Dimers of Monocytes at the Onset of Atherosclerosis. *Cell* 2004, 119, 343–354.
- [302] J. A. Coppinger, G. Cagney, S. Toomey, T. Kislinger, O. Belton, J. P. McRedmond, D. J. Cahill, A. Emili, D. J. Fitzgerald, P. B. Maguire. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 2004, 103, 2096–2104.
- [303] A. Undas, R. A. S. Ariëns. Fibrin Clot Structure and Function: A Role in the Pathophysiology of Arterial and Venous Thromboembolic Diseases. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2011, 31, e88–e99.
- [304] R. A. S. Ariëns. Fibrin(ogen) and thrombotic disease. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2013, 11, 294–305.
- [305] K. I. Bridge, H. Philippou, R. A. Ariëns. Clot properties and cardiovascular disease. *Thrombosis and Haemostasis* 2014, 112, 901–908.
- [306] R. C. M. Kotzé, R. A. S. Ariëns, Z. de Lange, M. Pieters. CVD risk factors are related to plasma fibrin clot properties independent of total and or γ' fibrinogen concentration. *Thrombosis Research* 2014, 134, 963–969.

- [307] M. Zabczyk, K. Plens, W. Wojtowicz, A. Undas. Prothrombotic Fibrin Clot Phenotype is Associated with Recurrent Pulmonary Embolism After Discontinuation of Anticoagulant Therapy. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2017, 37, 365–373.
- [308] J. Cieslik, S. Mrozinska, E. Broniatowska, A. Undas. Altered plasma clot properties increase the risk of recurrent deep vein thrombosis: a cohort study. *Blood* 2018, 131, 797–807.
- [309] W. Sumaya, L. Wallentin, S. K. James, A. Siegbahn, K. Gabrysch, M. Bertilsson, A. Himmelmann, R. A. Ajjan, R. F. Storey. Fibrin clot properties independently predict adverse clinical outcome following acute coronary syndrome: a PLATO substudy. *European Heart Journal* 2018, 39, 1078–1085.
- [310] C. L. Nikolajsen, T. F. Dyrlund, E. T. Poulsen, J. J. Enghild, C. Scavenius. Coagulation Factor XIIIa Substrates in Human Plasma. Identification and Incorporation Into the Clot. *The Journal of Biological Chemistry* 2014, 289, 6526–6534.
- [311] P. J. Bungay, R. A. Owen, I. C. Coutts, M. Griffin. A role for transglutaminase in glucose-stimulated insulin release from the pancreatic β-cell. *Biochemical Journal* 1986, 235, 269–278.
- [312] P. R. Sharma, A. J. Mackey, E. A. Dejene, J. W. Ramadan, C. D. Langefeld, N. D. Palmer, K. D. Taylor, L. E. Wagenknecht, R. M. Watanabe, S. S. Rich, C. S. Nunemaker. An islet-targeted genome-wide association scan identifies novel genes implicated in cytokine-mediated islet stress in type 2 diabetes. *Endocrinology* 2015, 156, 3147–3156.
- [313] J. Naukkarinen, I. Surakka, K. H. Pietiläinen, A. Rissanen, V. Salomaa, S. Ripatti, H. Yki-Järvinen, C. M. van Duijn, H.-E. Wichmann, J. Kaprio, M.-R. Taskinen, L. Peltonen, ENGAGE Consortium. Use of Genome-Wide Expression Data to Mine the "Gray Zone" of GWA Studies Leads to Novel Candidate Obesity Genes. *PLoS Genetics* 2010, 6, e1000976.
- [314] V. D. Myneni, A. Mousa, M. T. Kaartinen. Factor XIII-A transglutaminase deficient mice show signs of metabolically healthy obesity on high fat diet. *Scientific Reports* 2016, 6, 1–11.
- [315] V. D. Myneni, G. Melino, M. T. Kaartinen. Transglutaminase 2 a novel inhibitor of adipogenesis. *Cell Death and Disease* 2015, 6, e1868.

- [316] R. Invernizzi, P. de Fazio, A. M. Iannone, L. M. Zambelli, M. P. Rastaldi, G. Ippoliti, E. Ascari. Immunocytochemical detection of factor XIII A-subunit in acute leukemia. *Leukemia Research* 1992, 16, 829–836.
- [317] J. Kappelmayer, Á. Simon, É. Katona, A. Szanto, L. Nagy, A. Kiss, C. Kiss, L. Muszbek. Coagulation factor XIII-A: A flow cytrometric intracellular marker in the classification of acute myeloid leukemias. *Thrombosis and Haemostasis* 2005, 94, 454–459.
- [318] F. Kiss, Z. Hevessy, A. Veszprémi, É. Katona, C. Kiss, G. Vereb, L. Muszbek, J. Kappelmayer. Leukemic lymphoblasts, a novel expression site of coagulation factor XIII subunit A. *Thrombosis and Haemostasis* 2006, 96, 756–66.
- [319] F. Kiss, Á. Simon, L. Csáthy, Z. Hevessy, É. Katona, C. Kiss, J. Kappelmayer. A coagulation factor becomes useful in the study of acute leukemias: Studies with blood coagulation factor XIII. *Cytometry Part A* 2008, 73, 194–201.
- [320] Á. Simon, Z. Bagoly, Z. Hevessy, L. Csáthy, É. Katona, G. Vereb, A. Ujfalusi, L. Szerafin, L. Muszbek, J. Kappelmayer. Expression of Coagulation Factor XIII Subunit A in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2012, 82B, 209–216.
- [321] J. S. Raval, A. N. Berg, M. Djokic, C. G. Roth, M. A. Rollins-Raval. Factor XIII Subunit A Immunohistochemical Expression is Associated with Inferior Outcomes in Acute Promyelocytic Leukemia. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 2018, 26, 202–205.
- [322] B. Kárai, Z. Hevessy, E. Szánthó, L. Csáthy, A. Ujfalusi, K. Gyurina, I. Szegedi, J. Kappelmayer, C. Kiss. Expression of Coagulation Factor XIII Subunit A Correlates with Outcome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pathology & Oncology Research* 2018, 24, 345–352.
- [323] P. Quatresooz, P. Paquet, T. Hermanns-Lê, G. E. Piérard. Molecular mapping of Factor XIIIa-enriched dendrocytes in the skin (Review). International Journal of Molecular Medicine 2008, 22, 403–409.
- [324] P. Abenoza, T. Lillemoe. CD34 and Factor XIIIa in the differential diagnosis of dermatofibroma and dermatofibrosarcoma protuberans. *The American Journal of Dermatopathology* 1993, 15, 429–434.

- [325] J. R. Goldblum, R. J. Tuthili. CD34 and factor-XIIIa immunoreactivity in dermatofibrosarcoma protuberans and dermatofibroma. *The American Journal of Dermatopathology* **1997**, *19*, 147–153.
- [326] E. Vairaktaris, S. Vassiliou, C. Yapijakis, S. Spyridonidou, A. Vylliotis, S. Derka, E. Nkenke, G. Fourtounis, F. W. Neukam, E. Patsouris. Increased risk for oral cancer is associated with coagulation factor XIII but not with factor XII. Oncology Reports 2007, 18, 1537–1543.
- [327] M. Fusconi, A. Ciofalo, A. Greco, G. Pulice, M. Macci, M. Mariotti, C. Della Rocca. Solitary Fibrous Tumor of the Oral Cavity: Case Report and Pathologic Consideration. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2008, 66, 530–534.
- [328] H. Bárdos, P. Molnár, G. Csécsei, R. Ádány. Fibrin deposition in primary and metastatic human brain tumours. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1996, 7, 536– 548.
- [329] S. Lehrer, F. R. Dembitzer, P. H. Rheinstein, K. E. Rosenzweig. In primary glioblastoma fewer tumor copy number segments of the F13A1 gene are associated with poorer survival. *Thrombosis Research* 2018, 167, 12–14.
- [330] S. H. Lee, I. B. Suh, E. J. Lee, G. Y. Hur, S. Y. Lee, S. Y. Lee, C. Shin, J. J. Shim, K. H. In, K. H. Kang, S. H. Yoo, J. H. Kim. Relationships of coagulation factor XIII activity with cell-type and stage of non-small cell lung cancer. *Yonsei Medical Journal* 2013, 54, 1394–1399.
- [331] A. Porrello, P. L. Leslie, E. B. Harrison, B. K. Gorentla, S. Kattula, S. K. Ghosh, S. H. Azam, A. Holtzhausen, Y. L. Chao, M. C. Hayward, T. A. Waugh, S. Bae, V. Godfrey, S. H. Randell, C. Oderup, L. Makowski, J. Weiss, M. D. Wilkerson, D. N. Hayes, H. S. Earp, A. S. Baldwin, A. S. Wolberg, C. V. Pecot. Factor XIIIA-expressing inflammatory monocytes promote lung squamous cancer through fibrin cross-linking. *Nature Communications* **2018**, *9*, 1988.
- [332] J. S. Palumbo, K. A. Barney, E. A. Blevins, M. A. Shaw, A. Mishra, M. J. Flick, K. W. Kombrinck, K. E. Talmage, M. Souri, A. Ichinose, J. L. Degen. Factor XIII transglutaminase supports hematogenous tumor cell metastasis through a mechanism dependent on natural killer cell function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2008, 6, 812–819.

- [333] W. G. Jiang, R. Ablin, A. Douglas-Jones, R. E. Mansel. Expression of transglutaminases in human breast cancer and their possible clinical significance. *Oncology Reports* 2003, 10, 2039–2044.
- [334] X. Wang, E. Wang, J. J. Kavanagh, R. S. Freedman. Ovarian cancer, the coagulation pathway, and inflammation. *Journal of Translational Medicine* 2005, 3, 25.
- [335] C. Y. Vossen, M. Hoffmeister, J. C. Chang-Claude, F. R. Rosendaal, H. Brenner. Clotting factor gene polymorphisms and colorectal cancer risk. *Journal of Clinical Oncology* 2011, 29, 1722–1727.
- [336] Y. An, S. Bekesova, N. Edwards, R. Goldman. Peptides in low molecular weight fraction of serum associated with hepatocellular carcinoma. *Disease Markers* 2010, 29, 11–20.
- [337] J. Peltier, J.-P. Roperch, S. Audebert, J.-P. Borg, L. Camoin. Activation peptide of the coagulation factor XIII (AP-F13A1) as a new biomarker for the screening of colorectal cancer. *Clinical Proteomics* **2018**, *15*, 15.
- [338] R. Seitz, F. Leugner, M. Katschinski, A. Immel, M. Kraus, R. Egbring, B. Göke. Ulcerative colitis and Crohn's disease: FXIII, Inflammation and Haemostasis. *Digestion* 1994, 55, 361–367.
- [339] R. Lorenz, P. Olbert, P. Born. Factor XIII in Chronic Inflammatory Bowel Diseases. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 1996, 22, 451–455.
- [340] G. D'Argenio, V. Cosenza, G. Riegler, N. Della Valle, F. Deritis, G. Mazzacca, R. D'Incà, G. C. Sturniolo, F. Morace, P. Paoluzi, M. C. Di Paolo, V. Annese, G. Lombardi, C. Mansi, R. Caprilli, G. Taddei. Serum transglutaminase correlates with endoscopic and histopathologic grading in patients with ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences* 2001, 46, 649–657.
- [341] S. Higaki, K. Nakano, S. Onaka, A. Amano, Y. Tanioka, K. Harada, S. Hashimoto, I. Sakaida, K. Okita. Clinical significance of measuring blood coagulation factor XIIIA regularly and continuously in patients with Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006, 21, 1407–1411.
- [342] P. A. Cougard, A. Desjeux, V. Vitton, K. Baumstarck-Barrau, N. Lesavre, J.-C. Grimaud. The usefulness of factor XIII levels in Crohn's disease. *Journal of Crohn's* and Colitis 2012, 6, 660–664.

- [343] S. Sun, M. A. Karsdal, J. H. Mortensen, Y. Luo, J. Kjeldsen, A. Krag, M. D. Jensen, A. C. Bay-Jensen, T. Manon-Jensen. Serological Assessment of the Quality of Wound Healing Processes in Crohn's Disease. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 2019, 28, 175–182.
- [344] C. Soendergaard, P. H. Kvist, J. B. Seidelin, H. Pelzer, O. H. Nielsen. Systemic and intestinal levels of factor XIII-A: the impact of inflammation on expression in macrophage subtypes. *Journal of Gastroenterology* **2016**, *51*, 796–807.
- [345] N. Bregenzer, I. Caesar, T. Andus, J. Hämling, H. Malchow, S. Schreiber, J. Schölmerich. Lack of clinical efficacy of additional factor XIII treatment in patients with steroid refractory colitis. The Factor XIII Study Group. Zeitschrift für Gastroenterologie 1999, 37, 999–1004.
- [346] K. Bernerth, I. Schiefke, K. Liebscher, S. Raczynski, T. Kottmann, N. Teich. Factor-XIII activity in patients with mild to moderate ulcerative colitis and active bleeding: A prospective observational study. BMC Research Notes 2018, 11, 853.
- [347] É. Katona, B. Nagy, J. Kappelmayer, G. Baktai, L. Kovács, T. Márialigeti, B. Dezső, L. Muszbek. Factor XIII in bronchoalveolar lavage fluid from children with chronic bronchoalveolar inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005, 3, 1407–1413.
- [348] S. Esnault, E. A. Kelly, R. L. Sorkness, M. D. Evans, W. W. Busse, N. N. Jarjour. Airway factor XIII associates with type 2 inflammation and airway obstruction in asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016, 137, 767–773.
- [349] Z. Z. Orosz, É. Katona, A. Facskó, A. Berta, L. Muszbek. A highly sensitive chemiluminescence immunoassay for the measurement of coagulation factor XIII subunits and their complex in tears. *Journal of Immunological Methods* **2010**, *353*, 87–92.
- [350] Z. Z. Orosz, É. Katona, A. Facskó, L. Módis, L. Muszbek, A. Berta. Factor XIII subunits in human tears; their highly elevated levels following penetrating keratoplasty. *Clinica Chimica Acta* 2011, 412, 271–276.
- [351] K. Sugitani, K. Ogai, K. Hitomi, K. Nakamura-Yonehara, T. Shintani, M. Noda, Y. Koriyama, H. Tanii, T. Matsukawa, S. Kato. A distinct effect of transient and sustained upregulation of cellular factor XIII in the goldfish retina and optic nerve on optic nerve regeneration. *Neurochemistry International* 2012, 61, 423–432.

- [352] K. Sugitani, K. Ogai, H. Muto, K. Onodera, A. Matsuoka, T. Sugita, Y. Koriyama. A novel activation mechanism of cellular Factor XIII in zebrafish retina after optic nerve injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2019, 517, 57–62.
- [353] I. Tsujimoto, K. Moriya, K. Sakai, G. Dickneite, T. Sakai. Critical role of factor XIII in the initial stages of carbon tetrachloride-induced adult liver remodeling. *American Journal of Pathology* 2011, 179, 3011–3019.
- [354] N. M. Intagliata, J. P. E. Davis, J. Lafond, U. Erdbruegger, C. S. Greenberg, P. G. Northup, S. H. Caldwell. Acute kidney injury is associated with low factor XIII in decompensated cirrhosis. *Digestive and Liver Disease* **2019**, *51*, 1409–1415.
- [355] W. S. Hur, N. Mazinani, X. J. D. Lu, L. S. Yefet, J. R. Byrnes, L. Ho, J. H. Yeon, S. Filipenko, A. S. Wolberg, W. A. Jefferies, C. J. Kastrup. Coagulation factor XIIIa cross-links amyloid into dimers and oligomers and to blood proteins. *Journal of Biological Chemistry* 2019, 294, 390–396.
- [356] A. Durmaz, E. Kumral, B. Durmaz, H. Onay, G. I. Aslan, F. Ozkinay, S. Pehlivan, M. Orman, O. Cogulu. Genetic factors associated with the predisposition to late onset Alzheimer's disease. *Gene* 2019, 707, 212–215.
- [357] X. Shi, Y. Ohta, X. Liu, J. Shang, R. Morihara, Y. Nakano, T. Feng, Y. Huang, K. Sato, M. Takemoto, N. Hishikawa, T. Yamashita, K. Abe. Chronic Cerebral Hypoperfusion Activates the Coagulation and Complement Cascades in Alzheimer's Disease Mice. *Neuroscience* 2019, 416, 126–136.
- [358] A. S. Wolberg, F. R. Rosendaal, J. I. Weitz, I. H. Jaffer, G. Agnelli, T. Baglin, N. Mackman. Venous thrombosis. *Nature Reviews Disease Primers* 2015, 1, 15006.
- [359] L. Lorand, A. J. Gray, K. Brown, R. B. Credo, C. G. Curtis, R. A. Domanik, P. Stenberg. Dissociation of the subunit structure of fibrin stabilizing factor during activation of the zymogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1974, 56, 914–922.
- [360] G. Reinhardt. α-Halogenmethyl carbonyl compounds as very potent inhibitors of factor XIIIa in vitro. Annals of the New York Academy of Sciences 1981, 370, 836–842.
- [361] R. A. Al-Horani, R. Karuturi, M. Lee, D. K. Afosah, U. R. Desai. Allosteric Inhibition of factor XIIIa. Non-Saccharide Glycosaminoglycan Mimetics, but Not Glycosaminoglycans, Exhibit Promising Inhibition Profile. *PLoS One* **2016**, *11*, e0160189.

- [362] M. V. Catani, F. Bernassola, A. Rossi, G. Melino. Inhibition of clotting factor XIII activity by nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998, 249, 275–278.
- [363] L. Lóránd, N. G. Rule, H. H. Ong, R. Furlanetto, A. Jacobsen, J. Downey, N. Öner, J. Bruner-Lóránd. Amine Specificity in Transpeptidation. Inhibition of Fibrin Cross-Linking. *Biochemistry* 1968, 7, 1214–1223.
- [364] H. Kogen, T. Kiho, K. Tago, S. Miyamoto, T. Fujioka, N. Otsuka, K. Suzuki-Konagai, T. Ogita. Alutacenoic Acids A and B, Rare Naturally Occurring Cyclopropenone Derivatives Isolated from Fungi: Potent Non-Peptide Factor XIIIa Inhibitors. *Journal* of The American Chemical Society 2000, 122, 1842–1843.
- [365] A. A. Tymiak, J. G. Tuttle, S. D. Kimball, T. Wang, V. G. Lee. A Simple and Rapid Screen for Inhibitors of Factor XIIIa. *The Journal of Antibiotics* 1993, 46, 204–206.
- [366] J. G. Atkinson, J. J. Baldwin, D. A. Claremon, P. A. Friedman, D. C. Remy, A. M. Stern. Factor XIIIa inhibitor compounds useful for thrombolytic therapy. *European Patent* 1988, 0294016 A2.
- [367] Y. Iwata, K. Tago, T. Kiho, H. Kogen, T. Fujioka, N. Otsuka, K. Suzuki-Konagai, T. Ogita, S. Miyamoto. Conformational analysis and docking study of potent factor XIIIa inhibitors having a cyclopropenone ring. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2000, 18, 591–599.
- [368] K. F. Freund, S. L. Gaul, K. P. Doshi, D. A. Claremon, D. C. Remy, J. J. Baldwin, P. A. Friedman, A. M. Stern. A novel factor XIIIa inhibitor enhances clot lysis rates. *Fibrinolysis* 1988, 2, 67.
- [369] K. F. Freund, K. P. Doshi, S. L. Gaul, D. A. Claremon, D. C. Remy, J. J. Baldwin, S. M. Pitzenberger, A. M. Stern. Transglutaminase Inhibition by 2-[(2-Oxopropyl)thio]imidazolium Derivatives: Mechanism of Factor XIIIa Inactivation. *Biochemistry* 1994, 33, 10109–10119.
- [370] C. Barsigian, A. M. Stern, J. Martinez. Tissue (type II) transglutaminase covalently incorporates itself, fibrinogen, or fibronectin into high molecular weight complexes on the extracellular surface of isolated hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 1991, 266, 22501–22509.
- [371] J. J. Baldwin, D. C. Remy, D. A. Claremon. Certain imidazole compounds as transglutaminase inhibitors. United States Patent 1990, US 4968713.

- [372] R. Pasternack, M. Hils. Transglutaminase Specialty reagents. Zedira Catalogue 2019, 34–37.
- [373] C. A. Avery, R. J. Pease, K. Smith, M. Boothby, H. M. Buckley, P. J. Grant, C. W. Fishwick. (±) cis-bisamido epoxides: A novel series of potent FXIII-A inhibitors. European Journal of Medicinal Chemistry 2015, 98, 49–53.
- [374] D. Lukacova, G. R. Matsueda, E. Haber, G. L. Reed. Inhibition of Factor XIII Activation by an Anti-Peptide Monoclonal Antibody. *Biochemistry* 1991, 30, 10164– 10170.
- [375] G. L. Reed, D. Lukacova. Generation and Mechanism of Action of a Potent Inhibitor of Factor XIII Function. *Thrombosis and Haemostasis* 1995, 74, 680–685.
- [376] G. L. Reed, A. K. Houng. The Contribution of Activated Factor XIII to Fibrinolytic Resistance in Experimental Pulmonary Embolism. *Circulation* 1999, 99, 299–304.
- [377] A. Heil, J. Weber, C. Büchold, R. Pasternack, M. Hils. Differences in the inhibition of coagulation factor XIII-A from animal species revealed by Michael Acceptor– and thioimidazol based blockers. *Thrombosis Research* 2013, 131, e214–e222.
- [378] K. Hardes, M. Z. Hammamy, T. Steinmetzer. Synthesis and characterization of novel fluorogenic substrates of coagulation factor XIII-A. Analytical Biochemistry 2013, 442, 223–230.
- [379] R. Pasternack, C. Büchold, R. Jähnig, C. Pelzer, M. Sommer, A. Heil, P. Florian, G. Nowak, U. Gerlach, M. Hils. Novel inhibitor ZED3197 as potential drug candidate in anticoagulation targeting coagulation FXIIIa (F13a). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2020, 18, 191–200.
- [380] M. Menegatti, R. Palla, M. Boscarino, P. Bucciarelli, L. Muszbek, É. Katona, M. Makris, F. Peyvandi, The PRO-RBDD Study Group. Minimal factor XIII activity level to prevent major spontaneous bleeds. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2017, 15, 1728–1736.
- [381] R. J. Shebuski, G. R. Sitko, D. A. Claremon, J. J. Baldwin, D. C. Remy, A. M. Stern. Inhibition of factor XIIIa in a canine model of coronary thrombosis: effect on reperfusion and acute reocclusion after recombinant tissue-type plasminogen activator. *Blood* 1990, 75, 1455–1459.

- [382] W. Linxweiler, C. Burger, O. Pöschke, U. Hofmann, A. Wolf. Glucose-Dehydrogenase-Fusionsproteine und ihre Verwendung in Expressionssystemen. *International Patent* 2000, WO 00/49039 A2.
- [383] M. Böhm, T. Kühl, K. Hardes, R. Coch, C. Arkona, B. Schlott, T. Steinmetzer, D. Imhof. Synthesis and Functional Characterization of Tridegin and Its Analogues: Inhibitors and Substrates of Factor XIIIa. *ChemMedChem* 2012, 7, 326–333.
- [384] M. Böhm, C. A. Bäuml, K. Hardes, T. Steinmetzer, D. Roeser, Y. Schaub, M. E. Than, A. Biswas, D. Imhof. Novel Insights into Structure and Function of Factor XIIIa-Inhibitor Tridegin. *Journal of Medicinal Chemistry* 2014, 57, 10355–10365.
- [385] R. T. Sawyer, R. B. Wallis, L. Seale, S. Finney. Inhibitors of fibrin cross-linking and/or transglutaminases. United States Patent 2000, US 6025330.
- [386] H. Giersiefen, J. Stöckel, T. Pamp, M. Ohlmann. Modified tridegins, production and use thereof as transglutaminase inhibitors. *International Patent* 2003, WO 03/054194 A2.
- [387] F. Faria, I. de L. M. Junqueira-De-Azevedo, P. L. Ho, M. U. Sampaio, A. M. Chudzinski-Tavassi. Gene expression in the salivary complexes from Haementeria depressa leech through the generation of expressed sequence tags. *Gene* 2005, 349, 173–185.
- [388] T. Kühl. Untersuchungen zur Darstellung des Faktor XIIIa-Inhibitors Tridegin durch Festphasenpeptidsynthese und chemische Ligation. Diplomarbeit; Friedrich-Schiller-Universität Jena 2009.
- [389] R. Coch. Darstellung und biologische Wirksamkeit von Analoga des Faktor XIIIa-Inhibitors Tridegin. *Diplomarbeit; Friedrich-Schiller Universität Jena* **2010**.
- [390] M. Böhm. Untersuchung funktioneller und struktureller Aspekte des Faktor XIIIa-Inhibitors Tridegin. *Diplomarbeit; Friedrich-Schiller-Universität Jena* **2010**.
- [391] M. Böhm. Targeting the Final Step of Blood Coagulation: Structure-Activity-Relationship Studies on the Factor XIIIa Inhibitor Tridegin. Dissertation; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2015.
- [392] C. A. Bäuml. Structural and Functional Analysis of Factor XIIIa Inhibitor Tridegin. Masterarbeit; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2014.

- [393] C. A. Bäuml, T. Schmitz, A. A. Paul George, M. Sudarsanam, K. Hardes, T. Steinmetzer, L. A. Holle, A. S. Wolberg, B. Pötzsch, J. Oldenburg, A. Biswas, D. Imhof. Coagulation Factor XIIIa Inhibitor Tridegin: On the Role of Disulfide Bonds for Folding, Stability, and Function. Journal of Medicinal Chemistry 2019, 62, 3513–3523.
- [394] C. A. Bäuml, A. A. Paul George, T. Schmitz, P. Sommerfeld, M. Pietsch, L. Podsiadlowski, T. Steinmetzer, A. Biswas, D. Imhof. Distinct 3-disulfide-bonded isomers of tridegin differentially inhibit coagulation factor XIIIa: The influence of structural stability on bioactivity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2020, 201, 112474.
- [395] M. Mochizuki, S. Tsuda, K. Tanimura, Y. Nishiuchi. Regioselective formation of multiple disulfide bonds with the aid of postsynthetic S-tritylation. Organic Letters 2015, 17, 2202–2205.
- [396] C. Hauser, R. Wodtke, R. Löser, M. Pietsch. A fluorescence anisotropy-based assay for determining the activity of tissue transglutaminase. *Amino Acids* 2017, 49, 567–583.
- [397] Y. Zhang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics 2008, 9, 40.
- [398] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 2010, 5, 725–738.
- [399] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, Y. Zhang. The I-TASSER suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods* 2015, 12, 7–8.
- [400] E. Krieger, T. Darden, S. B. Nabuurs, A. Finkelstein, G. Vriend. Making Optimal Use of Empirical Energy Functions: Force-Field Parameterization in Crystal Space. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2004, 57, 678–683.
- [401] H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications* 1995, 91, 43–56.
- [402] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry* 2005, 26, 1701–1718.
- [403] B. Hess, C. Kutzner, D. Van Der Spoel, E. Lindahl. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation* 2008, 4, 435–447.

- [404] M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páall, J. C. Smith, B. Hess, E. Lindahl. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 2015, 1-2, 19–25.
- [405] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* 1983, 79, 926–935.
- [406] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J. L. Klepeis, R. O. Dror, D. E. Shaw. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2010, 78, 1950–1958.
- [407] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello. Canonical sampling through velocity-rescaling. Journal of Chemical Physics 2007, 126, 014101.
- [408] M. Parrinello, A. Rahman. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics* 1981, 52, 7182–7190.
- [409] S. Nosé, M. Klein. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. Molecular Physics 1983, 50, 1055–1076.
- [410] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. G. E. M. Fraaije. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* 1997, 18, 1463–1472.
- [411] P. P. Ewald. Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. Annalen der Physik 1921, 369, 253–287.
- [412] T. Darden, D. York, L. Pedersen. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. The Journal of Chemical Physics 1993, 98, 10089–10092.
- [413] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen. A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics* 1995, 103, 8577–8593.
- [414] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten. VMD: Visual molecular dynamics. Journal of Molecular Graphics 1996, 14, 33–38.
- [415] C. Kutzner, S. Páll, M. Fechner, A. Esztermann, B. L. de Groot, H. Grubmüller. More bang for your buck: Improved use of GPU nodes for GROMACS 2018. *Journal of Computational Chemistry* 2019, 40, 2418–2431.

- [416] B. G. Pierce, K. Wiehe, H. Hwang, B.-H. Kim, T. Vreven, Z. Weng. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics* 2014, 30, 1771–1773.
- [417] S. Singh, A. Nazabal, S. Kaniyappan, J.-L. Pellequer, A. S. Wolberg, D. Imhof, J. Oldenburg, A. Biswas. The Plasma Factor XIII Heterotetrameric Complex Structure: Unexpected Unequal Pairing within a Symmetric Complex. *Biomolecules* 2019, 9, 765.
- [418] E. Krieger, G. Vriend. YASARA View molecular graphics for all devices from smartphones to workstations. *Bioinformatics* 2014, 30, 2981–2982.
- [419] O. Trott, A. Olson. Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking. Journal of Computational Chemistry 2010, 31, 455–461.
- [420] E. M. Novoa, L. R. de Pouplana, X. Barril, M. Orozco. Ensemble docking from homology models. *Journal of Chemical Theory and Computation* 2010, 6, 2547–2557.
- [421] S. Peherstorfer, H. H. Brewitz, A. A. Paul George, A. Wißbrock, J. M. Adam, L. Schmitt, D. Imhof. Insights into mechanism and functional consequences of heme binding to hemolysin-activating lysine acyltransferase HlyC from Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 2018, 1862, 1964–1972.
- [422] Y. Choi, C. M. Deane. FREAD revisited: Accurate loop structure prediction using a database search algorithm. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 2010, 78, 1431–1440.
- [423] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin. UCSF Chimera A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 2004, 25, 1605–1612.
- [424] T. Schmitz. Synthese und Bioaktivitätsstudien zweifach Disulfid-verbrückter Tridegin-Isomere. Masterarbeit; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2017.
- [425] A. M. Steiner, G. Bulaj. Optimization of oxidative folding methods for cysteine-rich peptides: A study of conotoxins containing three disulfide bridges. *Journal of Peptide Science* 2011, 17, 1–7.
- [426] E. Fuller, B. R. Green, P. Catlin, O. Buczek, J. S. Nielsen, B. M. Olivera, G. Bulaj. Oxidative folding of conotoxins sharing an identical disulfide bridging framework. *FEBS Journal* 2005, 272, 1727–1738.

- [427] L. Moroder, H.-J. Musiol, M. Götz, C. Renner. Synthesis of single- and multiplestranded cystine-rich peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* 2005, 80, 85–97.
- [428] Y. Hidaka. Overview of the regulation of disulfide bond formation in peptide and protein folding. *Current Protocols in Protein Science* 2014, 76, 28.6.1–28.6.6.
- [429] S. Shimamoto, H. Katayama, M. Okumura, Y. Hidaka. Chemical methods and approaches to the regioselective formation of multiple disulfide bonds. *Current Protocols in Protein Science* 2014, 76, 28.8.1–28.8.28.
- [430] K. Akaji, K. Fujino, T. Tatsumi, Y. Kiso. Total Synthesis of Human Insulin by Regioselective Disulfide Formation Using the Silyl Chloride-Sulfoxide Method. *Journal* of the American Chemical Society 1993, 115, 11384–11392.
- [431] C. Kellenberger, H. Hietter, B. Luu. Regioselective formation of the three disulfide bonds of a 35-residue insect peptide. *Peptide Research* 1995, *8*, 321–327.
- [432] M. Husbyn, A. Cuthbertson. A novel approach to the synthesis of EGF-like domains: a method for the one-pot regioselective formation of the three disulfide bonds of a human blood coagulation factor VII EGF-1 analogue. *Journal of Peptide Research* 2002, 60, 121–127.
- [433] A. Cuthbertson, B. Indrevoll. Regioselective formation, using orthogonal cysteine protection, of an α-conotoxin dimer peptide containing four disulfide bonds. Organic Letters 2003, 5, 2955–2957.
- [434] F. Shen, Z. P. Zhang, J.-B. Li, Y. Lin, L. Liu. Hydrazine-sensitive thiol protecting group for peptide and protein chemistry. *Organic Letters* 2011, 13, 568–571.
- [435] Z. Dekan, M. Mobli, M. W. Pennington, E. Fung, E. Nemeth, P. F. Alewood. Total synthesis of human hepcidin through regioselective disulfide-bond formation by using the safety-catch cysteine protecting group 4,4'-dimethylsulfinylbenzhydryl. Angewandte Chemie International Edition 2014, 53, 2931–2934.
- [436] S. Peigneur, M. Paolini-Bertrand, H. Gaertner, D. Biass, A. Violette, R. Stöcklin, P. Favreau, J. Tytgat, O. Hartley. δ-Conotoxins synthesized using an acid-cleavable solubility tag approach reveal key structural determinants for NaV subtype selectivity. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, 289, 35341–35350.
- [437] J. S. Nielsen, P. Buczek, G. Bulaj. Cosolvent-assisted oxidative folding of a bicyclic α-conotoxin ImI. Journal of Peptide Science 2004, 10, 249–256.

- [438] K. Adermann, K. Barlos. Chapter 6.2: Regioselective Disulfide Formation. Oxidative Folding of Peptides and Proteins 2009, Royal Society of Chemistry, 297–317.
- [439] B. Kamber, A. Hartmann, K. Eisler, B. Riniker, H. Rink, P. Sieber, W. Rittel. The Synthesis of Cystine Peptides by Iodine Oxidation of S-Trityl-cysteine and S-Acetamidomethyl-cysteine Peptides. *Helvetica Chimica Acta* 1980, 63, 899–915.
- [440] H. Lamthanth, C. Roumestand, C. Deprun, A. Ménez. Side reaction during the deprotection of (S-acetamidomethyl)cysteine in a peptide with a high serine and threonine content. *International Journal of Peptide and Protein Research* 1993, 41, 85–95.
- [441] P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Jöhl, B. Riniker, W. Rittel. Totalsynthese von Humaninsulin. IV. Beschreibung der Endstufen. *Helvetica Chimica Acta* 1977, 60, 27–37.
- [442] P. Heimer, T. Schmitz, C. A. Bäuml, D. Imhof. Synthesis and Structure Determination of μ-Conotoxin PIIIA Isomers with Different Disulfide Connectivities. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* 2018, e58368.
- [443] R. Söll, A. G. Beck-Sickinger. On the Synthesis of Orexin A: A Novel One-step Procedure to Obtain Peptides with Two Intramolecular Disulphide Bonds. *Journal* of Peptide Science 2000, 6, 387–397.
- [444] T. M. Postma, F. Albericio. N-Chlorosuccinimide, an efficient reagent for on-resin disulfide formation in solid-phase peptide synthesis. Organic Letters 2013, 15, 616– 619.
- [445] A. Cuthbertson, B. Indrevoll. A method for the one-pot regioselective formation of the two disulfide bonds of  $\alpha$ -conotoxin SI. Tetrahedron Letters **2000**, 41, 3661–3663.
- [446] J. P. Tam, M. W. Riemen, R. B. Merrifield. Mechanisms of Aspartimide Formation: The Effects of Protecting groups, Acid, Base, Temperature and Time. *Peptide Research* 1988, 1, 6–18.
- [447] A. Schulz, E. Klüver, S. Schulz-Maronde, K. Adermann. Engineering disulfide bonds of the novel human β-defensins hBD-27 and hBD-28: differences in disulfide formation and biological activity among human β-defensins. *Biopolymers (Peptide Science)* 2005, 80, 34–49.

- [448] E. Klüver, S. Schulz-Maronde, S. Scheid, B. Meyer, W.-G. Forssmann, K. Adermann. Structure-Activity Relation of Human β-Defensin 3: Influence of Disulfide Bonds and Cysteine Substitution on Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *Biochemistry* 2005, 44, 9804–9816.
- [449] K. Akaji, T. Tatsumi, M. Yoshida, T. Kimura, Y. Fujiwara, Y. Kiso. Disulfide Bond Formation Using the Silyl Chloride-Sulfoxide System for the Synthesis of a Cystine Peptide. Journal of the American Chemical Society 1992, 114, 4137–4143.
- [450] K. N. Parameswaran, X.-F. Cheng, E. C. Chen, P. T. Velasco, J. H. Wilson, L. Lóránd. Hydrolysis of γ:ε Isopeptides by Cytosolic Transglutaminases and by Coagulation Factor XIIIa. The Journal of Biological Chemistry 1997, 272, 10311–10317.
- [451] K. Hardes, G. L. Becker, M. Z. Hammamy, T. Steinmetzer. Design, synthesis, and characterization of chromogenic substrates of coagulation factor XIIIa. Analytical Biochemistry 2012, 428, 73–80.
- [452] R. Wodtke, C. Hauser, G. Ruiz-Gómez, E. Jäckel, D. Bauer, M. Lohse, A. Wong, J. Pufe, F.-A. Ludwig, S. Fischer, S. Hauser, D. Greif, M. T. Pisabarro, J. Pietzsch, M. Pietsch, R. Löser. N<sup>ε</sup>-Acryloyllysine Piperazides as Irreversible Inhibitors of Transglutaminase 2: Synthesis, Structure-Activity Relationships, and Pharmacokinetic Profiling. Journal of Medicinal Chemistry 2018, 61, 4528–4560.
- [453] F. Eisenhaber, P. Lijnzaad, P. Argos, C. Sander, M. Scharf. The double cubic lattice method: efficient approaches to numerical integration of surface area and volume and volume to dot surface contouring of molecular assemblies. *Journal of Computational Chemistry* 1995, 16, 273–284.
- [454] D. Eisenberg, A. D. McLachlan. Solvation energy in protein folding and stability. *Nature* 1986, 319, 199–203.
- [455] X. Daura, K. Gademann, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, A. E. Mark. Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. Angewandte Chemie International Edition 1999, 38, 236–240.
- [456] N. A. Baker. Poisson-Boltzmann Methods for Biomolecular Electrostatics. Methods in Enzymology 2004, 383, 94–118.
- [457] A. Z. Budzynski, S. A. Olexa, R. T. Sawyer. Composition of Salivary Gland Extracts from the Leech Haementeria ghilianii. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1981, 168, 259–265.

- [458] T. R. Gregory. Estimation of genome size via Feulgen Image Analysis Densitometry. Unpublished Data. Animal Genome Size Database 2019.
- [459] A. C. Forde. Genome size diversity and patterns within the Annelida. Masterarbeit; University of Guelph, Kanada. 2013.
- [460] O. Lukjancenko, T. M. Wassenaar, D. W. Ussery. Comparison of 61 Sequenced Escherichia coli Genomes. *Microbial Ecology* 2010, 60, 708–720.
- [461] International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001, 409, 860–921.
- [462] H. Li. Minimap and miniasm: fast mapping and de novo assembly for noisy long sequences. *Bioinformatics* 2016, 32, 2103–2110.

## Abkürzungsverzeichnis

Alle Abkürzungen für Aminosäuren und entsprechende Derivate wurden gemäß der Empfehlungen des *Nomenclature Committee of IUB* (NC-IUB) und des *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) verwendet. Alle Aminosäuren und -derivate liegen in L-Konfiguration vor, sofern nicht anders angegeben.

Å	Ångström
Abz	2-Aminobenzoyl
Acm	Acetamidomethyl
AcOH	Essigsäure
AL	akute Leukämie
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure(n)
$\alpha_2$ -AP	$\alpha_2$ -Antiplasmin
AT1	ATII-Rezeptor-Typ-1
ATII	Angiotensin II
ATIII	Antithrombin III
atm	Physikalische Atmosphäre
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
b	Base(n)
bp	Basenpaar(e)
Band $4.2$	Erythrozytenmembranprotein 4.2
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
BPTI	boviner pankreatischer Trypsininhibitor
α-C	C-Terminus der Fibrin(ogen)-(A)α-Kette
°C	Grad Celsius
C1	Komplementfaktor C1
C1q	Komplementfaktor C1q
C3	Komplementfaktor C3

C5	Komplementfaktor C5
Ca	Calcium
CA	Kalifornien
$CaCl_2$	Calciumchlorid
Cad	Cadaverin
CD20	B-Lymphozytenantigen CD20
cDNA	komplementäre (complementary) DNA
cFXIII	zellulärer FXIII
CHE	Schweiz
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation (collision-induced dissociation)
СМК	Chloromethylketon
COI	cytochrome oxidase subunit I
DCM	Dichlormethan
DMC	N,N-Dimethylcasein
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
Da	Dalton
$\mathrm{E}_{\mathrm{bind}}$	theoretische Bindungsenergie (Poisson-Boltzmann)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrosprayionisierung
et al.	lat. <i>et alii</i> , und andere
EtOH	Ethanol
F13A1	FXIIIA-Gen
FFPE	Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded
FIX(a)	(aktivierter) Blutgerinnungsfaktor IX
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FpA	Fibrinopeptid A
FpB	Fibrinopeptid B
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FV(a)	(aktivierter) Blutgerinnungsfaktor V
FVII(a)	(aktivierter) Blutgerinnungsfaktor VII
FVIII(a)	(aktivierter) Blutgerinnungsfaktor VIII
FX(a)	(aktivierter) Blutgerinnungsfaktor X

FXI(a)	(aktivierter) Blutgerinnungsfaktor XI
FXIII(a)	(aktivierter) Blutgerinnungsfaktor XIII
$FXIII-A_2$	FXIII-Homodimer aus A-Untereinheiten
FXIII-A°	nicht-proteolytisch aktivierter FXIIIa
FXIII-A*	proteolytisch-aktivierter FXIIIa
$FXIII-A_2B_2$	FXIII-Heterotetramer aus FXIII-A $_2$ und -B $_2$
FXIII-AP	FXIII-Aktivierungspeptid
$FXIII-B_2$	FXIII-Homodimer aus B-Untereinheiten
$FXIII_{Thromb}$	thrombozytärer FXIII
E. coli	Escherichia coli
g	g-Kraft
GER	Deutschland
GM130	cis-Golgimatrix protein 130 kDa
GP	Glycoprotein
GPIb	Glycoprotein Ib
GPIb/IX	Rezeptorkomplex bestehend aus GPIb und GPIX
GPIIb/IIIa	Glycoprotein IIb/IIIa
GPIX	Glycoprotein IX
GSH	Glutathion, reduziert
$\Delta G_{solv}$	freie Solvatationsenergie
GSSG	Glutathion, oxidiert
gTGase	Meerschweinchen-Transglutaminase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
$H_2O$	Wasser
HBTU	$O\hbox{-}Benzotriazol\hbox{-}tetramethyluronium-hexafluorophosphat}$
HBS	HEPES-buffered saline
HCCA	α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure
HCl	Salzsäure
H. depressa	Haementeria depressa
HEPES	$2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfons \ddot{a} ure$
H. ghilianii	Haementeria ghilianii (Amazonas-Riesenblutegel)
H. medicinalis	Hirudo medicinalis (medizinischer Blutegel)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSP	heat shock protein
IAA	Iodacetamid

$IC_{50}$	halbmaximale inhibitorische Konzentration
$\alpha_v \beta_3$ -Integrin	Vitronectinrezeptor
IR	Infrarot
IUB	International Union of Biochemistry
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Κ	Kalium
Κ	Kelvin
ki	Maß für die Affinität zwischen Enzym und Inhibitor
LAP	Leech Antihemostatic Protein
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
LCI	Leech Carboxypeptidase Inhibitor
LM	lower marker
М	mol/l (molar)
M2-Makrophagen	alternativ-aktivierte Makrophagen
MA	Massachusetts
MAP	Michael-Akzeptor-Pharmakophor
MASP	MBL-assoziierte Serinprotease
MALDI	Matrix-assistierte Laserdesorptionsionisierung
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MD-	Molekulardynamik-
MeBzl	4-Methylbenzyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MeSiCl <sub>3</sub>	Trichlormethylsilan
MOPS	3-(N-Morpholino) propansul fonsä ure
mRNA	Boten-RNA (messenger-RNA)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-MS
MST	Microscale Thermophoresis
m/z	MS-Einheit; Masse (m) geteilt durch Ladung (z)
Ν	normal
n50	Contig-Länge,über der 50% der Genomsequenz liegen
Na	Natrium
$Na_2HPO_4$	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid

$NaH_2PO_4$	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NC	North Carolina
NJ	New Jersey
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Kernspinresonanz(spektroskopie) (nuclear magnetic resonance)
NO	Stickoxid
NPP	Normalplasmapool
$\mathrm{NSGM}13$	Nicht-Saccharid-Glucosaminoglycan-Mimetikum 13
NY	New York
OtBu	tert-Butylester
PA	Pennsylvania
PAR	Protease-aktivierende Rezeptoren
Pbf	Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDB	Protein Data Bank
PDI	Proteindisulfidisomerase
pFXIII(a)	(aktivierter) plasmatischer FXIII
$Ph_2SO$	Phenylsulfoxid
PVP	Probenverdünnungspuffer
RA	rheumatoide Arthritis
RFU	relative fluorescence units
$R_{G}$	Gyrationsradius
R-I-Cad	Rhodamin-B-Isonipecotylcadaverin
RMSD	root-mean square deviation
RMSF	per-residue root mean square fluctuation
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RP-HPLC	Reverse-Phase-HPLC
RT	Raumtemperatur
SASA	solvent-accessible surface area
$\operatorname{SG}$	Schutzgruppe
SH	Thiol
SPPS	$Fest phase npeptid synthese \ (solid-phase \ peptide \ synthesis)$
$t\mathrm{Bu}$	tert-Butyl

TAP	Tick Anticoagulant Peptide
$\mathrm{TF}$	Gewebefaktor ( <i>Tissue Factor</i> )
TFA	Trifluoressigsäure ( $trifluoroacetic acid$ )
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGase	Transglutaminase
TOF	time of flight
tPA	tissue Plasminogen Activator
$t_R$	Retentionszeit (retention time)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trt	Trityl, Triphenylmethyl
TSP-1	Thrombospondin-1
U	Unit (enzymatische Einheit)
UK	Vereinigtes Königreich
UNC	University of North Carolina
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Geschwindigkeit $(velocity)$
v. Chr.	vor Christus
VEGFR-2	$Vascular \ Endothelial \ Growth \ Factor \ Receptor \ 2$
vgl.	vergleiche
vs.	lat. versus, im Gegensatz zu
vWF	von-Willebrand-Faktor
w/v	Volumengewicht (weight per volume)
ZFMK	Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig
# Abbildungsverzeichnis

2.1	Faltungsmodelle	5
2.2	Fibrinogenaufbau	11
2.3	Fibrinpolymerisierung	16
2.4	Transglutaminase reaktion und katalytische Triade des FXIII a $\ldots$	17
2.5	FXIII-Aktivierung	19
2.6	(Patho-)physiologische Funktionen von FXIII	28
2.7	Strukturformeln der FXIIIa-Inhibitoren ZED1301, ZED3197 und NSGM $13$	36
2.8	Trideginsequenzen	38
2.9	Modelle der Trideginisomere A, B und C und Blind Docking an FXIIIa $~$ .	41
4.1	Schutzgruppenstrategie für die gezielte Synthese der Trideginvarianten $\ . \ .$	51
5.1	Trideginisomere, -analoga und -mutanten	66
5.2	Exemplarischer Oxidationsverlauf für Isomer ${\bf A}$	70
5.3	Analytik der verschiedenen Trideginvarianten	71
5.4	Exemplarische Disulfidbrückenaufklärung des Isomers ${\bf A}$	75
5.5	HPLC-Koelutionsprofile der Trideginisomere und -analoga	81
5.6	Wirkung der Trideginvarianten auf die FXIIIa-Isopeptidaseaktivität	84
5.7	FXIIIa-Enzymaktivität in Gegenwart verschiedener Trideginvarianten $\ . \ .$	86
5.8	Wirkung der Trideginvarianten auf FXIIIa- und TGase 2-Transamidase aktivität	88
5.9	Wirkung der Trideginanaloga in zellbasierten Assays	89
5.10	Molekulare Modellierung und starres $Docking$ der Trideginisomere ${\bf D}$ und ${\bf E}$	91
5.11	MD-Simulations-Snapshots der disulfidre duzierten Trideginvarianten $\ .$	93
5.12	Konformationelle Flexibilität der Trideginisomere und -analoga	95
5.13	Superpositionen der Top 5 Cluster Centroids der Isomere A-E $\ldots$	97
5.14	Molekulares $Docking$ zweifach disulfidverbrückter Trideginvarianten an FXIIIa	98
5.15	Molekulares <i>Docking</i> dreifach disulfidverbrückter Trideginisomere an FXIIIa	100
5.16	Isolierte Speicheldrüsen aus <i>H. ghilianii</i>	105
5.17	$\operatorname{PCR-Speciesidentifikation}$ – Ähnlichkeiten der Top 99 Übereinstimmungen . I	106
5.18	Fragment-Analyse der genomischen DNA aus <i>H. ghilianii</i>	107

5.19	Bestätigung der Trideginsequenz im generierten Genom des ${\cal H}.~ghilianii$	. 108
6.1	Übersicht der gewonnenen Erkenntnisse	. 112

## Tabellenverzeichnis

Cysteinreiche antikoagulative Peptide aus Blutegeln	7
Übersicht zu verschiedenen FXIIIa-Inhibitoren	35
Chemikalien und Reagenzien	45
Allgemeine Ausrüstung und Geräte	48
Verwendete Schutzgruppen für die Synthese der Trideginisomere und -analoga	68
Analytische Charakterisierung der verschiedenen Trideginvarianten $\ . \ . \ .$	72
Disulfidbrückenaufklärung der Trideginanaloga	73
Disulfidbrückenaufklärung der Isomere $\mathbf{A}\text{-}\mathbf{E}$	76
Disulfidbrückenaufklärung des Tridegin ${\bf Z}$	78
$\operatorname{IC}_{50}\text{-}\operatorname{Werte}$ der Trideginvarianten im FXIIIa-Isopeptidase aktivitätsassay $% \operatorname{IC}_{50}$ .	83
RMSD-Werte der Trideginvarianten A-C in der MD-Simulation	92
MD-Simulations-abgeleitete Parameter der Isomere A-E $\ldots$ .	96
Gromos- $Cluster$ -Analyse der 1 µs-MD-Simulationstrajektorie	96
$PCR-Species identifikation-Zusammenfassung \ \ldots \ $	106
PCR-Speciesidentifikation – Top 5 Übereinstimmungen	106
	Cysteinreiche antikoagulative Peptide aus Blutegeln

## Danksagung

Ich hatte das Glück, in den letzten Jahren von wunderbaren Menschen umgeben gewesen zu sein, ohne deren fachliche und moralische Unterstützung die Fertigstellung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Diana Imhof für die enge Betreuung meiner Doktorarbeit, für die bereichernden Diskussionen sowie für die permanente Unterstützung bedanken, durch die ich auch schwierige Phasen während meines Promotionsvorhabens meistern konnte. Außerdem möchte ich ihr für die Möglichkeit zahlreicher Konferenzbesuche im Ausland danken, von denen ich lange zehren werde.

PD Dr. Lars Podsiadlowski (ZFMK Bonn) danke ich für die Übernahme des Koreferates sowie für seine tatkräftige Unterstützung bei der Suche nach dem für Tridegin kodierenden Gen im Amazonas-Riesenblutegel. Seiner Mitarbeiterin Anja Bodenheim möchte ich für die Durchführung verschiedener Experimente im Rahmen der Genomsequenzierung danken. Für die Betreuung und Durchführung von computergestützten Studien zur Faltung und Bioaktivität von Tridegin sowie für viele spannende Diskussionen möchte ich mich bei PD Dr. Arijit Biswas (Universitätsklinikum Bonn) bedanken. Zudem danke ich ihm und Prof. Dr. Karl Wagner (Universität Bonn) für ihre Mitwirkung in der Promotionskommission.

Ich danke Prof. Dr. Torsten Steinmetzer (Philipps-Universität Marburg) und seinen Mitarbeiter\*innen für ihre Unterstützung bei der Durchführung und Interpretation des FXIII-Isopeptidaseaktivitätsassays. Prof. Dr. Alisa Wolberg (UNC at Chapel Hill, NC, USA) möchte ich für die wissenschaftlichen Diskussionen und die tolle Kooperation im Rahmen der Testung von Tridegin in zellbasierten Assays danken. Durch sie und ihre Mitarbeiterin Dr. Lori A. Holle haben wir wichtige Erkenntnisse über die Wirkung von Tridegin in humanem Blut gewonnen. *Thank you!* Bei Dr. Markus Pietsch und seinem Mitarbeiter Paul Sommerfeld (Universitätsklinikum Köln) bedanke ich mich für die Testung von Tridegin in ihren Fluoreszenzanisotropie-basierten Assays mit FXIIIa und TGase 2.

#### Danksagung

Verschiedene Geldgeber haben die vorgestellte Forschungsarbeit sowie Konferenzreisen finanziert. Daher danke ich der Deutschen Stiftung für Herzforschung für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projekts 'Leitstruktur und Werkzeug: Entwicklungsansätze für Tridegin-Analoga als effiziente Faktor XIIIa-Inhibitoren'. Außerdem möchte ich mich beim Deutschen Akademischen Austauschdienst, beim Bonner Graduiertenzentrum und bei meiner Graduiertenschule BIGS DrugS für Konferenzreisestipendien bedanken, die mir den Besuch verschiedener wissenschaftlicher Kongresse ermöglicht haben.

Marion Schneider, Dr. Marc Sylvester, PD Dr. Marianne Engeser und Christine Sondag (Universität Bonn) danke ich für ihre Unterstützung bei unterschiedlichen massenspektrometrischen Messungen im Rahmen meiner Doktorarbeit.

Bei Thomas Schmitz möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit während der Bioaktivitätsmessungen sowie für die ertragreichen Diskussionen zur komplexen Trideginsynthese und für das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit bedanken. Außerdem danke ich ihm außerordentlich für die Synthese und Bereitstellung der disulfidreduzierten Trideginanaloga, welche ein wichtiger Bestandteil der vorliegenden Dissertation sind. Ajay Abisheck Paul George hat verschiedene bioinformatische Analysen zu Strukturwirkungsbeziehungen des Tridegin durchgeführt, wofür ich ihm dankbar bin.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des AK Imhof, die mich in den letzten Jahren begleitet haben, danke ich sehr für die kollegiale Zusammenarbeit im Labor sowie für den Unsinn zwischendurch, ohne den ein Promotionsvorhaben doch sehr dröge wäre. Besonderer Dank geht an Amelie, Marie, Sneha, Henning, Pascal, Toni, Ajay und Sabrina!

Zum Schluss gilt der größte Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich durch ihren emotionalen Beistand während der Zeit meiner Doktorarbeit davor bewahrt haben, komplett durchzudrehen.

Meinen Eltern möchte ich sehr für ihren bedingungslosen Rückhalt – insbesondere in den letzten vier Jahren – danken sowie für das Korrekturlesen der gesamten Dissertation. Bei meinem Bruder Moritz möchte ich mich vor allen Dingen für die tollen Reisen und die damit verbundene notwendige Ablenkung in den vergangenen Jahren bedanken. Zuguterletzt danke ich Aka – für das Ertragen meines Gejammers, für das 'Immer-wieder-Aufbauen' und vor allem für die vielen schönen Momente! Hände hoch, Wochenende!

¡Gracias! Thank you! Danke! Obrigado! ¡Graciñas!

### Veröffentlichungen

#### Zeitschriftenartikel

<u>C. A. Bäuml</u>, A. A. Paul George, T. Schmitz, P. Sommerfeld, M. Pietsch, L. Podsiadlowski, T. Steinmetzer, A. Biswas, D. Imhof. Distinct 3-disulfide-bonded isomers of tridegin differentially inhibit coagulation factor XIIIa: The influence of structural stability on bioactivity. *Eur. J. Med. Chem.*, **2020**, 201, 112474.

T. Schmitz<sup>\*</sup>, <u>C. A. Bäuml</u><sup>\*</sup>, D. Imhof. Inhibitors of blood coagulation factor XIII. (Review) *Anal. Biochem.*, **2020**, 113708.

<u>C. A. Bäuml</u><sup>\*</sup>, T. Schmitz<sup>\*</sup>, A. A. Paul George, M. Sudarsanam, K. Hardes, T. Steinmetzer, L. A. Holle, A. S. Wolberg, B. Pötzsch, J. Oldenburg, A. Biswas, D. Imhof. Coagulation Factor XIIIa Inhibitor Tridegin: On the Role of Disulfide Bonds for Folding, Stability, and Function. J. Med. Chem., **2019**, 62, 3513-3523.

P. Heimer\*, T. Schmitz\*, <u>C. A. Bäuml</u>\*, D. Imhof. Synthesis and Structure Determination of μ-Conotoxin PIIIA Isomers with Different Disulfide Connectivities. J. Vis. Exp., 2018, 140, e58368.

R. Reher, T. Kühl, S. Annala, T. Benkel, D. Kaufmann, B. Nubbemeyer, J. P. Odhiambo, P. Heimer, <u>C. A. Bäuml</u>, S. Kehraus, M. Crüsemann, E. Kostenis, D. Tietze, G. M. König, D. Imhof. Deciphering Specificity Determinants for FR900359-Derived Gqα Inhibitors Based on Computational and Structure-Activity Studies. *ChemMedChem*, **2018**, 13, 1634-1643.

P. Heimer, A. A. Tietze, <u>C. A. Bäuml</u>, A. Resemann, F. J. Mayer, D. Suckau, O. Ohlenschläger, D. Tietze, D. Imhof. Conformational µ-Conotoxin PIIIA Isomers Revisited: Impact of Cysteine Pairing on Disulfide-Bond Assignment and Structure Elucidation. *Anal. Chem.*, **2018**, 90, 3321-3327.

M. Böhm, <u>C. A. Bäuml</u>, K. Hardes, T. Steinmetzer, D. Röser, Y. Schaub, M. E. Than, A. Biswas, D. Imhof. Novel Insights into Structure and Function of Factor XIIIa-Inhibitor Tridegin. *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 10355-10365.

### Vorträge

<u>C. A. Bäuml</u>, A. Biswas, D. Imhof. Targeted synthesis of different disulfide isomers of the Factor XIIIa inhibitor tridegin. *International Factor XIII Workshop*, September **2016**, Héviz (Ungarn)

<u>C. A. Bäuml</u>, M. Böhm, I. Loef, A. Biswas., D. Imhof. Targeted synthesis of different disulfide isomers of the Factor XIIIa inhibitor tridegin. Short talk Poster ID 306, 34. *Europäisches Peptidsymposium (EPS)*, September **2016**, Leipzig (Deutschland)

### Posterbeiträge

<u>C. A. Bäuml</u><sup>\*</sup>, T. Schmitz<sup>\*</sup>, A. A. Paul George, M. Sudarsanam, K. Hardes, T. Steinmetzer, L. A. Holle, A. S. Wolberg, B. Pötzsch, J. Oldenburg, A. Biswas, D. Imhof. Impact of disulfide linkage alterations on folding, structure, and activity of FXIIIa inhibitor Tridegin. 27th International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Congress **2019**, Melbourne (Victoria, Australien)

T. Schmitz<sup>\*</sup>, <u>C. A. Bäuml</u><sup>\*</sup>, A. A. Paul George, M. Sudarsanam, K. Hardes, T. Steinmetzer, L. A. Holle, A. S. Wolberg, B. Pötzsch, J. Oldenburg, A. Biswas, D. Imhof. Impact of modified disulfide connectivity on structure and function of analogs of the FXIIIa inhibitor tridegin. *14. Deutsches Peptidsymposium (GPS)* **2019**, Köln (Deutschland)

A. A. Paul George, P. Heimer, <u>C. A. Bäuml</u>, T. Schmitz, D. Imhof. The folding of disulfide isomers of multiple disulfide-bonded conopeptides. *8th Peptide Engineering Meeting* (*PEM8-2018*) **2018**, Berlin (Deutschland)

T. Schmitz<sup>\*</sup>, <u>C. A. Bäuml</u><sup>\*</sup>, A. A. Paul George, M. Sudarsanam, K. Hardes, T. Steinmetzer, J. Oldenburg, A. Biswas, D. Imhof. Factor XIIIA inhibitor tridegin: On the role of disulfide bonds for folding, stability and function. 35. Europäisches Peptidsymposium (EPS) 2018, Dublin (Irland)

P. Heimer<sup>\*</sup>, <u>C. A. Bäuml</u><sup>\*</sup>, T. Schmitz, A. Resemann, F. J. Mayer, D. Suckau, Alesia A. Tietze, O. Ohlenschläger, D. Tietze, D. Imhof. Impact of cysteine pairing on disulfide-bond assignment and structure elucidation in different conformational isomers of the μ-conotoxin PIIIA. 35. Europäisches Peptidsymposium (EPS) **2018**, Dublin (Irland)

<u>C. A. Bäuml</u>, M. Böhm, P. Heimer, A. Biswas, D. Imhof. Structural characterization of cysteine-rich peptide toxins derived from invertebrates. *XIII Congress of the Brazilian Society of Toxinology* **2015**, Campos do Jordão (São Paulo, Brasilien)

P. Heimer, M. Böhm, <u>C. A. Bäuml</u>, A. A. Tietze, D. Imhof. What is the correct connectivity? Elucidation of the disulfide bonding pattern of different cysteine-rich peptides from invertebrates. *12. Deutsches Peptidsymposium (GPS)* **2015**, Darmstadt (Deutschland)

M. Böhm, <u>C. A. Bäuml</u>, D. Imhof. Tridegin, an interesting peptide targeting factor XIIIa. *GRC: Transglutaminases in Human Disease Processes* **2014**, Lucca (Italien)

### Sonstige

<u>C. A. Bäuml</u>, D. Imhof. Tridegin as FXIIIa inhibitor. *Zedira GmbH Blogeintrag* **2019**, https://zedira.com/Blog/Tridegin-as-FXIIIa-inhibitor\_118.

\* geteilte Erstautorenschaft