

Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Strukturforschung

**Klonierung, Expression, Reinigung und  
Kristallisation von Dipeptidyl Carboxypeptidase**

**Röntgenstrukturanalyse  
der katalytischen Domänen von  
MMP-12, MT3-MMP und MMP-13/TIMP-2**

**Rupert Lang**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. St. Glaser

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h. c. R. Huber  
2. Univ.-Prof. Dr. W. Hiller

Die Dissertation wurde am 15.11.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 11.12.2001 angenommen.



## Meinen Familien

... everything that goes on  
in biology or medicine  
has a chemical basis.

RICHARD LERNER



# DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1997 bis Dezember 2001 in der Abteilung Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich für die große Freiheit bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit danken. Außerdem haben sein ständiges Interesse, seine Diskussionsbereitschaft und viele Ratschläge und Hilfestellungen den Fortgang der Arbeit begleitet.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfram Bode möchte ich mich für die Überlassung dieses interessanten Themas bedanken sowie für stimulierende Diskussionen, viele wertvolle Anregungen und für die große Unterstützung (z. B. bei meinem Aufenthalt in Marseille).

Mein besonderer Dank gilt Dr. Klaus Maskos. Es war ein ausgesprochenes Vergnügen, mit ihm als MMP-Team zusammenzuarbeiten. Vielen Dank für die vielen Antworten auf meine Fragen und den Spaß, den man beim Arbeiten haben kann!

Ein ganz besonderer Dank natürlich an Marianne, die mit ihren Zauberhänden wunderschöne Kristalle produzieren kann.

Mein Dank gilt auch Frau Renate Rüller, Frau Gina Beckmann, Herrn Werner Dersch, Herrn Ottmar Paul für die immer freundliche Hilfe und unverdrossene Unterstützung bei der Überwindung diverser technischer und bürokratischer Hindernisse.

Bedanken möchte ich mich herzlichst bei allen heutigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Strukturforschung für die ausgezeichnete Hilfe bei vielen kleineren und größeren Problemen und für die sehr tolle Atmosphäre. Hervorheben möchte ich meine Zimmergenossen von K334 mit Einzugsgebiet (auch wenn's manchmal A.-Wochen in K334 gab - oder gerade deshalb?). An dieser Stelle sei gleichzeitig den weiteren Freundinnen und Freunden gedankt, die mich während der Zeit der Doktorarbeit nicht vergessen haben:

Zuerst den Mädels: Marianne Braun, Iris Fritze, Dani Präsidentin Jozic, Christine Breitenlechner, Katja Wenig, Berit Grasnack, Ute Schnöller, Anja Dorn, allen Steffis und allen Sabines.

Dann den Buben: Ulrich Rester, Michael Lt. Worbs, Oliver Einsle, Holger Dobbek, Markus Deibert, den Stefans (und Stephans): Riedl, Gerhardt (Danke für die Bilder!), Steinbacher, Krapp, Ehlert und Strobl, Hans MMP-18 Brandstetter, Peter Sondermann, Werner Atzenhofer, Jens Kaiser, Norman Kairies, Michael Engel, Dieter Heindl und allen Olivers (Grasnack, Hien, Heigl).

Ein weiteres Dankeschön an den PC-Beauftragten-Kollegen Oliver Einsle. Geteilter Stress ist halber Stress ...

Danke an meine Tölzer Berg-, Kajak-, Gleitschirm- und Bierfreunde und -Freundinnen: Achi, Andreas, Peter und Annette. Ich bin wieder da!

Noch mal Danke für die vielen Anfeuerungs- und Durchhalteemails und -Worte gegen Ende des Schreibens und vor der Prüfung. Danke Katrin, Dita, Andi, Steffi und Thieri!

Ein großes Dankeschön an die Dame Katrin Sichler und die Herren Jochen Kluge und Rick Engh. Die netten Mittagessen bei der Hongkong Bar oder mit der Hongkong Bar in Ricks Café und die vielen weiteren gemeinsamen Sachen werde ich nie vergessen. Schön war's!!!

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung über all die Jahre. Und sorry für das eine oder andere graue Haar, das ich bei Euch verursacht habe, aber - selber Schuld, oder? Ihr hättet ja einen Apfel essen können ...

Am wichtigsten von allen Leuten sind natürlich meine Frau Anja und meine beiden Söhne Lukas und Carlo (der kleine Schreihals). Danke für Euer Durchhaltevermögen!



## **Veröffentlichungen und Präsentationen, die Teile dieser Arbeit beinhalten:**

Lang, R., Kocourek, A., Braun, M., Tschesche, H., Huber, R., Bode, W. & Maskos, K. (2001). Substrate Specificity Determinants of Human Macrophage Elastase (MMP-12) Based on the 1.1 Å Crystal Structure. *Journal of Molecular Biology* **312**(4), 731-742.

*The Thimet Oligopeptidase Family: Cloning, Expression, Purification and Crystallisation of Peptidyl Dipeptidase (Dcp) from E. coli.* Vortrag bei der 16. Winterschool über 'Proteinases and their Inhibitors - Recent Developments', 4. - 8. März 1998 in Tiers, Italien.

Lang, R., Huber, R., Bode, W. & Maskos, K., *Cloning, Expression, Purification, and Crystallization of Peptidyl Dipeptidase (Dcp) from E. coli.* Posterpräsentation bei der Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, 27. - 30. September 1998 in Jena.

*Mitochondrial Processing Peptidase and Mitochondrial Intermediate Peptidase: Proteinases involved in the Mitochondrial Import Mechanism.* Vortrag bei der 17. Winterschool über 'Proteinases and their Inhibitors - Recent Developments', 10. - 14. Februar 1999 in Tiers, Italien.

Lang, R., Braun, M., Fernandez-Catalan, C., Sounni, N., Foidart, J.-M., Noël, A., Einsle, O., Rester, U., Huber, R., Bode, W., Frankenne, F. & Maskos, K., *Crystal Structure of the Complex formed by the Membrane Type 3-Matrix Metalloproteinase with the Hydroxamic Acid Inhibitor Batimastat.* Posterpräsentation bei dem 6. Internationalen Symposium über 'Proteinase Inhibitor and Biological Control', 9. - 13. Juni 1999 in Brdo/Ljubljana, Slowenien.

*Crystal Structure of the Catalytic Domain of Macrophage Elastase (cd-MMP-12) in Complex with the Hydroxamic Acid Inhibitor Batimastat.* Vortrag bei der 18. Winterschool über 'Proteinases and their Inhibitors - Recent Developments', 8. - 11. März 2000 in Tiers, Italien

*Structural Aspects of Matrix Metalloproteinases Inhibition: 3D Structures of MMPs in Complex with Tissue Specific and Pharmaceutical Inhibitors.* Vortrag im Rahmen des Seminars des SFB 456: 'Zielstrukturen für selektive Tumorinterventionen' im Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München, am 8. Mai 2000.

Lang, R., Kocourek, A., Braun, M., Tschesche, H., Huber, R., Bode, W. & Maskos, K., *Crystal Structure of Recombinant Human Macrophage Elastase (Matrix Metalloproteinase 12)*, Posterpräsentation auf der Gordon Research Conference über 'Proteolytic Enzymes & Their Inhibitors' 9. - 14. Juli 2000 in New London, NH, USA.

Lang, R., Kocourek, A., Braun, M., Tschesche, H., Huber, R., Bode, W. & Maskos, K., *Crystal Structure of Recombinant Human Macrophage Elastase (Matrix Metalloproteinase 12)*, Posterpräsentation auf der Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, 10. - 13. Oktober 2000 in München.

Lang, R., Kocourek, A., Braun, M., Tschesche, H., Huber, R., Bode, W. & Maskos, K., *Crystal Structure of Recombinant Human Macrophage Elastase (Matrix Metalloproteinase 12)*, Posterpräsentation auf dem 2. Münchner Kongress für Biowissenschaften 'Biolog2000', am 11. November 2000 in München.

*The 2.2 Å Crystal Structure Recombinant Human Membrane Type 3-Matrix Metalloproteinase (MT3-MMP, MMP-16)*. Vortrag bei der 19. Winterschool über 'Proteinases and their Inhibitors - Recent Developments', 28. Februar - 4. März 2001 in Tiers, Italien.

Lang, R., Kocourek, A., Braun, M., Tschesche, H., Huber, R., Bode, W. & Maskos, K., *Crystal Structure of Recombinant Human Macrophage Elastase (Matrix Metalloproteinase 12)*, Posterpräsentation bei dem DFG-Workshop über 'Matrix-Metalloproteinasen - Struktur, Funktion und physiologische Bedeutung', 7. - 9. März 2001 in Bielefeld.

Lang, R., Kocourek, A., Braun, M., Tschesche, H., Huber, R., Bode, W. & Maskos, K. (2001). *Substrate Specificity Determinants of Human Macrophage Elastase (MMP-12) Based on the 1.1 Å Crystal Structure*. Posterpräsentation auf der Gordon Research Conference über 'Matrix Metalloproteinases' 13. - 18. Mai 2001 in Il Ciocco, Italien.

Lang, R., Braun, M., Fernandez-Catalan, C., Sounni, N., Foidart; J.-M., Noël, A., Huber, R., Bode, W., Frankenne, F. & Maskos, K., *Crystal Structure of the Catalytic Domain of Membrane Type 3-Matrix Metalloproteinase - New Insights in ProMMP-2 Activation..* Posterpräsentation bei dem '2nd General Meeting of the International Proteolysis Society', 31. Oktober - 5. November 2001 in Freising







# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>II.1</b>	<b>Proteinasen</b>	<b>5</b>
<b>II.2</b>	<b>Metalloproteinasen</b>	<b>7</b>
II.2.1	Gluzinkine	8
II.2.1.1	ACE und Dcp	8
II.2.2	Metzinkine	9
II.2.3	Die extrazelluläre Matrix	10
II.2.3.1	Bestandteile der extrazellulären Matrix	11
II.2.4	Matrix Metalloproteinasen	12
II.2.4.1	Domänenstruktur der MMPs	13
II.2.4.2	Untergruppen der MMP-Familie	15
II.2.4.3	Aktivierung und Regulation	17
II.2.4.4	Substrate und physiologische bzw. pathologische Prozesse	18
II.2.4.5	Synthetische MMP-Inhibitoren	20
II.2.4.6	TIMPs, die Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen	21
II.2.4.7	MMP-12	21
II.2.4.8	MMP-13	23
II.2.4.9	MMP-16	24
<b>II.3</b>	<b>Kristallographie</b>	<b>25</b>
II.3.1	Kristallisation	25
II.3.2	Kristalle	26
II.3.3	Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen	27
II.3.4	Streuung an Atomen	29
II.3.5	Temperaturfaktor	29
II.3.6	Berechnung der Elektronendichte	30
II.3.7	Lösung des Phasenproblems	31
<b>II.4</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>35</b>
II.4.1	Dcp	35
II.4.2	MMPs	35
<b>III</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>37</b>
<b>III.1</b>	<b>Material</b>	<b>37</b>
III.1.1	Chemikalien	37
III.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	37
III.1.3	Puffer und Lösungen	38
III.1.4	Bakterienstämme	39
III.1.5	Nährmedien	39
III.1.6	Plasmid pDcp	40
III.1.7	Oligonukleotide	40

<b>III.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>40</b>
III.2.1	Molekularbiologische Methoden	40
III.2.1.1	Isolierung von DNA	40
III.2.1.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
III.2.1.1.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
III.2.1.2	Charakterisierung von DNA	41
III.2.1.2.1	Konzentrationsbestimmung von DNA	41
III.2.1.2.2	Restriktionsanalyse	41
III.2.1.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	41
III.2.1.2.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	41
III.2.1.2.5	Sequenzierung	42
III.2.1.3	Klonierung in <i>E. coli</i>	43
III.2.1.3.1	Präparativer Verdau	43
III.2.1.3.2	Ligation	43
III.2.1.3.3	Transformation	44
III.2.1.3.3.1	Chemisch kompetente Zellen	44
III.2.1.3.3.2	Elektrokompetente Zellen	44
III.2.1.3.4	Analyse der Transformanden	44
III.2.1.3.5	Expressionsanalyse	44
III.2.1.3.6	Glyzerinkulturen	45
III.2.2	Proteinanalytische Methoden	45
III.2.2.1	Polyacrylamid - Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Gelanalyse	45
III.2.2.2	Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration	45
III.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	46
III.2.2.4	Aminoterminaler Sequenzierung nach Edman	46
III.2.3	Herstellung rekombinanter Dicarboxypeptidase (Dcp)	46
III.2.3.1	Allgemeines	46
III.2.3.1.1	Umpuffern durch Dialyse	46
III.2.3.2	Präparative Expression	46
III.2.3.3	Periplasmaaufschluß	47
III.2.3.4	Gesamtzellaufschluß	47
III.2.3.5	Reinigung des Enzyms	47
III.2.4	Enzymatische Methoden	48
III.2.4.1	Aktivitätsassay	48
III.2.4.2	Ermittlung der IC <sub>50</sub> -Konstanten	49
<b>III.3</b>	<b>Röntgenstrukturanalyse von Proteinen</b>	<b>50</b>
III.3.1	Kristallisation von Proteinen	50
III.3.2	Datensammlung und Datenauswertung	50
III.3.3	Pattersonsuche	51
III.3.4	Modellbau und Verfeinerung	51
III.3.5	Analyse von Atommodellen	51
III.3.6	Graphische Darstellungen	51
<b>IV</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
<b>IV.1</b>	<b>Dcp</b>	<b>53</b>
IV.1.1	Klonierung und Reinigung von Dcp	53
IV.1.2	Biochemische Charakterisierung	54
IV.1.2.1	N-terminale Sequenzierung	54
IV.1.2.2	Enzymkinetik und IC <sub>50</sub> Bestimmung	54
IV.1.3	Kristallisation	56

<b>IV.2</b>	<b>MMP-12 im Komplex mit Batimastat</b>	<b>58</b>
IV.2.1	Kristallisation	58
IV.2.2	Datensammlung	58
IV.2.3	Patterson-Suche	59
IV.2.4	Modellbau und Verfeinerung	60
IV.2.5	Qualität des Modells	60
IV.2.6	Strukturbeschreibung	62
IV.2.6.1	Katalytische Domäne	62
IV.2.6.2	Aktives Zentrum und die Bindung von Batimastat/Substrat	65
IV.2.7	Spezifitätsdeterminanten	67
IV.2.8	Modellierung des Substrates $\alpha$ 1-PI	68
IV.2.9	Metallkoordinierung	70
IV.2.10	PDB-Datenbank	73
<b>IV.3</b>	<b>MMP-16 im Komplex mit Batimastat</b>	<b>74</b>
IV.3.1	Kristallisation	74
IV.3.2	Datensammlung	74
IV.3.3	Patterson-Suche	75
IV.3.4	Modellbau und Verfeinerung	76
IV.3.5	Qualität des Modells	76
IV.3.6	Strukturbeschreibung	78
IV.3.6.1	Überblick	78
IV.3.6.2	Batimastat	80
IV.3.6.3	MT-loop	81
IV.3.6.4	ProMMP-2 Aktivierung	81
<b>IV.4</b>	<b>MMP-13 im Komplex mit TIMP-2</b>	<b>84</b>
IV.4.1	Kristallisation	84
IV.4.2	Datensammlung	84
IV.4.3	Patterson-Suche	85
IV.4.4	Modellbau und Verfeinerung	86
IV.4.5	Qualität des Modells	86
IV.4.6	Strukturbeschreibung	88
IV.4.6.1	Katalytische Domäne von MMP-13	88
IV.4.6.2	TIMP-2	89
IV.4.7	Grenzfläche zwischen MMP-13 und TIMP-2	91
<b>V</b>	<b>Diskussion</b>	<b>95</b>
<b>V.1</b>	<b>Dcp</b>	<b>95</b>
<b>V.2</b>	<b>MMP-12</b>	<b>97</b>
<b>V.3</b>	<b>MMP-16</b>	<b>100</b>
<b>V.4</b>	<b>MMP-13/TIMP-2</b>	<b>104</b>
<b>VI</b>	<b>Literatur</b>	<b>107</b>
<b>VII</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>119</b>



## I ZUSAMMENFASSUNG

Die Metalloproteinasen repräsentieren eine bedeutende Gruppe innerhalb der proteolytischen Enzyme. Sie können ihrerseits in mehrere Familien eingeteilt werden, wobei eine dieser Familien die sogenannten Zinkine sind. Diese werden je nach Art der Komplexbildung des katalytisch aktiven Zinkions in die Gluzinkine bzw. Metzinkine weiter unterteilt.

Zur Familie der Gluzinkine gehören unter anderem die beiden Enzyme Dicarboxypeptidase (Dcp, *E. coli*) und Angiotensin-Conversions Enzym (ACE), wobei letzteres in der Blutdruckregulation eine wichtige Rolle einnimmt. ACE wandelt das Dekapeptid Angiotensin I durch die Abspaltung der zwei C-terminalen Aminosäuren in das gefäßverengende Hormon Angiotensin II um.

Es hat sich gezeigt, dass die bakterielle Proteinase Dcp von *E. coli* trotz fehlender Sequenzhomologien zu ACE eine sehr ähnliche Substratspezifität besitzt. Dcp kann somit als einfaches Modellsystem zur Inhibitorentwicklung für ACE benutzt werden, und eine Kristallstruktur könnte wichtige Eigenheiten des aktiven Zentrums von derartigen Dipeptidasen aufzeigen.

Nachdem von Problemen bei der Überexpression von Dcp in *E. coli* berichtet worden war, wurde eine alternative Klonierungsstrategie entwickelt. Das Dcp-Gen wurde mit der bakteriellen OmpA-Signalsequenz fusioniert. Der daraus folgende Export des Enzyms ins Periplasma führte zu hohen Ausbeuten (7 mg reines Dcp je Liter *E. coli* Kultur). Die Reinigung erfolgte über Anionenaustausch-, Hydroxyapatit und Gelpermeationschromatographie. Um für die Kokristallisation von Dcp geeignete Inhibitoren zu finden, wurden  $IC_{50}$ -Werte für eine Reihe von kommerziell erhältlichen ACE-Inhibitoren bestimmt. Es zeigte sich, dass bei dem Inhibitor (N-1140) nur eine Inhibition von max. 75 % erzielt werden konnte, während die anderen getesteten Inhibitoren bei Dcp ähnliche Charakteristika wie für ACE besitzen. Aus den erhaltenen Werten werden mögliche Bindungsmodi der meist peptidischen Inhibitoren an Dcp diskutiert. In faktoriellen *screening*-Experimenten konnte eine Anzahl reproduzierbarer Kristallisationsbedingungen gefunden werden. Die erhaltenen Kristalle wurden in röntgenographischen Untersuchungen eingesetzt, erwiesen sich jedoch als stark fehlgeordnet.

Die Superfamilie der Metzinkine, deren katalytisch aktives Zink von drei Histidinen komplexiert wird und die einen charakteristischen Met-*turn* aufweisen, kann weiter in die Familien der Astacine, Adamalysine, Serralysine und Matrix Metalloproteinasen (MMPs) eingeteilt werden. Letztere sind nicht nur entscheidend an den wachstums- und differenzierungsbedingten Umbauten des extrazellulären Gewebes beteiligt, sondern spielen auch in einer Reihe von Krankheiten wie Rheumatoide Arthritis, Lungenemphysem und Metastasenbildung eine wichtige Rolle.

Für die Entwicklung wirkungsvoller und nebenwirkungsarmer Inhibitoren gegen einzelne Mitglieder der MMP-Familie ist es nötig, die genauen Eigenschaften der einzelnen Enzyme zu kennen, zu verstehen und gegen die verwandten Enzyme abzugrenzen. In diesem Zusam-

menhang sind Kristallstrukturen ein wertvolles Werkzeug, um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Enzymen verstehen zu lernen und die Bindeeigenschaften von spezifischen Inhibitoren zu optimieren. In dieser Arbeit wurden die Kristallstrukturen von den katalytischen Domänen dreier MMPs und einem TIMP aufgeklärt: MMP-12 (Makrophagen Elastase, Metalloelastase), MMP-16 (MT3-MMP) und MMP-13 (Kollagenase-3) und TIMP-2 (gewebespezifischer Inhibitor). Während MMP-12 und -16 den Inhibitor Batimastat (ein Hydroxamsäurederivat) im aktiven Zentrum gebunden haben, wurde die Struktur von MMP-13 im Komplex mit TIMP-2 gelöst.

Die Kristallstruktur der katalytischen Domäne einer inaktiven Mutante (E219A) von humaner MMP-12 (PDB-Eintrag: 1jk3) konnte durch Patterson-Suchmethoden gelöst werden. Die Auflösung von 1.09 Å stellt die höchste erzielte Auflösung aller bisher publizierten MMP-Strukturen dar.

Die MMP-12-Struktur zeigt die typische MMP-Faltung, weist jedoch einige Besonderheiten auf. So liegt der *S-loop* von MMP-12 näher am darunter liegenden  $\beta$ -Faltblatt. Dadurch kommen Seitenketten dieses *loops* (z.B. His172) nahe an das aktive Zentrum und können bei der Substraterkennung eine Rolle spielen.

Die S1'-Tasche von MMP-12 ist ein Tunnel, der sich durch das ganze Enzym hindurch erstreckt und nur im oberen Bereich vom Isobutylrest des gebundenen Batimastat belegt ist.

In diesem S1'-Tunnel befindet sich ein Threonin, das bei anderen MMPs durch ein hochkonserviertes Valin ersetzt ist. Unter allen MMPs ist MMP-12 die einzige, die Substrate mit einem Arginin an P1'-Position umsetzen kann. Das oben beschriebene Thr215 in der MMP-12-Struktur ist an einer Position, an der es Wasserstoffbrücken zu der Guanidiniumgruppe der Argininseitenkette ausbilden kann und dürfte somit der Grund für diese einzigartige MMP-12-Substratspezifität sein.

Ein Vergleich der Substratspezifitäten zeigt, dass MMP-12, wie auch MMP-7 in der Lage ist, das Serpin  $\alpha$ 1-Proteinase Inhibitor ( $\alpha$ 1-PI) am sogenannten *reactive-site loop* zwischen Phe352 und Leu353 zu spalten und damit zu deaktivieren. Es wurde ein Hexapeptid mit der Sequenz Ala-Met-Phe-Leu-Glu-Ala um die Spaltstelle des *reactive-site loops* von  $\alpha$ 1-PI derart modelliert, wie es in die *active-site cleft* von MMP-12 binden würde, bevor es prozessiert wird. Neben der Möglichkeit, sieben Wasserstoffbrückenbindungen zur Hauptkette auszubilden, sind auch viele produktive Interaktionen mit den Seitenketten dieser Sequenz möglich. Charakteristisch für MMP-12 ist die definierte und seitlich begrenzte S3-Spezifitätstasche, die von der N-terminalen Alaninseitenkette dieses Hexapeptids ideal ausgefüllt wird. Die Methioninseitenkette erstreckt sich über die flache hydrophobe S2-Bindungsstelle. Der Phenylring von Phenylalanin bindet in die S1-Tasche, die einem hydrophoben Kanal ähnelt. Der Leucinrest steckt in der hydrophoben S1'-Tasche, während keine geeignete S2'-Tasche für den Glutamatrest gefunden wurde und das C-terminale Alanin die flache, nicht sehr ausgeprägte S3'-Tasche besetzt.

MMP-12 teilt auch seine elastinolytische Eigenschaft mit MMP-7. Neben der Beschränkung der aktiven Form auf die katalytische Domäne besitzen MMP-12 und MMP-7 im Gegensatz zu den meisten anderen MMPs eine sehr hydrophobe Oberfläche. Diese Oberflächencharakte-



ristika sollten - neben den Substratbindetaschen im aktiven Zentrum - entscheidend für die Bindung und Prozessierung des hydrophoben Proteins Elastin sein.

Die Struktur von MMP-16 (MT3-MMP) zeigt die typische MMP-Faltung und ähnelt der Struktur von MMP-14 (MT1-MMP), welche für die Aufklärung der MT3-MMP-Struktur benutzt wurde. Trotz einer hohen Sequenzhomologie zu MT1-MMP ergeben sich einige interessante Unterschiede. So liegt der *loop*, der den  $\beta$ -Strang sV mit der  $\alpha$ -Helix hB verbindet nicht so stark geknickt vor, sondern beschreibt einen größeren Bogen als bei MT1-MMP. Weiterhin ist die *active-site cleft* bei MT3-MMP etwas enger als die von MT1-MMP. Vermutlich liegt das daran, dass bei der MT1-MMP-Struktur TIMP-2 im aktiven Zentrum gebunden ist, welches mehrere Wasserstoffbrücken zu den Rändern der *active-site cleft* ausbildet, während bei MT3-MMP der Inhibitor Batimastat nur wenige Wasserstoffbrücken auszubilden vermag. Der auffälligste Unterschied der beiden MT-MMP-Strukturen liegt in der deutlich anderen Konformation des *MT-loops*. Bei MT3-MMP ist dieser *loop* weit nach vorne in Richtung der *active-site cleft* gebogen.

Da sich die Anzeichen mehren, dass dieser *MT-loop* der MT-MMPs bei der Aktivierung von ProMMP-2 eine wichtige Rolle spielt, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Modelle entwickelt, welche die möglichen Interaktionen zwischen MT3-MMP und ProMMP-2 zeigen. Dabei konnten je nach Spaltstelle intensive Kontakte zwischen den beiden Molekülen nachgewiesen werden, jedoch ist nur bei einem Modell eine Beteiligung des *MT-loops* möglich.

Der Komplex aus humaner MMP-13 (Kollagenase-3) und bovinem TIMP-2 weist einige Besonderheiten gegenüber den bekannten MMP/TIMP-Komplexen auf. Auch die Einzelkomponenten des Komplexes zeigen spezielle Eigenheiten, die vorher nicht beobachtet wurden. So besitzt MMP-13 im Komplex mit TIMP-2 eine etwas engere *active-site cleft* als diejenige der MMP-13, die einen synthetischen Inhibitor im aktiven Zentrum gebunden hat. Vermutlich liegt der Unterschied hier - wie auch bei MMP-16 (MT3-MMP) beschrieben - daran, dass die Bindung von TIMP-2 im aktiven Zentrum die Spalte durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zusammenzieht, während ein kleiner Inhibitor dies nicht vermag. Bei der MMP-13-Struktur aus der vorliegenden Arbeit bildet der N-Terminus eine Salzbrücke zu  $\alpha$ -Helix hC aus, im Gegensatz zur anderen MMP-13-Struktur, bei welcher der N-Terminus an ein benachbartes Enzymmolekül bindet. Die Salzbrücke wird in den anderen Kollagenasen (MMP-1 und MMP-8) als entscheidend für die sog. Superaktivierung angesehen.

Bei einer Überlagerung der beiden Komplexe aus MMP-13/TIMP-2 mit MT1-MMP/TIMP-2 ist zu erkennen, dass sich die TIMP-2-Moleküle allgemein recht ähnlich sind, sich jedoch in einigen Bereichen grundlegend unterscheiden, was die Flexibilität der TIMP-Domänen zueinander und bei der Bindung an eine MMP unterstreicht.

Um das aktive Zentrum von MMP-13 ist TIMP-2 gegenüber dem MT1-MMP/TIMP-2-Komplex deutlich nach unten gekippt und im Uhrzeigersinn gedreht. Diese Anordnung liefert damit weitere Hinweise, wie die universelle Bindung der TIMPs an MMPs und Adamalysine zustande kommt.



## II EINLEITUNG

### II.1 Proteinasen

Proteinasen (proteolytische Hydrolasen) sind Enzyme, die Amidbindungen in Peptiden und Proteinen hydrolysieren können. Die Auswahl der Spaltstelle erfolgt dabei je nach Proteinase mehr oder weniger spezifisch. Sie stellen eine außerordentlich wichtige Klasse von Enzymen in biologischen Systemen dar, weil sie nicht nur für den normalen Abbau von Proteinen sorgen, sondern auch entscheidend an der Regulation von zellulären Prozessen beteiligt sind.

Ohne Proteinasen würde zum Beispiel das komplizierte System der Hämostase nicht funktionieren. Die Proteinasen, die an der Blutgerinnungskaskade beteiligt sind (wie z. B. Thrombin, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, um nur einige zu nennen), besitzen eine hohe Spezifität und müssen präzise reguliert werden. Eine Unterfunktion des hämostatischen Systems resultiert in Bluterkrankheiten, eine Überfunktion führt zu thrombotischen Erkrankungen.

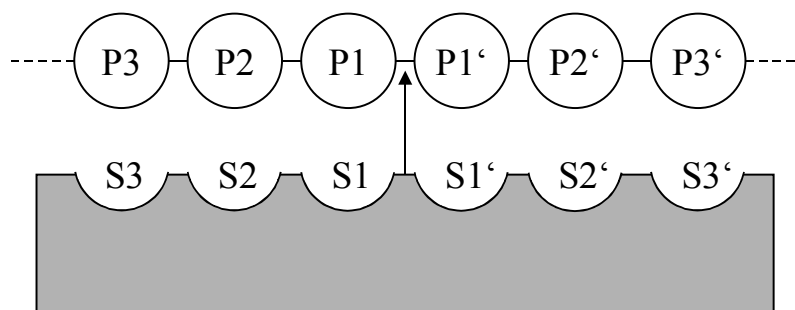
Proteinasen sind auch Schlüsselenzyme in der Differenzierung und Zell-Homöostase. Prominente Vertreter sind die Caspasen, die eine entscheidende Rolle in der Initiation und Ausführung des sogenannten programmierten Zelltods (Apoptose) spielen und daher bei einer ganzen Reihe von Krankheiten, von AIDS über Multiple Sklerose (MS) bis hin zu Krebs, von großer Bedeutung sind.

Die Alzheimersche Krankheit scheint unter anderem auf eine falsche Regulation der am Abbau von  *$\beta$ -Amyloid Precursor Protein (APP)* beteiligten Proteinasen zurückzuführen zu sein.

Das Immunsystem ist darauf angewiesen, dass eingedrungene Substanzen zerlegt werden, um die entstehenden Peptide mittels des MHC-I-Komplexes auf der Zelloberfläche den T-Zellen zu präsentieren. Dabei spielen viele Proteinasen mit geringer Spezifität eine zentrale Rolle.

Bei Parodontitis werden durch die angreifenden Mikroorganismen verstärkt Proteinase (z. B. Gingipain) produziert, die nicht nur die Immunabwehr in Schranken halten, sondern auch das Zahnfleisch und Kieferknochen abbauen, was schließlich zu Zahnausfall führen kann.

Zur Beschreibung der Wechselwirkung von Substrat bzw. Inhibitor mit Proteinasen hat sich die Nomenklatur nach Schechter und Berger (Schechter & Berger, 1967) durchgesetzt, (siehe Abbildung II-1).



**Abbildung II-1:** Ausgehend von der zu spaltenden Stelle eines Peptidsubstrates werden die Aminosäurereste in N-terminaler Richtung mit P1, P2, P3 usw. bezeichnet, in Richtung C-Terminus mit P1', P2', P3' usw.. Die entsprechenden Bindestellen am Enzym (die sogenannten Subsites) werden entsprechend S1, S2, S3 usw. bzw. S1', S2', S3' usw. genannt.

Proteinasen werden abhängig vom Reaktionsmechanismus in 5 Klassen unterteilt. Entsprechend der reaktiven Gruppe, die entscheidend zur Katalyse beiträgt, werden die Enzyme als Serin-, Threonin-, Cystein-, Aspartat- oder Metalloproteinasen bezeichnet. Zudem unterscheidet man Endo- und Exoproteinasen, je nachdem, ob die Spaltung innerhalb der Aminosäuresequenz oder direkt an N- oder C-Terminus des Substrats erfolgt.

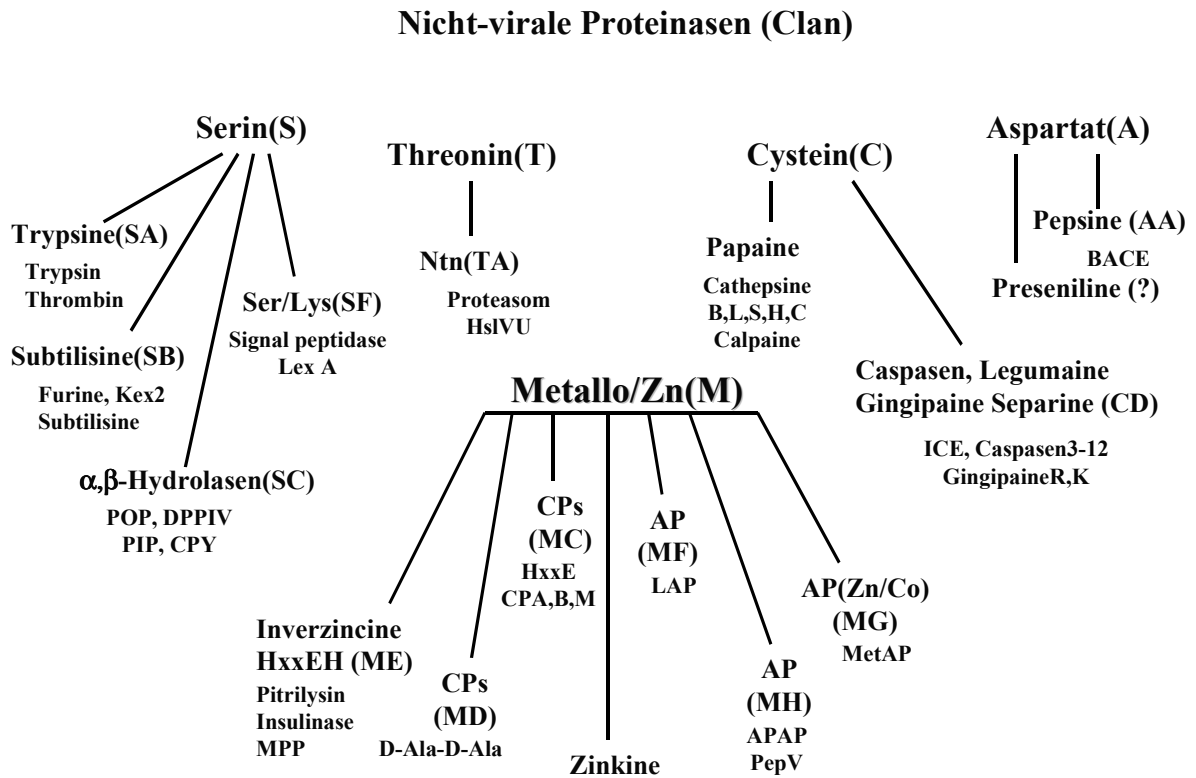


Abbildung II-2: Übersicht der verschiedenen Proteinasenklassen.

## II.2 Metalloproteinasen

Die Metalloproteinasen werden weiter unterteilt. Die Eingruppierung richtet sich nach der Art, wie das aktive Metall komplexiert ist. Als Liganden wurden Histidine, Glutamin-, Asparaginsäuren und Cysteine gefunden. Bei den Gluzinkinen wird das Zink von zwei Histidinen und einem Glutamatrester gebunden, während es bei den Metzinkinen von drei Histidin-Liganden koordiniert wird. Die Konsensussequenz für alle Zinkine lautet HExxH. Dabei sind die beiden Histidine Liganden des "aktiven" Zinks, während der Glutaminsäurerest essentiell für die Aktivität des Enzyms ist. Wenn auch bei den meisten dieser Metalloproteinasen Zink an der Katalyse beteiligt ist, so kann die Hydrolyseaktivität oftmals gesteigert werden, wenn das Zink- durch ein Cobaltion ersetzt wird.

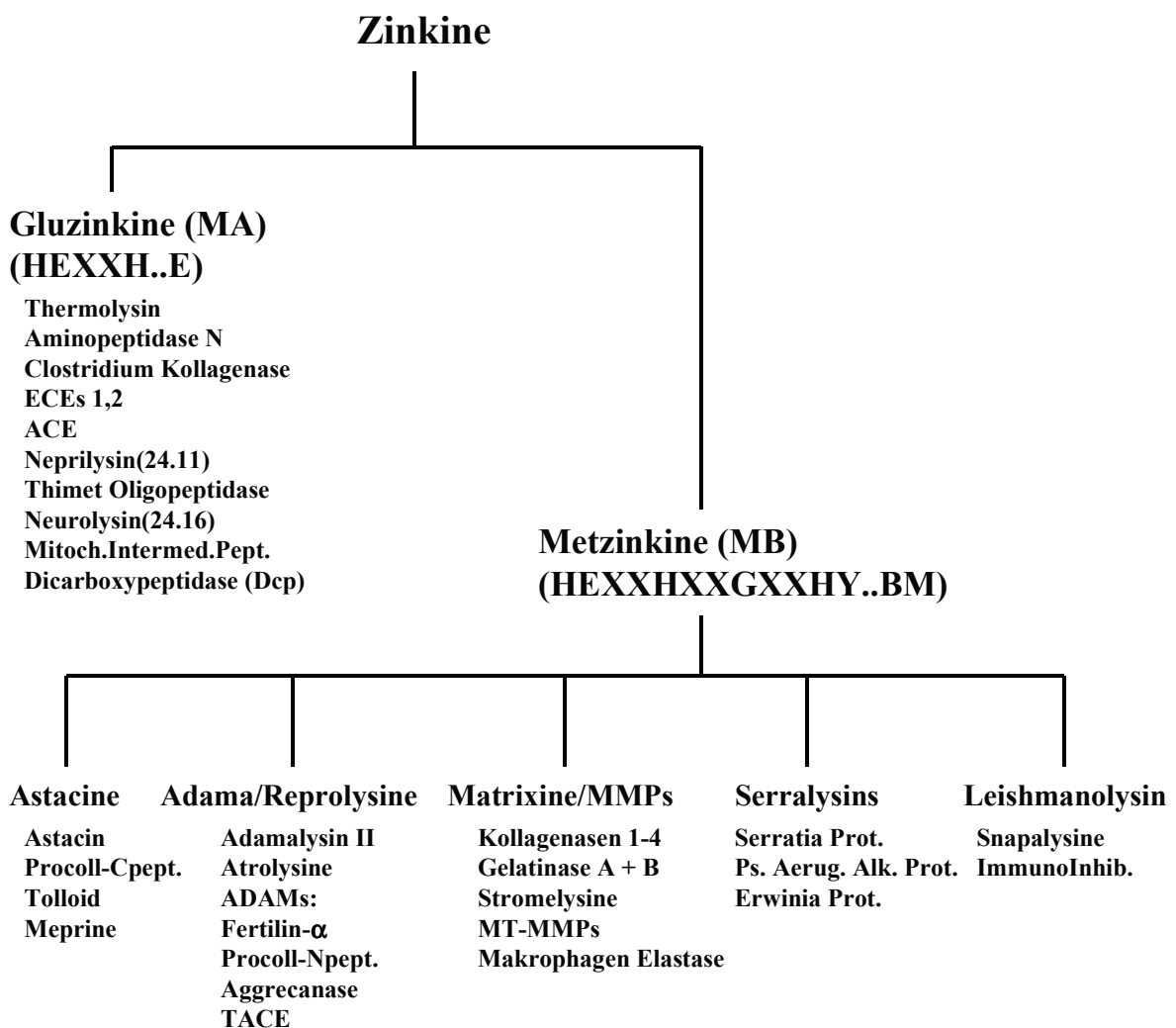
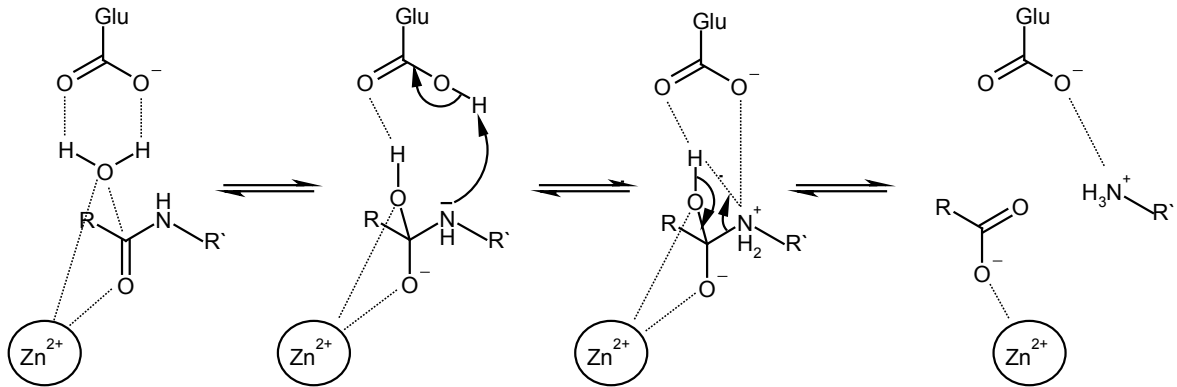


Abbildung II-3: Übersicht über die weitere Untergliederung der Zinkine.

Bei der hydrolytischen Spaltung der Amidbindung eines (Poly-) Peptids spielt ein Wassermolekül die zentrale Rolle. Dieses Wassermolekül wird dabei in der Regel vom sogenannten aktiven Zink und einem benachbarten Glutamat ausgerichtet und polarisiert. Wenn sich nun ein Peptid in geeigneter Konformation an das aktive Zentrum anlagert, kann das polarisierte

Wassermolekül den Carbonyl-Kohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung nukleophil angreifen und über einige Zwischenschritte (siehe Abbildung II-4) zur Hydrolyse des Peptids führen.



**Abbildung II-4:** Reaktionsmechanismus der hydrolytischen Spaltung einer Amidbindung (eines Peptids oder Proteins) durch Metalloproteinasen.

## II.2.1 Gluzinkine

Die charakteristische Sequenz im aktiven Zentrum der Gluzinkine lautet: HExxH...E. Dabei ist die erste Glutaminsäure dieser Sequenz zusammen mit dem Zinkion an der Katalyse beteiligt, während das zweite Glutamat als Zinkligand fungiert.

### II.2.1.1 ACE und Dep

Peptidyl Dipeptidase A oder Angiotensin-Conversions Enzym (ACE, EC 3.4.15.1) ist eine Metallopeptidase, die bei vielen Substraten ein C-terminales Dipeptid abspalten kann. Seine breite Substratspezifität erklärt die verschiedenen Bezeichnungen, die es im Laufe seiner Entdeckung bekam. So wurde es Angiotensin-Conversions Enzym genannt, da es vom physiologisch inaktiven Dekapeptid Angiotensin I ein C-terminales Dipeptid abspaltet und so das Oktapeptid Angiotensin II freisetzt. Angiotensin II ist ein stark blutdrucksteigerndes Hormon, das auf molarer Basis je nach Gefäß 10- bis 40 mal stärker gefäßverengend wirkt als Noradrenalin.

Ein weiterer Name für das Enzym lautet Kininase II, da es Bradykinin, ein gefäßerweiterndes Peptid, durch sequenzielles Entfernen von zwei C-terminalen Dipeptiden inaktiviert. Somit steigert ACE den Blutdruck auf zwei Arten: Direkt via Produktion von Angiotensin II und indirekt via Inaktivierung von Bradykinin, des Gegenspielers von Angiotensin II.

ACE ist ein an der Plasmamembran verankertes Ectoenzym, dessen weitaus größter Teil in den extrazellulären Raum ragt. In Säugetieren gibt es zwei Isoformen von ACE, die beide glycosyliert sind: Eine somatische Form mit einem Molekulargewicht von 140 kDa (human), die in endothelialen, epithelialen und neuronalen Zellen gefunden wird, und eine kleinere Isoform (90 kDa, human), die in Testiszellen vorkommt. Die somatische ACE-Form besteht

aus zwei homologen Domänen, die beide je ein aktives Zentrum besitzen, während die Variante aus Testis nur eine Domäne mit einem aktiven Zentrum besitzt.

Nachdem Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen weltweit gehören und Bluthochdruck eine sehr verbreitete, potenziell gefährliche Krankheit ist, gehört die Inhibierung von ACE zu den interessanten Zielen der Pharmaindustrie. ACE-Inhibitoren, wie zum Beispiel Captopril oder Lisinopril, sind schon viele Jahre auf dem Markt. Jedoch kommt es neben der gewünschten Blutdrucksenkung zu einigen Nebenwirkungen, die vielleicht mit spezifischeren Inhibitoren vermieden werden könnten.

Die Kenntnis der genauen Geometrie der aktiven Zentren von ACE könnte die Basis für die Entwicklung solcher sehr spezifischen Inhibitoren sein.

Da aber ACE nur schwer in größeren Mengen exprimiert werden kann und bislang nicht kristallisiert werden konnte, könnte ein Ausweg aus diesem Dilemma in der Kristallisation eines sehr ähnlichen Enzyms liegen.

Peptidyl Dipeptidase Dcp (Dcp, 77 kDa, EC3.4.15.5) ist die einzige bisher entdeckte C-terminale Exopeptidase in *E. coli* (Conlin & Miller, 1995) und spaltet wie ACE am C-Terminus Dipeptide von mehreren Peptiden und Proteinen ab. Die kleinsten bekannten Substrate sind N-blockierte Tripeptide. Dcp aus *E. coli* ähnelt ACE in seinen katalytischen Eigenschaften und wird bereits in der Evaluierung von Pharmazeutika verwendet, um die Behandelbarkeit von Bluthochdruckkrankheiten zu verbessern.

Trotz einer fehlenden Sequenzhomologie, die dazu führte, dass ACE in M2 und Dcp in M3 gruppiert sind, zeigen beide Enzyme (ACE und Dcp) eine erstaunlich ähnliche Substratspezifität und höchst ähnliche Inhibitionscharakteristika. Nachdem es keine Antikörper von ACE gibt, die auch Dcp inhibieren, besitzen beide Enzyme wohl kaum strukturelle Ähnlichkeiten außerhalb des aktiven Zentrums, sondern vielmehr vergleichbare Peptidbindungs- und Hydrolyseeigenschaften.

## II.2.2 Metzinkine

Auf Basis der Verwandtschaft der Aminosäuresequenz können die Metzinkine unterteilt werden in die Astacine, die Serralysine, die Adamalysine/ADAMs und die Matrix Metalloproteinasen (Matrixine, MMPs) (Jiang & Bond J.S., 1992; Rawlings & Barrett, 1993; Stöcker et al., 1993; Vallee & Auld, 1993). Alle diese Enzyme entwickeln ihre proteolytische Aktivität außerhalb von Zellen. Soweit bekannt ist, handelt es sich bei allen Enzymen um Endopeptidasen. Viele von ihnen sind am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt.

Die Kristallstrukturen von Astacin, Adamalysin II, der katalytischen Domäne der alkalischen Proteinase aus *Pseudomonas aeruginosa* und Kollagenase-1, die als Prototypen ihrer Familien betrachtet werden können, zeigen große Ähnlichkeiten in den Topologien. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wurden diese drei Familien zusammen mit den MMPs 1993 in der Überfamilie der "Metzinkine" (Bode et al., 1993) zusammengefasst. Neben der Konsensussequenz HExxHxxGxxH in der Zinkbindungsregion teilen alle diese Proteine auch eine strikt konservierte - Methionin enthaltende - 1,4- $\beta$ -Schleife (Met-*turn*) (Bode et al., 1993). Für die einzelnen Familien ist die Konsensussequenz entsprechend erweiterbar:

Astacine:	HExxHxxGxxHE...S x MHY,
Adamalysine:	HExxHxxGxxHD...DI M x P,
Serralysine:	HExxHxxGxxHP...S x MSY,
MMPs:	HExxHxxGxxHS...ALM x P.

### II.2.3 Die extrazelluläre Matrix

Höhere Organismen sind aus einer Vielzahl verschiedener und zum Teil hoch spezialisierter Zellen aufgebaut. Diese Zellen sind in Organen bzw. Gewebeverbänden organisiert. Diese biologischen Gewebe bestehen jedoch nicht nur aus Zellen. Einen erheblichen Teil des Gewebavolumens nimmt der Extrazellularraum ein. Dieser wird von einem komplexen Makromolekülgeflecht, der sogenannten extrazellulären Matrix, ausgefüllt. Die extrazelluläre Matrix besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Polysaccharide und Proteine, die von dafür spezialisierten Zellen (z. B. die Chondroblasten im Knorpelgewebe oder die Osteoblasten im Knochen (Mosher et al., 1992)) gebildet und sezerniert werden und sich zu einem strukturierten Maschenwerk zusammenlagern (Labat-Robert et al., 1990; Scott, 1995).

Im Bindegewebe, welches bei Wirbeltieren das Strukturgerüst des Körpers bildet, nimmt die extrazelluläre Matrix oftmals mehr Raum ein, als die Zellen, die sie von allen Seiten umgeben (Leonhardt, 1990). Sie bestimmt damit die physikalischen Eigenschaften des jeweiligen Gewebes. Der Anteil des Bindegewebes am Gesamtgewebe variiert je nach Organtyp sehr stark: Knochen und Haut bestehen fast ausschließlich aus Bindegewebe, das Gehirn weist dagegen sehr wenig dieses Strukturgewebes auf (Piez, 1997; Ruoslahti, 1996).

Auch die zum Aufbau der extrazellulären Matrix verwendeten Makromolekültypen variieren bezüglich ihrer Zusammensetzung und Strukturierung je nach Gewebetyp sehr stark. Insgesamt finden sich in der extrazellulären Matrix weit über 100 verschiedene Makromolekültypen, die eine sehr große funktionelle Varianz ermöglichen (Ayad & Boot-Handford, 1998; Woessner, 1998). So gibt es zum Beispiel die durch Kalzifizierung sehr harten Matrixstrukturen von Knochen und Zähnen, die durchsichtige Matrix der vorderen Augenhornhaut oder die sehr zugfesten seilartigen Sehnenstrukturen (Ayad & Boot-Handford, 1998).

Eine Sonderform der extrazellulären Matrix, die sogenannte Basalmembran, findet sich an allen Grenzflächen zwischen Epithelzellschichten und den darunter liegenden Bindegeweben. Sie dient der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des Gewebes und erfüllt eine Vielzahl weiterer wichtiger Funktionen: So kann sie zum Beispiel im Nierenglomerulus oder in den Lungenbläschen als hochselektiver Substanzfilter dienen. Des Weiteren bestimmt sie die Polarität der angrenzenden Zellen. Sie beeinflusst damit den Zellstoffwechsel, die Proteinzusammensetzung in benachbarten Plasmamembranen und die Differenzierung dieser Zellen. Zusätzlich hat sie eine sehr wichtige Rolle in der Kontrolle der Auswanderung von Leukozyten aus dem Blut (Hunt et al., 1996; Pakianathan, 1995; Ratner, 1992).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Aufrechterhaltung der Integrität der extrazellulären Matrix für die Struktur und Funktion eines lebenden Organismus absolut nötig ist.

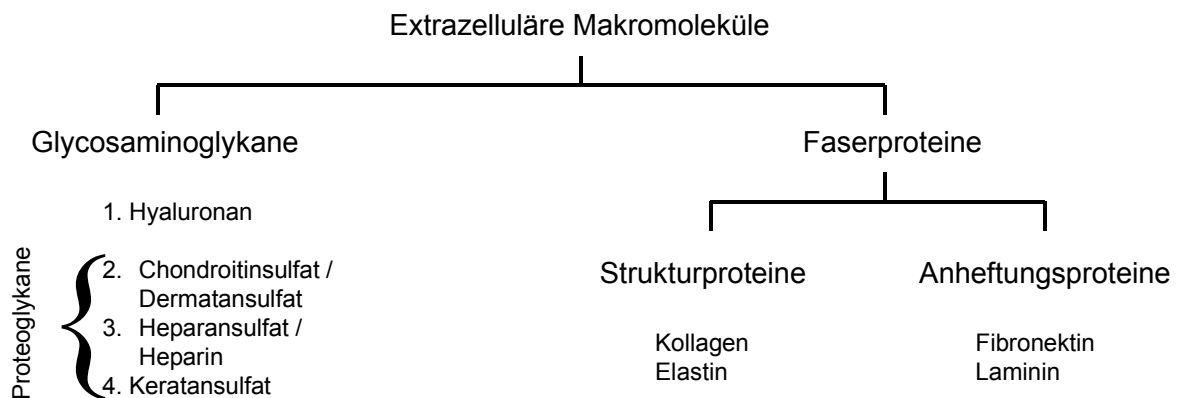


**II.2.3.1 Bestandteile der extrazellulären Matrix**

Die Makromoleküle der extrazellulären Matrix lassen sich in zwei Hauptklassen einteilen: Glycosaminoglykane und Faserproteine (Ayad & Boot-Handford, 1998; Scott, 1995).

Glycosaminoglykane sind Polysaccharide, die meist gekoppelt an Proteine, also als Proteoglykane, vorliegen. Sie bilden aufgrund ihrer Ladungseigenschaften eine stark wasserhaltige, gelartige Grundsubstanz, in der die Faserproteine eingebettet sind und durch die Ionen, Nährstoffe, Metabolite und Botenstoffe diffundieren können (Oldberg et al., 1990).

Die Klasse der Faserproteine lässt sich nochmals in Strukturproteine, wie z. B. Kollagen und Elastin einerseits und in Adhäsionsmoleküle, wie z. B. Fibronectin und Laminin andererseits, unterteilen: Kollagenfasern, die den Hauptproteinbestandteil der extrazellulären Matrix darstellen, tragen zur Struktur und Widerstandsfähigkeit, Elastinfasern dagegen zur Elastizität bei (Rosenbloom et al., 1993) (siehe Abbildung II-5). Die Adhäsionsmoleküle vermitteln den Kontakt zwischen der extrazellulären Matrix und den in sie eingebetteten bzw. den sie umgebenden Zellen (Sechler et al., 1998).



**Abbildung II-5:** Komponenten der extrazellulären Matrix

Die beschriebene Komplexität der extrazellulären Matrix setzt ein aufwändiges System voraus, welches für den zeitlich und räumlich koordinierten Auf-, Um- und Abbau der Matrixkomponenten sorgt.

Auf- und Abbauprozesse sind gleichermaßen wichtig bei der Entwicklung des Organismus (z. B. Abbau der Schwimmhäute bei der Embryoentwicklung). Die extrazelluläre Matrix stellt also kein statisches Gebilde dar, sondern befindet sich in dauerndem Umbau.

Für die Reorganisation der extrazellulären Matrix sind bislang mehrere Wege bekannt. So können strukturelle Makromoleküle des interstitiellen Bindegewebes über einen MMP-abhängigen, einen Plasmin-abhängigen oder über einen Leukozyten-Serinproteinasen-abhängigen Stoffwechselweg abgebaut werden (Birkedal-Hansen et al., 1993). In manchen Fällen kommt hier ein weitgehend von den anderen Prozessen abgekoppelter phagozytotischer Weg hinzu. Dieser beruht auf dem intrazellulären Verdau internalisierter Materials durch lysosomale Cathepsine (Melcher & Chan, 1981). Mineralisierte Matrices der Knochensubstanzen werden durch einen völlig anderen Mechanismus umgesetzt: Dieser sog-

nannte osteoklastische Stoffwechselweg basiert auf der Aktivität saurer Cysteinproteinasen in einer abgeschlossenen Mikroumgebung auf der Matrixoberfläche (Vaes et al., 1992).

Welcher der erwähnten Mechanismen beim Abbau eines spezifischen Makromoleküls zum Tragen kommt, hängt von mehreren Faktoren ab, die in erster Linie in der Struktur der Matrix begründet sind.

Diese extrazelluläre Proteolyse findet in einer Umgebung statt, in der ein molarer Überschuss an Plasma- und zellulären Proteinaseinhibitoren herrscht. Daher ist die Kompartimentalisierung dieser Prozesse absolut nötig. Das bedeutet, dass das abzubauen Areal von der Umgebung abgegrenzt werden muss, bzw., dass die als aktive Komponenten beteiligten Proteinase selektiv an ihren Wirkungsort transportiert und dort auch gebunden werden müssen. Die Kompartimentbildung wird am einfachsten verständlich im Falle des erwähnten osteoklastischen Knochenabbaus: Hier wird durch eine vorübergehende Versiegelung der Knochenoberfläche eine abgeschlossene Umgebung geschaffen, innerhalb derer die Aktivität von sauren Cysteinproteinasen möglich ist (Vaes et al., 1992). Solche lokalen Kompartimentalisierungen werden dadurch unterstützt, dass die meisten Zellen die Abgabe der aktiven Komponenten durch vektorielle Transportmechanismen selektiv steuern können (Unemori et al., 1990).

Ein weiterer Kontrollmechanismus ist die räumliche Fixierung der am Matrixumbau beteiligten Enzyme an ihrem Wirkungsort. So findet man oftmals eine sehr selektive Bindung von Proteinase an ihre Substrate. Beispiele hierfür sind die Bindung von Plasmin an Fibrin oder die sehr spezifische und von der katalytischen Aktivität unabhängige Wechselwirkung der Gelatinasen mit Kollagen (Allan et al., 1995; Banyai et al., 1996). Weiterhin spielt bei solchen Lokalisierungsprozessen oftmals die Rezeptor-vermittelte Affinität zu Zelloberflächen eine Rolle: So findet man zum Beispiel den Urokinasetyp-Plasminogenaktivator und auch verschiedene MMPs lokalisiert auf der Oberfläche von Zellen (Knäuper & Murphy, 1998; Vassalli et al., 1985; Vassalli & Pepper, 1995).

Die wahrscheinlich wichtigsten Prozesse, die zum Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix führen, werden durch die Gruppe der MMPs vermittelt.

## **II.2.4 Matrix Metalloproteinasen**

Als Gross & Lapiere (1962) die erste Kollagenase (MMP-1) aus Kaulquappenschwänzen während der Amphibienmetamorphose isolierten, konnten sie die Bedeutung dieses interessanten Enzyms noch nicht richtig einschätzen. Erst später zeigte sich, dass Matrix Metalloproteinasen (MMPs) entscheidend bei invasiven Prozessen, die üblicherweise mit dem Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) verbunden sind, beteiligt sind. Der Begriff der Invasivität beschreibt die Fähigkeit von Zellen, anatomische Grenzen wie Basalmembranen, interstitielles Stroma und interzelluläre Verbindungen, welche die verschiedenen Gewebeteile zusammenfügen, zu überschreiten. Invasive Prozesse finden sowohl im Embryo- als auch im Erwachsenenstadium statt, z. B. während der Trophoblastenimplantation, während der Bildung der Blutgefäße (Angiogenese) und dem Eindringen von Leukozyten in das extrazelluläre Gewebe bei Entzündungen und Wundreparaturprozessen. Andere invasive

Prozesse ereignen sich unter pathologischen Bedingungen, wie bei rheumatoider Arthritis und Tumorentwicklung.

#### II.2.4.1 Domänenstruktur der MMPs

Alle MMPs werden als Prä-Proenzyme synthetisiert und in den meisten Fällen als inaktive Proenzyme sezerniert. Eine etwa 80 Aminosäuren lange Propeptiddomäne ist für die Latenz der MMPs verantwortlich. Diese Domäne besitzt ein stark konserviertes Motiv von acht Aminosäuren (PRCGVPD) mit einem ungepaarten Cystein. Dieses Cystein bindet an das Zinkion im aktiven Zentrum der MMP.

Dadurch kann das für die katalytische Aktivität notwendige H<sub>2</sub>O-Molekül aus sterischen Gründen nicht in die richtige Position gelangen. Zudem besetzt das Peptid das aktive Zentrum in umgekehrter Orientierung wie ein Substrat. Zusammen mit dem Rest der Prodomäne wird somit eine Blockade des Substratzugangs in das aktive Zentrum erreicht. Dieser Mechanismus wird als *cysteine switch* (Springman et al., 1990; van Wart & Birkedal-Hansen, 1990) in II.2.4.3 beschrieben.

Auf die Prodomäne folgt die katalytische Domäne mit etwa 170 Aminosäuren. Die Eigenschaften der katalytischen Domäne werden später ausführlicher diskutiert.

MMP-2 und MMP-9 (Gelatinase A und -B) besitzen einen Einschub von 175 Aminosäuren in der katalytischen Domäne, der in drei Domänen unterteilt ist. Diese Domänen sind homolog zum Typ II-Motiv der kollagenbindenden Domäne von Fibronectin. Dieser Fibronectin-ähnliche Teil der Gelatinasen scheint eine große Rolle bei deren Substratspezifität gegenüber Typ IV Kollagen und Gelatin zu spielen (Overall, 2001).

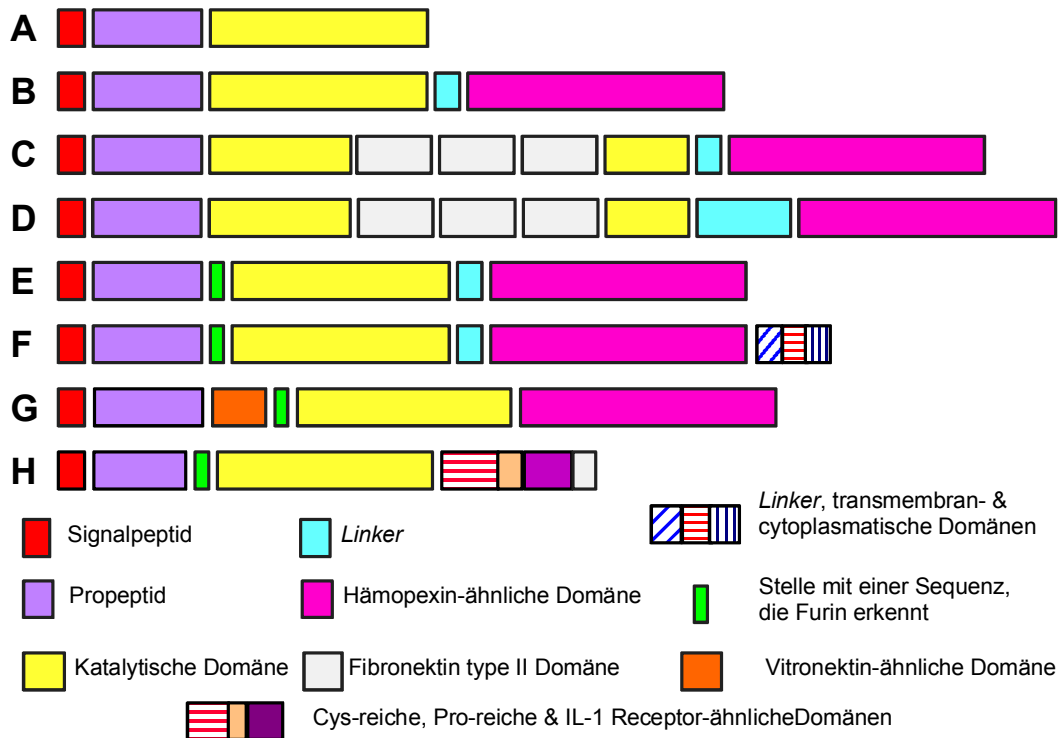
Fast alle Mitglieder der MMP-Familie verfügen außerdem über eine Hämpexin-ähnliche Domäne, die Sequenzhomologien zu Hämpexin (Faber et al., 1995) und zu Vitronectin (Knäuper et al., 1993a) aufweist. Die Domäne besteht aus ca. 200 Aminosäuren und besitzt eine vierfache interne Sequenzwiederholung von jeweils ca. 45 Aminosäuren. Sie hat die Form eines vierblättrigen Propellers. Jedes Propellerblatt besteht aus vier antiparallelen  $\beta$ -Strängen und einer  $\alpha$ -Helix (Gomis-Rüth et al., 1996).

Dieser Sequenzabschnitt spielt bei der Wechselwirkung mit den jeweiligen Substraten eine wichtige Rolle: Wird die Hämpexin-ähnliche Domäne künstlich entfernt, so bleibt zwar die katalytische Aktivität erhalten, die Substratspezifität wird allerdings in den meisten Fällen verändert (Murphy & Knäuper, 1997; Sanchez-Lopez et al., 1993). So konnte gezeigt werden, dass Kollagenasen ohne die Hämpexin-ähnliche Domäne nicht mehr in der Lage sind, tripelhelikales Kollagen Typ I, II und III zu spalten, aber sehr wohl ihre Gelatinaseaktivität behalten und auch weiterhin synthetische Substrate (DNP-Peptid, Mca-Peptid) spalten können (Knäuper et al., 1993b; Murphy et al., 1992). Eine weitere Funktion der Hämpexin-ähnlichen Domäne ist die Beteiligung an der Bindung von spezifischen Inhibitoren der MMPs, den TIMPs (*Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases*) (siehe Kapitel II.2.4.6).

Die exakte Funktion der Linker-Domäne, welche die katalytische mit der Hämopexin-ähnlichen Domäne verbindet, ist unklar. Auffällig ist der hohe Anteil an Prolin in dieser Domäne, die im Allgemeinen eine variable Länge und Aminosäurezusammensetzung besitzt. Basierend auf Modelling-Experimenten wird eine Wechselwirkung mit tripelhelikalem Kollagen vermutet. Bei MMPs, die in der Lage sind, solch fibrilläres Kollagen zu spalten, weist die Linker-Domäne eine relativ konservierte Aminosäuresequenz und Länge auf.

**Tabelle II-1:** Mitglieder der MMP-Familie und deren Domänenzusammensetzung. MMP-4, -5, -6, und -27 existieren nicht. Zur Domänenzusammensetzung siehe Abbildung II-6.

<b>MMP</b>	<b>Trivialname</b>	<b>Domänen- zusammensetzung</b>
Kollagenase-1	MMP-1	B
Gelatinase A	MMP-2	C
Stromelysin-1	MMP-3	B
Matrilysin	MMP-7	A
Kollagenase-2	MMP-8	B
Gelatinase B	MMP-9	D
Stromelysin-2	MMP-10	E
Stromelysin-3	MMP-11	E
Makrophagen Elastase	MMP-12	B
Kollagenase-3	MMP-13	B
MT1-MMP	MMP-14	F
MT2-MMP	MMP-15	F
MT3-MMP	MMP-16	F
MT4-MMP	MMP-17	F
Kollagenase-4 (Xenopus)	MMP-18	B
(Kein Trivialname)	MMP-19	B
Enamelysin	MMP-20	B
XMMP (Xenopus)	MMP-21	G
CMMP (Huhn)	MMP-22	B
(Kein Trivialname)	MMP-23	H
MT5-MMP	MMP-24	F
MT6-MMP	MMP-25	F
Endometase	MMP-26	A
Epilysin	MMP-28	E



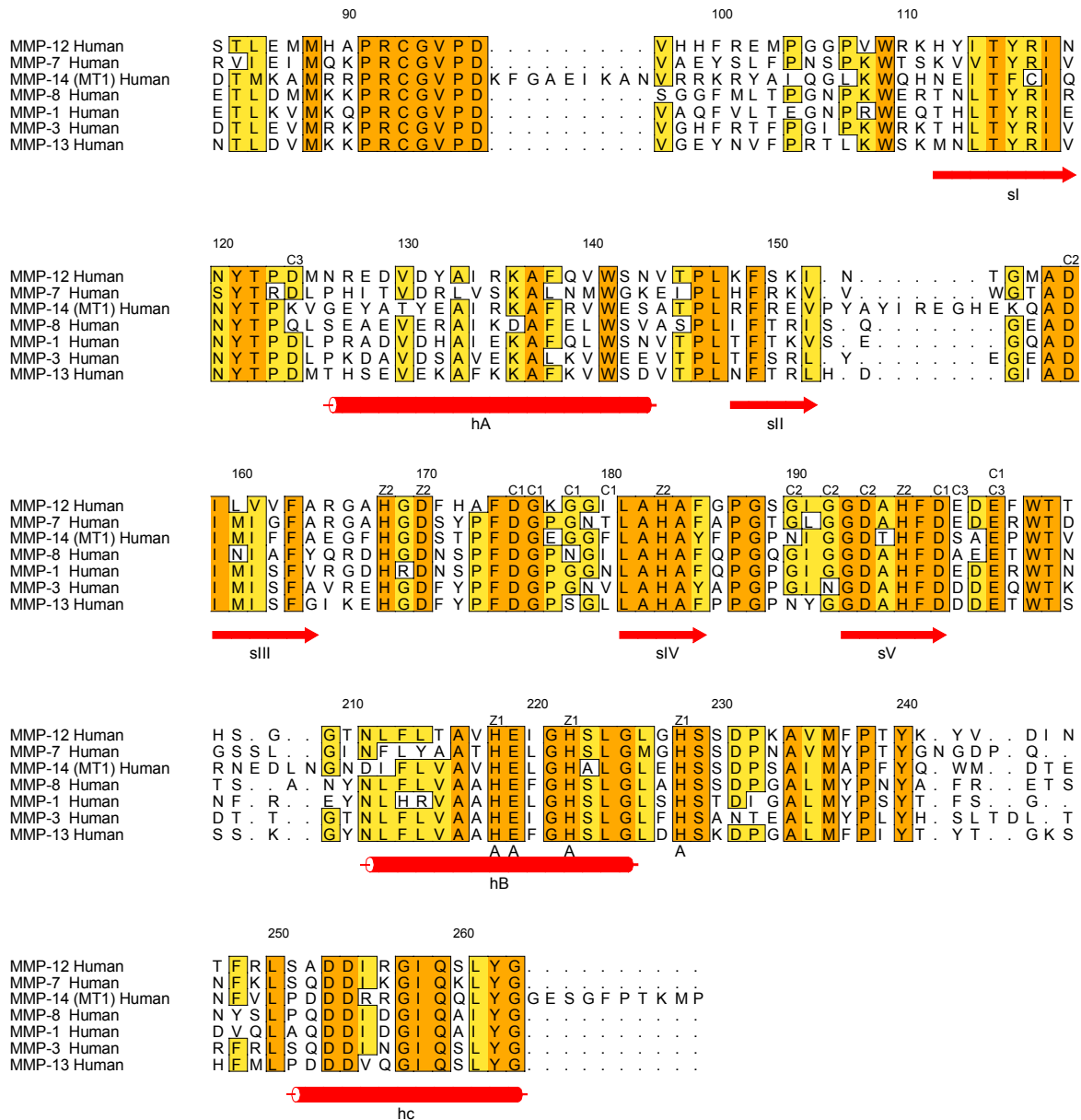
**Abbildung II-6:** Schematische Darstellung der Domänenzusammensetzung der MMP-Familie.

### II.2.4.2 Untergruppen der MMP-Familie

Die MMP Familie umfasst derzeit 21 humane MMPs (MMP-1 bis MMP-28, wobei die Nummern -4, -5, -6 und -27 nicht existieren und MMP-18, MMP-21 und MMP-22 nicht aus menschlichem Gewebe stammen). Die Mitglieder dieser ständig wachsenden Familie werden aufgrund ihrer funktionellen und strukturellen Eigenschaften in weitere Untergruppen eingeteilt:

1. Die Minimal-MMPs: MMP-7 und -26 (Matrilysin und Endometase). Diese beiden MMPs besitzen keine Hämapexin-ähnliche Domäne und bestehen im aktiven Zustand nur aus der katalytischen Domäne.
2. Die Kollagenasen 1-3 (MMP-1, -8-, und -13), die in der Lage sind, interstitielles Kollagen des Typs I und III mit Hilfe ihrer Hämapexin-ähnlichen Domäne abzubauen. Kollagenase 4 (MMP-18) aus *Xenopus* hat noch kein humanes Äquivalent und wird deshalb bei den oben genannten 21 humanen MMPs nicht mitgezählt.
3. Die Gelatinasen A und B (MMP-2 und -9) mit dem 170 Reste langen Einschub in der katalytischen Domäne.
4. Die Stromelysine 1 und 2 (MMP-3 und -10).
5. Die membran-gebundenen sogenannten MT-MMPs -1, -2, -3, -5 (MMP-14, -15, -16, -24), die C-terminal der Hämapexin-ähnlichen Domäne eine Transmembran-Helix und eine cytosolische Domäne besitzen, bzw. im Fall von MT4-MMP und MT6-MMP stattdessen mit einem GPI-Anker-Motiv versehen sind.

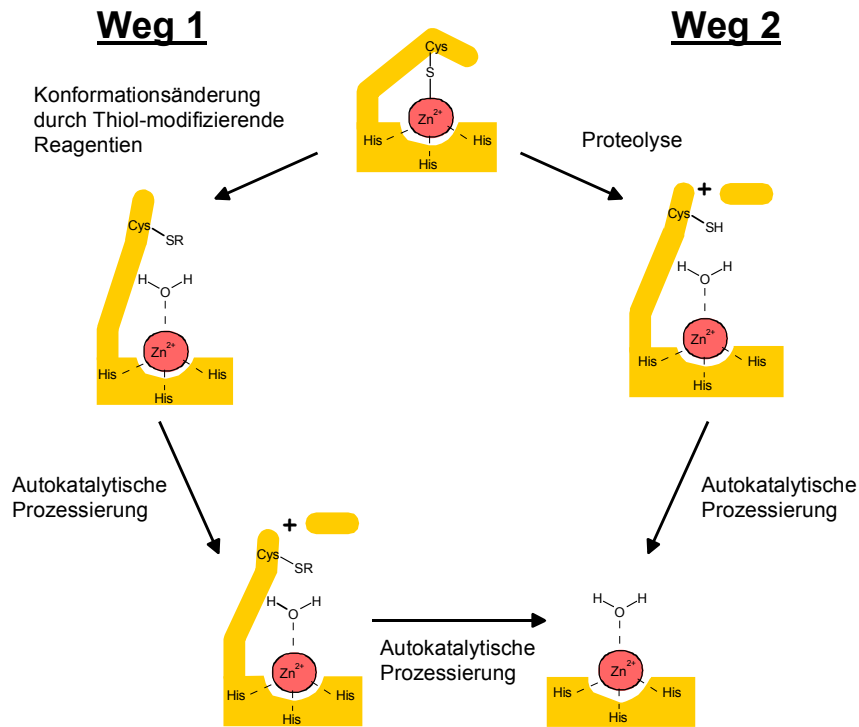
6. Eine Gruppe mit divergierenden Eigenschaften, zu denen MMP-11 (Stromelysin 3), MMP-12 (Makrophagen Elastase), MMP-19 (RASI-I), MMP-20 (Enamelysin), MMP-23 und MMP-28 (Epilysin) zu zählen sind. Der Name Stromelysin 3 für MMP-11 ist irreführend, da es keinen Anlass gibt, dieses Enzym etwa aufgrund einer verwandten Domänenstruktur, Aminosäuresequenz, oder überlappender Substratspezifitäten den beiden anderen Stromelysinen zuzuordnen. Zu Beginn dieser Arbeit waren die Strukturen der katalytischen Domänen von fünf MMPs bekannt, eines davon, MMP-1 sogar einschließlich der Hämopexin-ähnlichen Domäne (vgl. Abbildung II-7).



**Abbildung II-7:** Strukturbasiertes Sequenzalignment der katalytischen Domänen ausgewählter MMPs. Die Pfeile ( $\beta$ -Stränge) und Zylinder ( $\alpha$ -Helices) beschreiben die Sekundärstruktur von MMP-12 aus der vorliegenden Arbeit.

### II.2.4.3 Aktivierung und Regulation

Im Gegensatz zu den anderen Metzinkinen ist die Aktivierung des latenten Proenzym zum aktiven Enzym bei den MMPs relativ gut untersucht. Das Propeptid legt sich in die *active-site cleft* und bindet über ein einzeln stehendes hoch konserviertes Cystein an das Zink des aktiven Zentrums. Die Aktivierung verläuft dann über den sogenannten *cysteine switch* Mechanismus, der in Abbildung II-8 beschrieben ist.



**Abbildung II-8:** Im Zymogen ist das Protein so gefaltet, dass das ungepaarte Cystein der Prodomäne an das Zinkion des aktiven Zentrums bindet. Somit ist die proteolytische Aktivität der MMPs blockiert, weil die Assoziation des für die proteolytische Wirkung notwendigen Wassermoleküls an das Zinkion verhindert ist. Der erste Schritt der Aktivierung der MMPs durch thiolreaktive Substanzen (Weg 1) besteht in der Unterbrechung der Cystein-Zn<sup>2+</sup>-Wechselwirkung. Im folgenden Schritt kann das MMP-Intermediat autoproteolytisch die auf die PRCDVPD-Region folgende Peptidsequenz abspalten. Dann schließt sich die autoproteolytische Abspaltung des restlichen Propeptids an. Während der Aktivierung von MMPs wird das Propeptid meist schrittweise in sogenannten *bait*-Regionen gespalten. Dadurch wird die Interaktion zwischen dem Cystein und dem Zinkion fortlaufend destabilisiert. Dies ermöglicht weitere proteolytische Spaltungen, bevor der letzte, oftmals autoproteolytische Schritt, das autoinhibitorische Propeptid entfernt (Nagase, 1997). Erfolgt die Aktivierung durch Serin-Proteinasen (Weg 2), so wird ein N-terminales Peptid vor der konservierten PRCGVPD-Region proteolytisch entfernt. Eine darauf folgende Konformationsänderung destabilisiert die Bindung des restlichen Propeptids im aktiven Zentrum, der Cystein-Rest des Propeptids löst sich vom Zn<sup>2+</sup>, und an seine Stelle tritt ein Wassermolekül. Dieses MMP-Intermediat spaltet daraufhin autoproteolytisch das restliche Propeptid ab und wird so zur vollständig aktiven MMP.

Ein anderes mit der Aktivierung zusammenhängendes Phänomen ist die bei den beiden Kollagenasen MMP-1 und MMP-8 beobachtete "Superaktivierung". Dabei bildet der N-Terminus der katalytischen Domäne eine Salzbrücke zu einem strikt konservierten Asp in der C-terminalen  $\alpha$ -Helix. Die Salzbrücke kann nur dann gebildet werden, wenn der N-Terminus die

richtige Länge besitzt. So ergibt sich z. B. eine ca. 3,5 fache Aktivität für die als Phe79-MMP-8 bezeichnete Variante im Vergleich zur Met80-MMP-8 Form (Knäuper et al., 1993b).

Aufgrund ihrer starken proteolytischen Eigenschaft ist es notwendig, dass die Aktivität der MMPs exakt reguliert wird. Die Regulation erfolgt auf transkriptionaler Ebene durch eine genau gesteuerte Aktivierung der als inaktive Zymogene sezernierten MMPs sowie durch ein fein balanciertes Gleichgewicht zwischen den aktiven Proteinasen und ihren physiologischen Inhibitoren (den TIMPs). Diese Inhibitoren kann man in zwei Klassen unterteilen:

1. Zur ersten Klasse gehören die TIMPs, welche die MMPs spezifisch hemmen. Zur Zeit sind vier TIMPs (TIMP-1 bis -4) bekannt, wobei TIMP-4 erst wenig erforscht ist (Greene et al., 1996). TIMP-1 und -2 werden in löslicher Form sezerniert, während TIMP-3 assoziiert an die extrazelluläre Matrix vorliegt (siehe II.2.4.6).
2. Zur zweiten Klasse gehört die Hemmung durch nicht spezifische Inhibitoren, wie z. B.  $\alpha_2$ -Makroglobulin. Diese unspezifische Hemmung spielt z. B. eine Rolle bei verschiedenen Entzündungsprozessen (Birkedal-Hansen et al., 1993; Cawston, 1996). Die hauptsächlich im Serum vorkommenden unspezifischen Inhibitoren sind dort jedoch nur in begrenztem Maße vorhanden (Nagase, 1997).

#### II.2.4.4 Substrate und physiologische bzw. pathologische Prozesse

Eine Liste der *in vitro* erkannten und gespaltenen Matrixsubstrate ist für die meisten MMPs mittlerweile so lang, dass es nicht sinnvoll erscheint, diese Listen als relevant für die *in vivo* Situation zu betrachten. Weiterhin gibt es nur sehr wenige Untersuchungen, die zeigen, dass ein bestimmtes Substrat auch *in vivo* tatsächlich von der jeweiligen MMP gespalten wird. Oftmals gibt es große Diskrepanzen zwischen der konkreten Spaltstelle eines Matrixsubstrates *in vitro* und den beobachteten Spaltprodukten *in vivo*. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Spaltung des Knorpelproteoglykans Aggrecan. Der Abbau dieses Makromoleküls ist einer der wichtigen pathologischen Degradationsprozesse bei Rheumatoider- und Osteoarthritis (Lark et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass MMP-3 (Stromelysin-1) Aggrecan sehr schnell umsetzen kann und dass der Gehalt dieser Metalloproteinase im arthritischen Knorpel erhöht ist (Dean et al., 1989; Gravallese et al., 1991; Walakovits et al., 1992). Aus diesem Grunde wurde lange angenommen, dass MMP-3 eine zentrale Rolle bei der Pathologie der Osteoarthritis zukommt. In späteren Analysen wurde jedoch gezeigt, dass auch andere MMPs genau dieselbe Reaktion durchführen können (Fosang et al., 1996).

Dieses Beispiel soll zeigen, wie schwierig es ist, die wirklich relevanten Substrate für einzelne Mitglieder der MMP-Familie zu determinieren. Manche Autoren gehen heute sogar so weit, zu sagen, dass über die natürlichen Substrate der MMPs nahezu nichts gesichert bekannt ist (Woessner, 1998).

Neben den Molekülen der extrazellulären Matrix wurden in den letzten Jahren immer mehr Substratmoleküle für MMPs gefunden, die keine Strukturmoleküle der extrazellulären Matrix darstellen. Dazu gehören Serinproteinaseinhibitoren, wie  $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) und  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin, oder Bindeproteine für Wachstumsfaktoren, wie das IGF-Bindeprotein 3 (Desrochers et al., 1991; Gronski et al., 1997; Ohuchi et al., 1997; Pei et al., 1994). Des



Weiteren gibt es Hinweise, dass die proteolytische Bildung des sehr selektiv wirkenden Angiogeneseinhibitors Angiostatin von MMPs katalysiert wird (Cornelius et al., 1998; Dong et al., 1997; Patterson & Sang, 1997).

Die physiologische Relevanz der genannten Spaltung von Nicht-Matrixmolekülen durch MMPs ist noch weitgehend unklar. Es zeigt sich jedoch, dass den MMPs höchstwahrscheinlich eine weitergehende Bedeutung zukommt, als noch vor wenigen Jahren angenommen wurde. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die meisten dieser neuen Substrate regulatorische Moleküle in Prozessen darstellen, die schon zuvor mit MMP-Aktivität korreliert wurden. Bisher wurde jedoch angenommen, dass sich ihre Aktivität hauptsächlich auf die Umsetzung von Strukturmolekülen beschränkt.

**Tabelle II-2:** Die physiologischen und pathologischen Bedeutungen von Matrix Metalloproteinasen. Ein vorgestelltes "+" bedeutet, dass die jeweilige Erkrankung mit einer Erhöhung der proteolytischen Aktivität verbunden ist, ein "-" mit einer Erniedrigung. Ein "+/-" soll verdeutlichen, dass diese Zusammenhänge noch nicht geklärt sind bzw. dass eine Abhängigkeit vom Krankheitsstadium festgestellt, oder dass für einzelne MMPs unterschiedliches Verhalten gezeigt wurde. Adaptiert nach (Mauch, 2000; Woessner, 1998).

<b>Normal</b>	<b>Pathologisch</b>
<b>Entwicklung</b>	<b>Gewebestörung</b>
Blastozysten Implantation	+ Rheumatoide Arthritis
Embryonalentwicklung	+ Osteoarthritis
Nervenwachstum	+ Tumorwachstum
Knorpelabbau in Wachstumsplatten	+ Metastasierung
Knochenwachstum	+ Decubitus Geschwür
Zahnschmelzreifung	+ Cornea Geschwür
Zahnbildung	+ Magengeschwür
	+ Zahnerkrankungen
<b>Reproduktion</b>	<b>Fibrotische Erkrankungen</b>
Endometrischer Zyklus	+/- Leberzirrhose
Ovulation	- Fibrotische Lungenerkrankungen
Luteolyse	- Otosclerose (Mittelohrverknöcherung)
Cervix Dilatation	+/- Arteriosklerose
Postpartum Uterusrückbildung	+ Multiple Sklerose
Rückbildung der Brustdrüse	
Umbau fötaler Membranen	
<b>Erhaltung</b>	<b>Schwächung der Matrix</b>
Knochenumbau	+ Erweiterte Kardiomyopathien
Haarfollikelwachstum	+ Epidermolysis Bullosa
Wundheilung	+ Aortische Aneurysmen
Angiogenese	
Apoptose	
Nervenregeneration	
Makrophagenfunktion (z. B. Migration)	
Neutrophilenfunktion (z. B. Migration)	

Es bleiben viele Unklarheiten bezüglich der natürlichen Substrate der einzelnen MMPs. Trotz dieser Einschränkung steht die große physiologische und pathophysiologische Bedeutung der einzelnen Mitglieder der MMP-Familie außer Frage. Tabelle II-2 zeigt eine Übersicht der biologischen und pathologischen Prozesse, bei denen von einer wichtigen oder sogar zentralen Rolle der MMPs ausgegangen wird.

#### II.2.4.5 Synthetische MMP-Inhibitoren

Die Hemmung von MMPs ist schon seit 1980 ein anerkanntes Ziel in der pharmazeutischen Forschung. Anfänglich wurde die Therapie von Arthritis für das wichtigste Ziel dieser Inhibitoren angesehen. Jedoch hat zunehmend die Krebstherapie an Bedeutung gewonnen.

Wie auch bei anderen Metalloproteinasen ist die MMP-Hemmung verknüpft mit einer Bindung des Inhibitors an das katalytisch aktive Zinkion, wobei das essentielle Wassermolekül, das vom *active-site*-Glutamat und Zinkion gebunden ist, verdrängt werden kann. Ein Inhibitor muss also über eine funktionelle Gruppe verfügen, die an das Zinkion binden kann. Einige chemische Klassen sind dazu in der Lage, wie z. B. Carboxylate, Hydroxamate, Thiole, Inhibitoren auf Phosphorbasis, Sulfodiimine, etc. Die Inhibitoren mit der höchsten Bindungsaffinität sind die Hydroxamate. Thiole binden 20- bis 50fach weniger und Carboxylate/Phosphonate 100- bis 2000fach weniger stark. Die Sequenz um eine bekannte Spaltstelle eines Substrats wird dabei oft als Ausgangspunkt für peptidische Inhibitoren genommen und dann entsprechend modifiziert. Ein prinzipielles Problem, das diese Gruppe von Inhibitoren zeigt, ist die orale Verfügbarkeit. In einigen Fällen wurde dieses Problem gelöst, allerdings geht der Trend inzwischen in Richtung von nicht-peptidischen Inhibitoren, die diesbezüglich bessere Eigenschaften zeigen. Die Suche nach spezifischen Inhibitoren wurde dabei durch strukturelle Information über die aktiven Zentren von MMPs unterstützt.

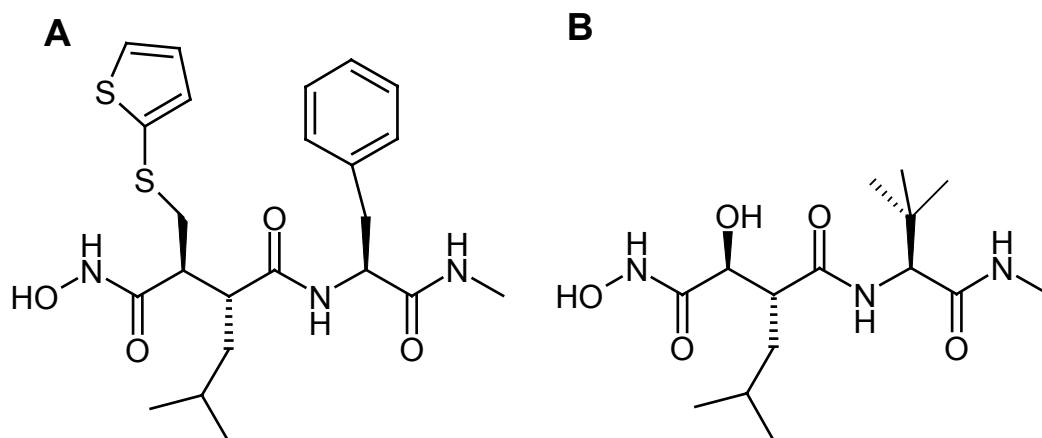


Abbildung II-9: Strukturformeln von Batimastat (A) und Marimastat (B).

Die beiden Breitband-MMP-Inhibitoren Batimastat und Marimastat (beides Hydroxamat-inhibitoren) waren die ersten MMP-Inhibitoren, die Tests in klinischen Phasen zur Behandlung von malignen Tumoren erreicht haben. Jedoch mussten beide klinischen Untersuchungen

wegen geringer Wirksamkeit bei starken Nebenwirkungen abgebrochen werden. Neuere Untersuchungen zeigten sogar teilweise eine Verschlimmerung der Krebserkrankung bei Verwendung von Breitband-MMP-Inhibitoren im Tiermodell (Krüger et al., 2001), was eine noch viel detailliertere Erforschung einzelner MMPs erfordert.

#### **II.2.4.6 TIMPs, Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases**

Betrachtet man die Rolle der MMPs beim Umbau der extrazellulären Matrix, so ist es genauso wichtig, auf eine Klasse ubiquitär vorkommender natürlicher Inhibitoren dieser Proteinase einzugehen. Die sogenannten *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases* (TIMPs) stellen eine Familie von mittlerweile vier verwandten Proteinen dar, die je nach Glykosylierung 20 bis 30 kDa groß sind. TIMPs werden oft von denselben Zelltypen exprimiert, die auch die MMPs produzieren (Overall, 1994). Analog den MMPs selbst werden bei den TIMPs in jüngster Zeit neben der Hemmung der proteolytischen Aktivität immer mehr neue Aufgaben vermutet. So scheinen sie unter anderem auch mitogene oder Apoptose-induzierende Aktivität zu besitzen (Bertaux et al., 1991; Hayakawa et al., 1992; Moses, 1997; Takigawa et al., 1990). Dabei ist jedoch nicht völlig geklärt, inwieweit diese Aktivitäten auf die Inhibition von MMPs zurückgeführt werden können (Bodden et al., 1994; Moses, 1997).

TIMPs sind Proteine, die aus zwei Domänen bestehen, mit etwa 125 Aminosäuren für die N-terminale und etwa 65 für die C-terminale Domäne. Beide Domänen sind mit je drei Disulfidbrücken stabilisiert und haben verschiedene funktionelle Eigenschaften. Die Carbonyl- und Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure der TIMPs komplexiert das Zinkion im aktiven Zentrum der MMPs und verhindert damit die Bindung des für die Katalyse wichtigen Wassermoleküls. Der C-terminale Abschnitt der TIMP-Moleküle geht gleichzeitig eine Bindung mit der Hämapexin-ähnlichen Domäne der MMPs ein, was die im nanomolekularen Bereich liegenden Dissoziationskonstanten um eine weitere Größenordnung verkleinert (Kleine et al., 1993). Im Grunde scheint jedes TIMP jede MMP zu inhibieren, mit den herausragenden Spezialfällen von besonders geringer Affinität zwischen den *membrane-type*-MMPs MT1, -2 und -3 und TIMP-1 und besonders hoher Affinität für den MMP-2/TIMP-2 Komplex. Bisher wurden die Kristallstrukturen von zwei MMP-TIMP-Komplexen gelöst, MMP-3/TIMP-1 (Gomis-Rüth et al., 1997), MT1-MMP/TIMP-2 (Fernandez-Catalan et al., 1998), die einige Unterschiede in den Wechselwirkungen aufweisen.

#### **II.2.4.7 MMP-12**

MMP-12 (Makrophagen Elastase, Metalloelastase) wurde 1975 erstmals nachgewiesen, als Werb und Mitarbeiter in konditioniertem Medium von Makrophagen des Bauchfells aus Mäusen eine elastolytische Aktivität fanden (Werb & Gordon, 1975), die schließlich als eine metallabhängige 22 kDa-Proteinase identifiziert werden konnte (Banda & Werb, 1981). Die Klonierung und Sequenzierung des Gens dieser Metalloproteinase zeigte die Verwandtschaft zur MMP-Familie. Das humane Pendant von MMP-12 wurde aus einer cDNA-library kloniert, die aus Makrophagen von Lungenbläschen von Zigarettenrauchern stammte (Shapiro et al., 1993) und eine hohe Homologie zum Mausenzym aufweist.

MMP-12 teilt viele Eigenschaften mit anderen MMPs, die für die MMP-Familie typisch sind: die Domänenstruktur (Prä-, Pro-, katalytische, Hämapexin-ähnliche Domäne), den chromosomalen Locus innerhalb des MMP-Gen-Clusters auf dem menschlichem Chromosom 11q22, und das Vermögen des Abbaus der extrazellulären Matrix. Es sind aber vielmehr die spezifischen Eigenschaften von MMP-12, die es eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Lungenerkrankungen, wie Lungenemphysem einnehmen lassen. So wird MMP-12 fast ausschließlich in Makrophagen produziert und spaltet gleich nach ihrer Aktivierung ihre Hämapexin-ähnliche Domäne autokatalytisch ab, ohne dass sich die elastolytische Aktivität verringert. Wie andere MMPs ist auch MMP-12 in der Lage, neben dem Abbau eines breiten Spektrums von Komponenten der extrazellulären Matrix (ausgenommen interstitielles Kollagen) eine Vielzahl von Proteinen zu spalten, die keine Bestandteile der ECM sind.

So aktiviert es zum Beispiel latenten *Tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) zu aktivem TNF- $\alpha$  und setzt Angiostatin frei bei der Spaltung von Plasminogen (Chandler et al., 1996).

Zudem kann MMP-12  $\alpha$ 1-PI abbauen, ein Serpin und sehr effektiver Inhibitor von Leukozyten Elastase (HLE).

Serpine (Serin Proteinase Inhibitoren) sind irreversible Inhibitoren. Sie wirken nach einem komplett anderen Mechanismus als sogenannte Standardinhibitoren. Diese binden ins aktive Zentrum des Enzyms und verhindern so kompetitiv eine Substratumsetzung. Im Gegensatz zu den Serpinen ist die Bindung der Inhibitoren ans Enzym reversibel und es kommt zu keiner chemischen Reaktion.

Die Serpine binden ebenso wie kompetitive Inhibitoren mit dem sogenannten *reactive-site-loop* ins aktive Zentrum der Serinproteinase. Wie bei einem Substrat kommt es jedoch jetzt zum ersten Schritt der Katalyse, nämlich der Spaltung der Peptidbindung, der Acylierung des N-terminalen unter gleichzeitiger Freisetzung des C-terminalen Fragments. Allerdings folgt anschließend eine Umlagerung des gespaltenen *loops* und Insertion desselben in ein zentrales  $\beta$ -Faltblatt des Serpins, was eine Änderung der Konformation des aktiven Zentrums der Proteinase ermöglicht. Durch die kovalente Bindung des Serpins an das Enzym, die anschließende Umlagerung und das "Herausziehen" des Serins des aktiven Zentrums, wird die katalytische Triade der Serinproteinase so stark deformiert, dass eine Katalyse nicht mehr möglich ist (Engh et al., 1995; Huntington et al., 2000).

Um die biologische Funktion von MMP-12 zu ermitteln, wurden *knock-out* Mäuse hergestellt, die sich normal entwickelten. Die einzige bemerkte Abnormalität, die unter Nicht-Stressbedingungen festgestellt wurde, war, dass eine stark verringerte Fähigkeit der Makrophagen dieser Mäuse vorhanden war, die extrazelluläre Matrix abzubauen. Diese Makrophagen waren weder *in vitro* noch *in vivo* in der Lage, die Basalmembran zu durchdringen (Hautamaki et al., 1997).

MMP-12 ist die einzige MMP, die fast ausschließlich in Makrophagen exprimiert wird, in denen sie (in Mäusen) für mehr als 95 % für die elastinolytische Aktivität verantwortlich ist. Damit ist sie von äusserster Wichtigkeit für die Fähigkeit von Makrophagen, extrazelluläre Matrixbarrieren zu überwinden (Shipley et al., 1996). Angezogen durch Chemokine, die beim weiteren Abbau von Elastin oder  $\alpha$ 1-PI entstehen, wandern Makrophagen zur Stelle der Entzündung, um für einen schnellen Ab- bzw. Umbau von Gewebe zu sorgen (Hautamaki et al., 1997).

In pathologischen Situationen, wie beim Rauchen von Zigaretten oder bei Hautschädigungen durch UV-Strahlung der Sonne (Saarialho-Kere et al., 1999), akkumulieren und sekretieren Makrophagen schließlich aktive MMP-12. Dadurch wird einerseits Elastin direkt abgebaut und andererseits durch die Inaktivierung von  $\alpha$ 1-PI die Aktivität von HLE gesteigert. Damit ist MMP-12 auch indirekt für einen erhöhten Elastinabbau verantwortlich, in dem es das Proteinase/Antiproteinase-Gleichgewicht in die Richtung der Proteinase verschiebt und dadurch für damit einhergehende Gewebeerstörung sorgt (Gronski et al., 1997). So ist MMP-12 in der Lage, auf zwei Arten elastolytisch zu wirken: Direkt durch Abbau von Elastin und indirekt durch Inaktivierung von  $\alpha$ 1-PI, des wichtigsten Inhibitors von HLE. Im Gegenzug kann HLE TIMPs spalten und derart die Inhibierung von MMP-12 verhindern, was lokal zu einer positiven Rückkopplung führen kann (Gronski et al., 1997).

Bei rauchenden Mäusen (Hautamaki et al., 1997; Shapiro, 2000) konnte gezeigt werden, dass die MMP-12-Expression in Makrophagen der Lungenbläschen auf eine extreme Weise erhöht ist und MMP-12 essentiell für eine Zigarettenrauch-induzierte Entzündung und für Lungenemphysem ist. Auch weitere Beobachtungen favorisieren die sehr wichtige Rolle, die MMP-12 (abgesehen der von HLE) bei der Entstehung von Emphysemen bei Rauchern spielt. Damit ist MMP-12 ein wichtiges und interessantes Zielprotein in der Emphysemtherapie. Ausgehend von der Kristallstruktur kann nun die Suche nach Inhibitoren des Enzyms mittels *Molecular Modelling* beginnen.

#### II.2.4.8 MMP-13

MMP-13 (Kollagenase-3) wurde erstmals in einer cDNA-Bibliothek von Brustkrebszellen entdeckt (Freije et al., 1994). Die cDNA für MMP-13 codiert für ein aus 471 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das in der Lage ist, mit hoher Wirksamkeit ein breites Spektrum von Substraten, wie z. B. Kollagene Typ I, II, III und Gelatin zu spalten.

Aufgrund der Fähigkeit, fibrilläres Kollagen zu spalten und der Konservierung Kollagenase-spezifischer Sequenzen, wurde dieses Enzym neben der Fibroblasten- und der Neutrophilen Kollagenase (MMP-1 und -8) das dritte Mitglied in der Gruppe der Kollagenasen (Freije et al., 1994). Eine erhöhte Expression wird nicht nur in Brustkrebs-, sondern in einer ganzen Reihe von malignen Tumorzellen gefunden. Zudem scheint das Auftreten größerer Mengen von Kollagenase-3 immer mit invasiven und metastatischen Tumoren verknüpft zu sein (Pendas et al., 2000). Als Ursache für die MMP-13 Überexpression konnten verschiedene Cytokine, Wachstumsfaktoren und Tumorpromotoren identifiziert werden.

MMP-13 wird *in vitro* u. a. durch MMP-3 (Stromelysin 1) aktiviert, wobei ein Intermediat mit Leu58 als N-Terminus gefunden wurde. Allerdings ist Kollagenase-3 nur so lange in der Lage, tripelhelikales Kollagen zu spalten, soweit sie im Besitz ihrer Hämopexin-ähnlichen Domäne ist. Deletionsstudien haben ergeben, dass die katalytische Domäne allein nicht mehr dazu in der Lage ist, obwohl sie nach wie vor Aktivität für kleine Substrate besitzt (Murphy et al., 1992).

### II.2.4.9 MMP-16

Bis jetzt sind 6 Mitglieder der MT-MMP-Unterfamilie bekannt (MT1-MMP bis MT6-MMP entsprechend MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25) (Nagase & Woessner, 1999; Ohuchi et al., 1997; Pei, 1999a; Pei, 1999b). Die MT-MMPs zeigen gegenüber den anderen MMPs drei Insertionen in der Aminosäuresequenz:

1. ca. 11 Aminosäuren zwischen dem Propeptid und der katalytischen Domäne (MMP-11 hat eine ähnliche Insertion an derselben Stelle),
2. ca. 8 Aminosäuren innerhalb der katalytischen Domäne (*MT-loop*) und
3. ca. 70 Aminosäuren am C-Terminus der Hämapexin-ähnlichen Domäne, bestehend aus einem Linker, einer Transmembran-Helix und einer cytoplasmatischen Domäne mit 31, 24 bzw. 20 Resten.(MT1-, -2-, -3-, -5-MMP) oder einer verkürzten Sequenz im Falle von MT4- und MT6-MMP, die stattdessen einen GPI-Anker tragen.

MMP-16 (MT3-MMP) ähnelt in vielerlei Hinsicht MMP-14 (MT1-MMP), das jedoch deutlich besser untersucht wurde als MT3-MMP. Im Vergleich zu anderen MT-MMPs ist die Expression von MT3-MMP stärker auf spezifische Gewebereiche wie Gehirn, Lunge, Herz und Plazenta beschränkt (Shofuda et al., 1997; Yoshiyama et al., 1998). Sie kann eine Reihe von Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen, unter anderem denaturiertes Kollagen, aber kein natives Typ-1 Kollagen. Die mit Abstand am besten untersuchte Angehörige dieser Familie ist MT1-MMP. Bisherige Studien zeigen eine große Ähnlichkeit von MT3-MMP und MT1-MMP. So kann MT3-MMP wie MT1-MMP auch ProMMP-2 aktivieren (Sato et al., 1994). Ein weithin akzeptiertes Modell der ProMMP-2-Aktivierung sieht eine durch TIMP-2 inhibierte membrangebundene MT1-MMP vor (Butler et al., 1998). Dieser Komplex dient als Rezeptor für die Hämapexin-ähnliche Domäne von ProMMP-2, wobei die Hämapexin-ähnliche Domäne an die C-terminale Domäne von TIMP-2 bindet. Eine weitere nicht-inhibierte MT1-MMP auf der Zelloberfläche in der Nähe dieses ternären Komplex schneidet anschließend innerhalb der Prodomäne. Die vollständige Abspaltung des Propeptides erfolgt dann autokatalytisch. Darüber hinaus kann die Aktivierung z. B. auch durch Plasmin erfolgen.

## II.3 Kristallographie

Unter den Makromolekülen einer Zelle nehmen Proteine die größte Gruppe ein, und Enzyme wiederum stellen die am meisten diversifizierte Klasse von Proteinen dar. Um zelluläre Prozesse im Detail verstehen zu können, ist oft die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von Proteinen entscheidend. Zwei Techniken werden angewandt, um die Struktur von Makromolekülen bei atomarer Auflösung zu bestimmen: Diffraktion von Röntgenstrahlung an Kristallen und nuklearmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR). Die NMR-Spektroskopie setzt keine Kristalle voraus und kann außerdem Informationen über die Dynamik von Makromolekülen liefern. Da die Anwendbarkeit dieser Methode jedoch noch auf Makromoleküle mit einem Molekulargewicht bis zu etwa 35 kDa beschränkt ist, steht zur Strukturanalyse höhermolekularer Proteine oft ausschließlich die Methode der Röntgenkristallographie zur Verfügung. Im Oktober 2001 waren in der Proteindatenbank in Brookhaven 16245 Proteinstrukturen hinterlegt, von denen lediglich 15 % durch Kernresonanzmethoden und 2 % durch theoretische Methoden bestimmt wurden. Dies unterlegt eindrucksvoll die zentrale Rolle, die der Kristallographie in der Strukturbiologie zukommt, zu deren Meilensteinen u.a. die Aufklärung der Doppelhelix-Struktur der Erbsubstanz (Watson & Crick, 1953), basierend auf Faserdiffraktionsaufnahmen, und die Bestimmung der ersten Proteinstrukturen von Myoglobin (Kendrew et al., 1960) und Hämoglobin (Perutz et al., 1960) zählen.

Die zunehmend große Zahl von Proteinkristallstrukturen wurde vor allem auch durch die Entwicklung leistungsfähiger Computer und Programme ermöglicht. In den letzten Jahren haben die neuen Techniken der Molekularbiologie die Strukturanalyse erheblich stimuliert, denn heute sind große Mengen nahezu jedes gewünschten Proteins verfügbar. Andererseits hat die Röntgenkristallographie eine große Bedeutung für die molekularbiologischen Arbeiten erlangt, indem sie auf die am besten geeigneten Positionen für die zielgerichtete Mutagenese hinweist.

Die Herstellung von Proteinen mit veränderten Eigenschaften und die struktur-basierte Suche nach spezifischen Hemmstoffen und deren Weiterentwicklung ist insbesondere für die pharmazeutische Industrie von wachsendem Interesse.

### II.3.1 Kristallisation

Der erste entscheidende Schritt bei der Bestimmung von Strukturen mittels Röntgenkristallographie besteht darin, Kristalle von ausreichender Größe und Qualität zu erhalten (McPherson, 1990). Eine Präzipitation und im Idealfall Kristallisation des Proteins wird erreicht, indem die Proteinlösung langsam zur Übersättigung gebracht wird. Dies kann durch Zugabe von Salz ("Aussalzen") oder Alkoholen erzielt werden. Hierzu wird die Proteinlösung mit der Lösung eines Fällungsmittels vermischt und entweder als sitzender (*sitting drop*) oder als hängender Tropfen (*hanging drop*) oberhalb eines Reservoirs dieses Fällungsmittels angebracht. Der Konzentrationsunterschied in den beiden Lösungen führt dazu, dass Wasser mittels Dampfdiffusion aus dem Tropfen der Proteinlösung in das Reservoir übertritt, so dass

die Proteinkonzentration zunimmt. Dabei bestehen an das Protein und die Pufferlösungen hohe Anforderungen in Bezug auf Reinheit und Homogenität der Präparation.

Die Kristallisation von Makromolekülen ist ein vieldimensionales Problem, wobei die variierbaren Parameter u.a. die Proteinkonzentration, die Art und Konzentration des Fällungsmittels, den pH-Wert und die Temperatur umfassen. Ein statistischer Ansatz für dieses Problem besteht in einer faktoriellen Suche oder eines *sparse matrix sampling* (Carter Jr. & Carter, 1979 ; Jancarik & Kim, 1991) nach geeigneten Bedingungen. Solche Suchen können oft erste Anhaltspunkte für weiterführende Bedingungen liefern, die dann in weiteren mehrdimensionalen Matrices optimiert werden.

### II.3.2 Kristalle

Allen Kristallen, den natürlichen in Felsgestein wie Quarz oder Amethysten und auch künstlich gezüchteten Kristallen von Makromolekülen liegt ein gemeinsames Prinzip ihres Aufbaus zugrunde: Sie bestehen aus einer regelmäßig wiederholten Anordnung von Atomen. Die innere Periodizität läßt sich mit Elektronenmikroskopie sichtbar machen. Ein Kristall ist demnach nichts anderes als die regelmäßige Aneinanderreihung einer einzelnen Einheit, der sogenannten Einheitszelle. Diese Einheitszelle ist durch die Länge ihrer drei Achsen  $a$ ,  $b$  und  $c$  und der eingeschlossenen Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  eindeutig charakterisiert. Das Konzept der Einheitszelle stellt ein mathematisches Modell dar, das den Kristall in identische Komponenten unterteilt, so dass nur wenige Parameter notwendig sind, um die Anordnung der Atome zu beschreiben. Dementsprechend reduziert sich das Problem, die Struktur des Kristalls zu bestimmen, auf die Struktur einer Einheitszelle. Je kleiner das Molekül ist, desto kleiner kann die Einheitszelle sein und desto mehr Einheitszellen liegen in einem Kristall gegebener Größe vor. Diese Tatsache erklärt zumindest zum Teil die im Allgemeinen höhere Intensität der Röntgendiffraktionsdaten bei Kristallen kleiner Moleküle.

Zur Vereinfachung kann man jede Einheitszelle des Kristalls durch einen Punkt ersetzen. Das Ergebnis ist ein Kristallgitter, d.h. ein Gitter von Punkten, das sich in der gleichen regelmäßigen Weise in allen drei Richtungen wiederholt, wie es für den Inhalt der Einheitszelle im Kristall gilt. Die Konvolution des Kristallgitters mit dem atomaren Inhalt der Einheitszelle ergibt dann die Struktur des gesamten Kristalls. In den Kristall können Gitterebenen so hineingelegt werden, dass sie verschiedene Punkte des Kristallgitters enthalten. In der Annahme, dass die Achsen der Einheitszelle parallel zu den Kristallachsen verlaufen, schneiden diese Gitterebenen die Achsen der Einheitszelle dann bei  $x = a/h$ ,  $y = b/k$  und  $z = c/l$  (Friedrich et al., 1912). Die ganzzahligen Variablen  $h$ ,  $k$  und  $l$  werden als Miller-Indizes bezeichnet. Wenn das Kristallgitter eine Symmetrie aufweist, liegt jedes Teilchen gemäß der jeweiligen Symmetrieeoperation mehrfach in der Einheitszelle vor. Die Einheitszelle umfaßt dann mehrere asymmetrische Einheiten. Moleküle, die über eine kristallographische Symmetrie verwandt sind, sind identisch und weisen auch eine identische kristallographische Umgebung auf. Andererseits muss die Zahl der asymmetrischen Einheiten nicht mit der Zahl der Moleküle in der Einheitszelle übereinstimmen, so dass mehrere Moleküle in einer asymmetrischen Einheit vorliegen können. Diese Moleküle sind dann nicht identisch und für sie gilt eine nicht-kristallographische Symmetrie. Diese Theorie bezieht sich auf perfekte



Kristalle, bei denen sich der ganze Kristall wie ein einzelner Block verhält, d.h. alle Einheitszellen und ihr Inhalt sind absolut identisch. Im Verhältnis zu seinen Nachbarn ist jeder Mosaikblock im realen Kristall jedoch geringfügig anders orientiert und die interne Periodizität ist nicht perfekt.

Proteine haben durch ihre polyvalente Oberfläche sehr viele unterschiedliche Anordnungsmöglichkeiten mit nur geringen energetischen Unterschieden, so dass die vollständig reguläre Anordnung von Proteinen im Kristall höchst unwahrscheinlich ist. Diese energetisch nur schwach unterschiedlichen Anordnungsmöglichkeiten äußern sich makroskopisch im Polymorphismus von Kristallformen und in der Existenz unterschiedlicher Elementarzellen bei einzelnen Proteinspezies. Proteinkristalle zeigen im Gegensatz zu Kristallen kleiner Moleküle einen wesentlich lockereren Zusammenhalt, der sich als Netzwerk beschreiben lässt. Proteinkristalle beinhalten bis zu 90 % (v/v) Lösungsmittel. In den Kristallen sind die Proteine von einer Solvatationshülle umgeben, die teilweise geordnet ist, während die Kanäle, die durch die Packung der Proteine im Kristall entstehen, mit dem Kristallisationspuffer gefüllt sind.

### II.3.3 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

So wie sichtbares Licht an sehr kleinen Objekten gebeugt wird, können Röntgenstrahlen von Elektronen gebeugt werden. Wenn Röntgenstrahlung auf ein Atom trifft, führt das oszillierende Feld der Strahlung zu einer Oszillation der Elektronen. Die Oszillationsfrequenz ist gleich derjenigen der Strahlung, so dass das Elektron als ein oszillierender Dipol wirkt, der Sekundärstrahlung mit der Frequenz der einfallenden Strahlung aussendet. Dieses Phänomen wird als kohärente Streuung bezeichnet. Bei der Streuung tritt eine Phasenverschiebung von  $180^\circ$  auf. Diese elastische oder kohärente Streuung (*THOMSON*-Streuung (Thomson, 1903)) wird unter Vernachlässigung von Mehrfachstreuung durch die kinematische Streutheorie beschrieben.

Bragg konnte 1913 zeigen, dass sich die von einem Kristall gestreute Strahlung so verhält, als ob sie an den Gitterebenen reflektiert worden wäre. Jeder gestreute Strahl wird als ein Bragg-Reflex von einer Kristallgitterebene betrachtet, wobei der Einfallswinkel ( $90^\circ - \theta_{hkl}$ ) gleich dem Ausfallswinkel ist. Damit weicht der gestreute Strahl um den Winkel  $2\theta_{hkl}$  vom einfallenden Strahl ab. Mit dem Abstand benachbarter Gitterebenen von  $d_{hkl}$  und der Bedingung, dass für konstruktive Interferenz die an benachbarten Ebenen gestreuten Strahlen einen Gangunterschied eines ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge aufweisen müssen, erhält man das **Bragg'sche Gesetz**:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta_{hkl}$$

Bei allen übrigen Gangunterschieden führt die Vielzahl der Gitterebenen zu einer vollständigen Auslöschung der gestreuten Strahlung.

Wenn Röntgenstrahlung auf einen Kristall trifft, wird also nur dann kohärente Beugung auftreten, wenn das Bragg'sche Gesetz erfüllt ist. Bei monochromatischer Röntgenstrahlung und einer bestimmten Orientierung des Kristalls erfüllen nur wenige Bragg-Reflexe diese Bedingung. Daher wird der Kristall über einen gewissen Bereich gedreht, so dass zahlreiche gestreute Strahlen die Reflexionsbedingung erfüllen. Zusätzlich kann man einen Streuvektor

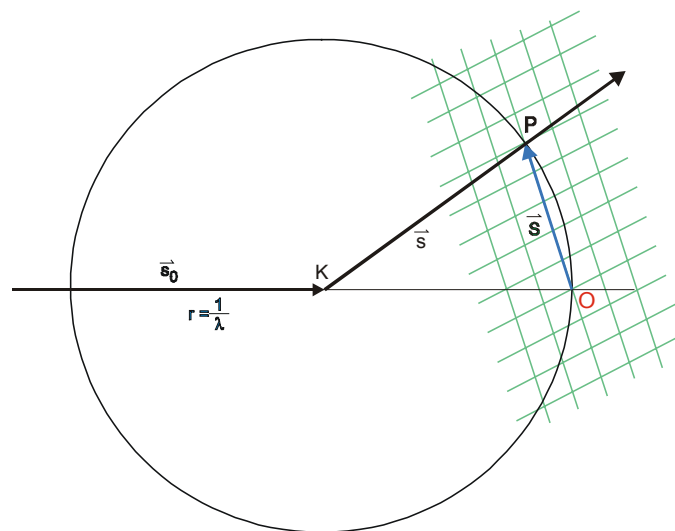
$\vec{S}$  konstruieren, der senkrecht auf der “reflektierenden” Gitterebene steht und dessen Länge gegeben ist durch:

$$|\vec{S}| = \frac{2 \sin \theta_{hkl}}{\lambda}$$

Aus den Abständen der Gitterebenen,  $d_{hkl}$ , des Kristallgitters läßt sich ein reziprokes Gitter konstruieren: Im reziproken Gitter liegt der Punkt (hkl) in einem Abstand  $1/d_{hkl}$  vom Ursprung in einer Richtung, die senkrecht zu den jeweiligen Gitterebenen steht. Die Achse  $a^*$  des reziproken Gitters steht dann senkrecht auf der (100) Ebene des Kristallgitters, in der dessen  $a$ -Achse verläuft. Das Kristallgitter und das reziproke Gitter sind reziprok zueinander. Jedem Satz von Kristallgitterebenen, die durch die Miller Indizes  $h$ ,  $k$  und  $l$  charakterisiert sind, d.h. jedem Reflex (hkl), entspricht ein Punkt (hkl) des reziproken Gitters. Damit zeigt sich, dass die Endpunkte der Vektoren  $\vec{S}$  (hkl) mit den Gitterpunkten des reziproken Gitters zusammenfallen. Der Vorteil des reziproken Gitters besteht also darin, dass mit seiner Hilfe die Richtung der gebeugten Strahlen einfach ermittelt werden kann.

Unter Verwendung des reziproken Gitters läßt sich das Bragg'sche Gesetz als Vektordiagramm darstellen (**Ewald-Konstruktion** (Ewald, 1921), siehe Abbildung II-10).

Der Kristall befindet sich im Mittelpunkt  $K$  einer Kugel mit dem Radius  $1/\lambda$ . Das Zentrum des reziproken Gitters  $O$  liegt in der Richtung des einfallenden Strahls auf der Kugeloberfläche. Die Reflexionsbedingung ist für jeden Punkt  $P$  des reziproken Gitters erfüllt, der auf der Oberfläche der Ewald-Kugel liegt. Wenn der Kristall gedreht wird, dreht sich mit ihm sein Kristallgitter und auch sein reziprokes Gitter, so dass nacheinander verschiedene Punkte des reziproken Gitters mit der Kugeloberfläche zusammenfallen.



**Abbildung II-10:** Ewald-Konstruktion (Ewald, 1921). Die Richtung des Primärstrahles  $s_0$  geht vom Drehpunkt des Kristalles  $K$  zum Ursprung  $O$  des reziproken Gitters. Um den Kristall wird eine Kugel mit dem Radius  $1/\lambda$  gezeichnet. Der gebeugte Strahl wird durch den Vektor  $s$  und ein reziproker Gittervektor durch den Vektor  $S$  repräsentiert.

### II.3.4 Streuung an Atomen

Röntgenstrahlen werden an der Elektronenwolke von Atomen gestreut. Die Streuung hängt von der Anzahl der Elektronen und ihrer Position in der Elektronenwolke ab. Die Elektronendichte am Ort  $\vec{r}$  ist durch  $\phi(\vec{r})$  gegeben. Der atomare Formfaktor ist dann definiert als

$$f = \int_r \phi(\vec{r}) \exp[2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}] d\vec{r}$$

wobei über den gesamten Raum integriert wird. Im Allgemeinen wird angenommen, dass die Elektronenwolke eines Atoms kugelsymmetrisch ist, so dass der atomare Formfaktor nicht von der Richtung des Streuvektors  $\vec{S}$  abhängt, sondern nur von dessen Länge. Da der Betrag des Streuvektors wiederum vom Streuwinkel  $\theta$  abhängt, ergibt sich somit eine Abhängigkeit des atomaren Formfaktors vom Winkel, unter dem die Streuung beobachtet wird. Dies führt dazu, dass Reflexe bei großen Streuwinkeln, d.h. hoher Auflösung, generell eine geringere Intensität aufweisen.

In der Einheitszelle mit  $n$  Atomen ergibt sich die gesamte Streuung dieser Einheitszelle als Summe der atomaren Formfaktoren multipliziert mit dem jeweiligen Phasenwinkel des betrachteten Atoms

$$\vec{F}(\vec{S}) = \sum_{j=1}^n f_j \exp[2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{S}]$$

$\vec{F}(\vec{S})$  wird als **Strukturfaktor** bezeichnet.

### II.3.5 Temperaturfaktor

In Abhängigkeit von der Temperatur schwingen die Atome um ihre Gleichgewichtsposition. Die Röntgenstrahlen treffen also in aufeinanderfolgenden Einheitszellen nicht auf identische Atome an exakt der gleichen Position. Dies ist vergleichbar mit einem Röntgenstrahl der auf ein schnell schwingendes Atom trifft, was dazu führt, dass die gestreute Intensität vor allem bei großen Streuwinkeln vermindert wird, so dass der atomare Formfaktor mit einem temperaturabhängigen Faktor multipliziert werden muss. Die Bewegung der Atome innerhalb der reflektierenden Ebene ( $hkl$ ) beeinflusst nicht die Intensität des Reflexes ( $hkl$ ) sondern nur die Komponente senkrecht zur Ebene, d.h. in Richtung von  $\vec{S}$ , zeigt einen Effekt. Im einfachen Fall der isotropen Bewegung ist die Komponente gleich für jeden Reflex ( $hkl$ ), und der Korrekturfaktor ergibt sich zu

$$T(iso) = \exp\left[-B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}\right] = \exp\left[-\frac{B}{4} \left(\frac{2 \sin \theta}{\lambda}\right)^2\right] = \exp\left[-\frac{B}{4} \left(\frac{1}{d}\right)^2\right]$$

Dabei definiert sich der **Temperaturfaktor**  $B$  als eine Funktion des mittleren Abweichungsquadrates  $\overline{u^2}$ :

$$B = 8\pi^2 \times \overline{u^2}$$

Für einen Temperaturfaktor von  $B = 30 \text{ \AA}^2$  errechnet sich eine mittlere Verschiebung der Atome um ihre Gleichgewichtsposition von  $0,62 \text{ \AA}$ . Dieser Wert gibt einen Eindruck von der Flexibilität und Unordnung in Proteinstrukturen, die keinesfalls vollkommen starr sind. Wegen dieser Unordnung im Kristall nimmt die Intensität des Beugungsbildes ab einem Beugungswinkel  $\theta_{\max}$  sehr stark ab. Der entsprechende Abstand der Gitterebenen  $d_{\min}$  ergibt sich aus dem Bragg'schen Gesetz:

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta_{\max}}$$

wobei  $d_{\min}$  als Auflösung des Beugungsbildes bezeichnet wird. Die Struktur kann bis zu einer Auflösung von  $d_{\min}$  bestimmt werden.

Der Temperaturfaktor beinhaltet eine dynamische Unordnung im Kristall durch die temperaturabhängige Schwingung der Atome und eine statistische Unordnung, die daraus resultiert, dass die Moleküle in unterschiedlichen Einheitszellen nicht exakt die gleiche Position und Orientierung aufweisen. Diese beiden Effekte der Unordnung können nur dann unterschieden werden, wenn Diffraktionsdaten bei verschiedenen Temperaturen gesammelt werden.

### II.3.6 Berechnung der Elektronendichte

Die Intensität des gebeugten Röntgenstrahls ( $hkl$ ) ist bei kinematischer Streuung proportional zum Quadrat der Amplitude des Strukturfaktors  $\vec{F}(hkl)$ . Der Strukturfaktor kann nicht nur als Summe aller Atome in der Einheitszelle beschrieben werden, sondern als Integration aller Elektronen

$$\vec{F}(\vec{S}) = \int_{\text{Zelle}} \rho(\vec{r}) \exp[2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}] dV$$

Mit den fraktionalen Koordinaten  $x$ ,  $y$  und  $z$  und

$$dV = V \cdot dx dy dz$$

$$\vec{r} \cdot \vec{S} = hx + ky + lz$$

erhält man für den Strukturfaktor

$$\vec{F}(hkl) = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(xyz) \exp[2\pi i(hx + ky + lz)] dx dy dz$$

Der Strukturfaktor stellt also die Fouriertransformation der Elektronendichte dar und umgekehrt, so dass  $\rho(xyz)$  als Funktion aller Strukturfaktoren  $\vec{F}(hkl)$  dargestellt werden kann:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \vec{F}(hkl) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

Da Beugung nur in diskreten Richtungen auftritt, kann die Integration durch die Summe ersetzt werden. Mit  $\vec{F} = |F| \exp i\alpha$ , wobei  $\alpha$  den Phasenwinkel darstellt, erhält man einen Ausdruck, der die Berechnung der Elektronendichte  $\rho(xyz)$  an jedem Punkt in der Einheitszelle erlaubt, sofern die Phasenwinkel  $\alpha(hkl)$  bekannt sind:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)]$$

Während der Betrag des Strukturfaktors direkt aus den Intensitäten  $I(hkl)$  ermittelt werden kann, gilt dies nicht für den Phasenwinkel  $\alpha(hkl)$ . Hierzu muss auf indirekte Methoden zurückgegriffen werden.

### II.3.7 Lösung des Phasenproblems

Im Gegensatz zur Bestimmung der Amplitude des Strukturfaktors aus den gemessenen Intensitäten gibt es keine Möglichkeit, die Phasenwinkel experimentell zu erhalten. Statt dessen sind vier Methoden in der Röntgenstrukturanalyse entwickelt worden, dieses Phasenproblem zu lösen:

1. Die Methode des **Isomorphen Ersatzes** (MIR, *Multiple Isomorphous Replacement* oder SIR, *Single Isomorphous Replacement*, (Green et al., 1954)), bei dem Schwermetallatome an das Protein im Kristall binden.
2. Die Messung der Diffraktionsdaten bei verschiedenen Wellenlängen (**Multiple Anomale Dispersion** (MAD, (Hendrickson, 1991))). Voraussetzung sind Atome im Protein mit ausreichender anomaler Streuung (z.B. Zink oder Selen) und genau einstellbaren Wellenlängen (z. B. Synchrotronstrahlung).
3. Der **molekulare Ersatz** (*Molecular Replacement* (Hoppe, 1957a; Hoppe, 1957b; Huber, 1965; Rossmann & Blow, 1962)), der voraussetzt, dass eine ausreichend ähnliche Struktur bereits bekannt ist.
4. **Direkte Methoden** (Hauptmann & Karle, 1953), die bei kleinen Molekülen die Standardtechnik zur Phasenbestimmung sind. Basierend auf der Wahrscheinlichkeitstheorie ist sie für Proteine noch nicht anwendbar.

Da die Strukturen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des molekularen Ersatzes bestimmt wurden, soll im folgenden nur auf diese Methode näher eingegangen werden.

Bei der Phasenbestimmung mit Hilfe des molekularen Ersatzes wird eine sehr ähnliche Struktur anstelle des gewünschten Proteins als ein erstes Modell verwendet, um Startphasen zu erhalten, die dann verfeinert werden.

Das Problem besteht darin, die bekannte Struktur auf das zu untersuchende Protein zu übertragen. Die Methode des molekularen Ersatzes löst dieses Problem. Die Plazierung der bekannten Struktur in der Elementarzelle erfordert deren korrekte Orientierung und die genaue Position. Das heißt, es handelt sich um zwei Schritte: eine Rotation und eine Translation. Bei der Rotation wird die relative Orientierung der bekannten Struktur im Verhältnis zur gesuchten bestimmt. Im zweiten Schritt wird dann die Translation berechnet, die notwendig ist, um das Modell den Meßdaten anzupassen.

Um das Prinzip der Methode des molekularen Ersatzes zu verstehen, sollte man sich die *Pattersonfunktion* einer Proteinstruktur ansehen. Die Pattersonkarte ist eine Vektorkarte, die interatomare Vektoren zeigt. Sie berechnet sich im Gegensatz zur Elektronendichtekarte nicht mit dem Betrag des Strukturformfaktors sondern mit seinem Quadrat, d.h. mit den Intensitäten und ohne Phasenwinkel, so dass diese Funktion direkt aus den gemessenen Intensitäten berechnet werden kann.

$$P(uvw) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)]$$

$$P(\vec{u}) = \int_{\vec{r}_i} \rho(\vec{r}_i) \times \rho(\vec{r}_i + \vec{u}) dV$$

Die Vektoren zwischen den Atomen des gleichen Moleküls werden als Selbstvektoren bezeichnet, die zwischenmolekulare Vektoren als Kreuzvektoren. Abgesehen von einer unterschiedlichen Orientierung sind die Selbstpattersonkarten eines Moleküls in unterschiedlichen Kristallstrukturen identisch. Bei homologen Molekülen sind sie nicht exakt gleich aber sehr ähnlich. Dementsprechend können die Selbstvektoren benutzt werden, um die Rotationsbeziehung zwischen der bekannten und gesuchten Struktur zu bestimmen. Aus den Kreuzvektoren kann die Translation zwischen den beiden Strukturen ermittelt werden. Es ist vor allem diese Unterteilung in zwei Schritte, die eine Lösung des Phasenproblems mit begrenztem Rechenaufwand ermöglicht.

Zunächst soll die Rotationsfunktion betrachtet werden. Alle Selbstvektoren liegen innerhalb einer Kugel um den Ursprung, wobei der Radius dieser Kugel der Dimension des Moleküls entspricht. Wenn die richtig rotierte Pattersonkarte der bekannten Struktur der Pattersonkarte der gesuchten Struktur überlagert wird, ergibt sich eine maximale Überlappung. Eine Überlappungsfunktion  $R$  wird wie folgt berechnet:

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \int_U P(\vec{u}) \times P_r(\vec{u}_r) d\vec{u}$$

wobei  $P(\vec{u})$  und  $P_r(\vec{u}_r)$  die ursprüngliche und die rotierte Pattersonfunktion darstellen und  $U$  das Volumen ist, innerhalb dessen die Selbstvektoren betrachtet werden.

$P(\vec{u})$  und  $P_r(\vec{u}_r)$  können als Fourier-Reihe geschrieben werden, so dass folgt:

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \frac{1}{V^2} \sum_h \sum_{h'} |F(\vec{h})|^2 |F([C]\vec{h}')|^2 \times \int_U \exp[-2\pi(\vec{h} + \vec{h}')\vec{u}] d\vec{u}$$

Es wird also die Überlappungsfunktion berechnet und nach ihrem Maximum gesucht.

Bei der Anwendung der Rotationsfunktion ist es wichtig, dass die starken Reflexe berücksichtigt werden, da die Pattersonkarte hauptsächlich durch diese bestimmt wird. Niedrig aufgelöste Reflexe sind von der Rotation größtenteils unbeeinflusst, während die hoch aufgelösten sehr stark von der Proteinstruktur abhängen.

Die einfachste Methode zur Berechnung einer Translationsfunktion besteht darin, das bekannte Molekül durch die asymmetrische Einheit zu bewegen und die von diesem berechneten Struktur Faktoren  $F_{calc}$  mit den beobachteten  $F_{obs}$  zu vergleichen, indem der  $R$ -Faktor oder der Korrelationskoeffizient berechnet werden:

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}| - k |F_{calc}|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$$

$$C = \frac{\sum_{hkl} (|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2}) \times (|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2})}{\sqrt{\sum_{hkl} (|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2})^2 \sum_{hkl} (|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2})^2}}$$

In einem gezielteren Ansatz als einer solchen zufälligen Suche (Huber, 1965) werden die Kreuzvektoren der bekannten Struktur mit denjenigen der beobachteten Pattersonkarte verglichen. Dabei werden die Kreuzvektoren unter Annahme einer Raumgruppe zwischen zwei symmetrie-verwandten Molekülen berechnet, und man erhält eine Translationsfunktion

$$T(\vec{t}) = \int_V P_{1,2}(\vec{u}, \vec{t}) \times P(\vec{u}) d\vec{u}$$

wobei  $P(\vec{u})$  die beobachtete Pattersonfunktion ist und  $P_{1,2}(\vec{u}, \vec{t})$  die der Modellstruktur. Wenn der intermolekulare Vektor  $\vec{t}$  der Modellstruktur gleich dem beobachteten intermolekularen Vektor  $\vec{t}_0$  ist, weist die Translationsfunktion  $T(\vec{t})$  ein Maximum auf.

Eine andere Form der Translationsfunktion berücksichtigt nicht nur zwei sondern alle Moleküle in der asymmetrischen Einheit, so dass die Translationsfunktion eine dreidimensionale

Funktion wird. Eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses läßt sich dadurch erreichen, dass man von den benachbarten Pattersonkarten die Selbstvektoren abzieht.

Die Methode des molekularen Ersatzes setzt voraus, dass eine Proteinstruktur bekannt ist, die als Modell für die zu bestimmende dienen kann. In vielen Fällen können aber die Rotationsfunktion und die Translationsfunktion trotzdem nicht gelöst werden. Es kann notwendig sein, die Modellstruktur zu variieren, z.B. indem bewegliche oberflächennahe Bereiche oder Seitenketten nicht berücksichtigt werden. Mit der ständig zunehmenden Zahl von Proteinstrukturen ist der molekulare Ersatz jedoch eine ausgesprochen nützliche Methode zur Bestimmung der Phasen.



## II.4 Ziele der Arbeit

### II.4.1 Dcp

Bluthochdruck ist eine gefährliche Krankheit mit sehr hoher Verbreitung in den westlichen Ländern. In diesen Ländern stellt ein Versagen des Herz-Kreislauf-Systems die häufigste Todesursache dar. Daher besteht sowohl ein enormer Bedarf, aber auch eine ebenso hohe gesellschaftliche Verpflichtung, mehr über die molekularen Ursachen dieser Krankheiten zu lernen. Viele der bisher erhältlichen Medikamente setzen auf die Hemmung des Enzyms ACE (Angiotensin Conversions Enzym). Es hat sich gezeigt, dass *E. coli* eine Dipeptidyl Carboxypeptidase (Dcp) besitzt, die eine sehr große Ähnlichkeit in der Substratspezifität und speziell in den Inhibitorbindungseigenschaften zu ACE zeigt. Um Dcp als einfaches Modellsystem für die Entwicklung von spezifischen ACE-Inhibitoren zu nutzen, sollte dieses bakterielle Enzym strukturell und kinetisch weiter charakterisiert werden. Die umfassende biochemische und kristallographische Charakterisierung eines Proteins als potentiell Zielenzym für pharmazeutische Wirkstoffe erfordert große Mengen (10 bis 50 mg) an gereinigtem aktiven Protein. Solche Mengen sind nur rekombinant durch Überexpression des Enzyms z. B. in *E. coli*-Expressionssystemen zu gewinnen.

### II.4.2 MMPs

Zu Beginn dieser Arbeit an MMP-Strukturen standen bereits einige Strukturen von humanen MMPs (MMP-1, -2, -3, -7 und -8) zur Verfügung. Deren Vergleich hat gezeigt, dass diese Proteine ein hohes Maß an strukturellen Ähnlichkeiten aufweisen. Zudem ist die anfängliche Euphorie, mit Inhibitoren wie Batimastat, einen potenten MMP-Inhibitor, einen Ansatzpunkt für die Krebstherapie in der Hand zu haben, inzwischen einer Ernüchterung gewichen. In letzter Zeit mussten die Studien von einigen MMP-Inhibitoren, die sich in klinischen Phasen (bis zu Phase III) befanden, eingestellt werden, da sie keine positive Wirksamkeit zeigten. Im Falle von Batimastat wurde sogar festgestellt, dass die Behandlung von Patienten mit diesem Breitband-MMP-Inhibitor ein höheres Risiko der Metastasen-Bildung in sich birgt. Dies wurde bei humanen Brustkrebszellen in Lebern von Mäusen festgestellt. (Krüger et al., 2001). Da die entscheidende Beteiligung von MMPs in onkologischen und anderen pathologischen Prozessen unbestritten ist und die Probleme in der Therapie vor allem in der relativ geringen Spezifität der MMP-Inhibitoren begründet zu sein scheinen, kann die Lösung dieser unbefriedigenden Situation nur in der konsequenten Strukturaufklärung weiterer MMPs liegen, um möglichst viele Daten für ein rationelles Wirkstoffdesign in den Händen zu haben.

Insbesondere setzt sich diese Arbeit zum Ziel, auf der Grundlage experimentell bestimmter Kristallstrukturen von MMP-12, MMP-13 und MT3-MMP ein detailliertes Verständnis weiterer Spezifitätsmerkmale zu erlangen. Dies ist eine Voraussetzung zur Entwicklung spezifischer MMP-Inhibitoren mit reduzierten Nebenwirkungen bzw. unerwünschten Wirkungen.

Die Kontrolle der MMP-Aktivität erfolgt hauptsächlich durch die TIMPs, die 1:1-Komplexe mit hoher Affinität mit den MMPs ausbilden. Bislang sind zwei Komplexe von katalytischen Domänen von MMPs mit TIMPs veröffentlicht worden. Dabei wurde noch keine befriedigen-

de Antwort auf die Frage gefunden, wie es zu der außergewöhnlich geringen Affinität zwischen MT1-MMP und TIMP-1 kommt. Der Komplex aus MMP-13/TIMP-2 zusammen mit der MT3-MMP-Struktur soll weitere Erkenntnisse liefern, um entscheidende Interaktionen zwischen MMPs und TIMPs erneut zu evaluieren.

## III MATERIAL UND METHODEN

### III.1 Material

#### III.1.1 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien waren, soweit nicht anders vermerkt, p. A. Qualität und wurden von folgenden Herstellern bezogen: Fluka (Neu-Ulm), Merck Eurolab GmbH (Darmstadt), Sigma Aldrich (Deisenhofen), Serva (Heidelberg).

Chromatographiematerialien stammten von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden), Merck Eurolab GmbH (Darmstadt) und Whatman (Maidstone, MA, USA).

**Tabelle III-1:** Bezugsquellen von Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Bezugsquelle
Bacto-Agar	Difco, Detroit, MI, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, MI, USA
Bacto Hefe-Extrakt	Difco, Detroit, MI, USA
<i>Bam</i> HI	Roche Molecular Biochemicals GmbH
<i>Hind</i> III	Roche Molecular Biochemicals GmbH
<i>Stu</i> I	Roche Molecular Biochemicals GmbH
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs (NEB), Schwalbach
Ammoniumperoxodisulfat	Biorad, München
Protogel (30 % (w/v) Acrylamid / 0,8 % (w/v) Bis-acrylamid	National Diagnostics, Atlanta, GA, USA
IPTG	Biomol, Hamburg

#### III.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner GmbH (Frickenhausen) und PESKE (Aindling) bezogen. Ultra- und Sterilfiltrationseinheiten stammten von den Firmen Millipore (Bedford, USA) und Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI, USA). Kristallisationszubehör wurde von der Firma Hampton Research (Laguna Niguel, CA, USA) erworben.

**Tabelle III-2:** Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Spritzen	B. Braun Melsungen AG
Handschuhe	Semperit, Wien, Österreich
Slide-A-Lyzer Dialyserahmen	Pierce, Rockford, IL, USA
Dialyseschläuche	Roth, Karlsruhe

**Tabelle III-3:** Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Dioden-Array Photometer DU 7500	Beckman, München
Spektrophotometer Lambda 17	Perkin Elmer, Weiterstadt
Eagle EyeII	Stratagene, Heidelberg
Robocycler Gradient 96	Stratagene, Heidelberg
Electroporator 1000	Stratagene, Heidelberg
Sequenzierer 470A	Applied Biosystems, Foster City, USA
DNA-Sequenzierer Modell 373	Applied Biosystems, Foster City, USA
Goniometerkopf	Huber Diffractionstechnik, Rimsting
Kühlzentrifuge J2-21M	Beckman, München
Kühlzentrifuge Avanti J-25	Beckman, München
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5C Plus	Kendro Laboratory Instruments, Hanau
Branson Sonifier 250	Fa. G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Äkta Explorer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
FPLC-System mit Gradient Programmer und zwei Pumpen P500	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PHM 82 Standard pH-Meter	Radiometer, Copenhagen, Dänemark
Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Drehanoden Röntgengenerator RU200	Rigaku, Kent, England
Image Plate Detektor	MarResearch, Hamburg

Zur Datenverarbeitung aller Art wurden *Server* und *Workstations* der Firma DIGITAL *alpha stations* (OSF), SILICON GRAPHICS *work stations* und *compute server* (IRIX) unter Unix und IBM-kompatible PCs (Windows NT 4.0 und Windows 2000) eingesetzt.

### III.1.3 Puffer und Lösungen

Im Folgenden sind die Puffer und Lösungen in der Reihenfolge ihres Erscheinens im Methodenteil aufgelistet.

TAE Puffer	40 mM 1 mM	Tris/Acetate (pH 8,0) EDTA
10 x DNA-Probenpuffer	0,25 % (w/v) 0,25 % (w/v) 50 % (v/v)	Bromphenolblau Xylencyanol Glycerin
TE Puffer	10 mM 1 mM	Tris/HCl (pH 8,0) EDTA
5 x SDS-Probenpuffer	250 mM 5 % (w/v) 43,5 % (v/v) 10 mM 0,5 % (w/v)	Tris (pH 6,8) SDS Glycerin EDTA Bromphenolblau

1 x SDS-Probenpuffer, reduzierend	20 % (v/v) 1 % (v/v)	5 x SDS-Probenpuffer 2-Mercaptoethanol
10 x Laufpuffer für PAGE	30 g 144 g 10 g	Tris Glycerin SDS ad 1 Liter
Coomassie-Färbelösung	30 % (v/v) 10 % (v/v) 0,2 % (v/v)	Ethanol Essigsäure (konz.) Coomassie Brilliant Blue R-250
Polymyxin B-Puffer	10 mM 150 mM 5 mM 1 mg/ml	MOPS/NaOH (pH 7,0) NaCl EDTA Polymyxin B sulfat

### III.1.4 Bakterienstämme

Für die Klonierung wurde der *E. coli* K12 Stamm W3110 (Bachmann, 1972) verwendet. Der Genotyp des Stamms ist: *F<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, thyA36, deoc2, IN (rrnD-rrnE)*.

Für die Expression wurde der *E. coli* K12 Stamm JM83 (Yanisch-Perron et al., 1985) verwendet. Der Genotyp des Stamms ist: *F<sup>+</sup> ara, D (lac-pro AB), rpsL (=strA), F80, lacZDM15*.

### III.1.5 Nährmedien

LB (Luria-Bertani) Medium	1,0 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,5 % (w/v)	Bacto Trypton Bacto Hefe Extrakt NaCl
SOC Medium	1,0 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,5 % (w/v) 12,5 mM 12,5 mM 20,0 mM	Bacto Trypton Bacto Hefe Extrakt NaCl MgCl <sub>2</sub> MgSO <sub>4</sub> Glucose

Die Medien wurden durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C und 2 bar sterilisiert. LB-Agar wurde durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Bacto-Agar vor dem Autoklavieren hergestellt. Zur Herstellung des SOC Mediums wurde nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50°C eine

sterilfiltrierte Glucose-Lösung (20 % (w/v)) hinzugefügt. Ebenso erfolgte die Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml) nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50°C.

### III.1.6 Plasmid pDcp

Alle Klonierungen und Expressionen der rekombinanten Proteine wurden in einem pRBI-DsbC Plasmid durchgeführt (Maskos, 1995).

Die Selektion erfolgt über Ampicillin Resistenz. Die Kontrollregion besteht aus einem lac-Promoter und einer Bindestelle für den lac-Repressor. Die Expression wird über die IPTG induzierte Dissoziation des Repressors vom Operator eingeleitet und erfolgt über die zelleigene RNA-Polymerase.

### III.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei MWG Biotech, Ebersberg, synthetisiert und RP bzw. HPSFgereinigt.

**Tabelle III-4:** Oligonukleotide zur Klonierung von Dcp

Name	Sequenz
DCP-N	GTT CAG GAG AAG GCC TTG ACA ACA ATG AAT CCT TTC CTT GTG
DCP-C	CAG GCC AGC CAG GAT CCA AGC TTA TAT GTT CAA GCC ACG ATG TTG CAG C

## III.2 Methoden

### III.2.1 Molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Arbeiten wurden entsprechend Sambrook et al., 1989 durchgeführt und sind hier nicht im einzelnen aufgeführt.

#### III.2.1.1 Isolierung von DNA

##### III.2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA für alle nachfolgenden Experimente (analytischer und präparativer Restriktionsverdau, PCR, Sequenzanalyse) wurde mittels des Qiagen Plasmid Preparation Kit (Mini) der Qiagen GmbH (Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Bei dieser Methode folgt auf eine alkalische Lyse der Bakterienzellen (Birboim & Doly, 1979) und gleichzeitigem Abbau der zellulären RNA durch RNase A die Bindung der DNA unter Hochsalzbedingungen an ein Glasvlies. An dieser Oberfläche kann die DNA gewaschen und anschließend in Niedrigsalzpuffer oder Wasser frei von Salzen, Proteinen oder anderen zellulären Verunreinigungen eluiert werden. Typischerweise wurde die DNA aus 1,5 ml LB-ÜN-Kultur in 100 µl Wasser mit einer Konzentration von 100 ng/µl eluiert.

### III.2.1.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung einzelner DNA-Fragmente, etwa nach einem Restriktionsverdau, wurden diese zunächst über Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden dann mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel isoliert. Dabei wird das Agarosegel zunächst solubilisiert, anschließend die DNA unter Hochsalzbedingungen an ein Silicagel gebunden, gewaschen und in 10 mM Tris/HCl (pH 8,5) eluiert.

### III.2.1.2 Charakterisierung von DNA

#### III.2.1.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde im Agarosegel im Vergleich mit der Intensität der Banden des Größenstandards abgeschätzt oder photometrisch bestimmt. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht 50  $\mu\text{g/ml}$  Plasmid-DNA, der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der DNA und beträgt 2 für reine DNA. Je niedriger der Quotient, desto größer ist die Verunreinigung mit Proteinen, die bei 280 nm absorbieren.

#### III.2.1.2.2 Restriktionsanalyse

Durch Restriktionsverdau wurde der Klonierungserfolg bestimmt. Hierzu wurden typischerweise 0,5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit 10 U Enzym unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen für 1 Stunde inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

#### III.2.1.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Fragmenten gemäß ihrer Größe erfolgte in 1 % (w/v) Agarosegelen. Die Agarose wurde in 100 ml TAE-Puffer aufgekocht, bei etwa 60°C wurden 50  $\mu\text{g}$  Ethidiumbromid zugesetzt und die Lösung in eine horizontale Gelapparatur (8 x 12,5  $\text{cm}^2$ ) gegossen. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit 10 x Probenpuffer versetzt. Nach Erstarren der Agarose wurden die Proben aufgetragen und die Elektrophorese mit TAE als Elektrodenpuffer bei einer konstanten Spannung von 140 V durchgeführt. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Banden anhand ihrer Fluoreszenz durch das interkalierte Ethidiumbromid bei 254 nm detektiert und die Größe der Fragmente anhand Größenstandards (New England Biolabs, Schwalbach) ermittelt.

#### III.2.1.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) wurde nach der Methode von Mullis und Faloona (Mullis & Faloona, 1987) durchgeführt.

Es wurden der *Pwo*-DNA-Polymerase Kit und der PCR Nucleotide Mix der Firma Roche Molecular Biochemicals GmbH verwendet. Die Reaktion wurde in einem Robocycler Gradient 96 (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt.

Typische Reaktionsbedingungen in einem 50 µl-Ansatz waren wie folgt:

10 mM	Tris/HCl (pH 8,85)
25 mM	KCl
5 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2 mM	MgSO <sub>4</sub>
10 ng	Template DNA
1 µM	je Oligonukleotid
0,2 mM	dNTPs (N=A,T,G,C)
2,5 Units	<i>Pwo</i> DNA Polymerase

Die Reaktion lief nach folgendem Programm ab:

t	T	Anzahl Zyklen
300 sec	94°C	1
30 sec	94°C	} 10
45 sec	54°C-66°C	
150 sec	72°C	
30 sec	94°C	} 10
45 sec	54°C-66°C	
180 sec	72°C	
30 sec	94°C	} 4
45 sec	54°C-66°C	
300 sec	72°C	
600 sec	72°C	1
-	4°C	Lagerung

Durch parallele Ansätze bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen (4°C-Schritte) konnten hohe PCR-Ausbeuten erreicht werden. Die erhaltenen Produkte wurden anschließend mittels des QIAquick-PCR-Purification-Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und in 50 µl TE-Puffer eluiert.

### III.2.1.2.5 Sequenzierung

Alle neu hergestellten Konstrukte wurden einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Sequenzierung erfolgte durch eine Variante der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) über Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide in einer *cycle sequencing*-Reaktion.

Dazu wurden typischerweise 0,6 µg Plasmid-DNA mit 3,2 pmol Sequenzierprimer und 4 µl ABI PRISM *ready reaction BigDyeDeoxy terminator cycle sequencing kit* (Terminator Mix)



versetzt und mit Wasser ad 10 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde mit 30 µl Mineralöl überschichtet und einer *thermocycling*-Reaktion unterzogen.

Die Reaktion lief nach folgendem Programm ab:

t	T	Anzahl Zyklen
240 sec	96°C	1
30 sec	96°C	} 25
30 sec	50°C	
240 sec	60°C	
-	4°C	Lagerung

Die Proben wurden ad 20 µl mit Wasser aufgefüllt, das Gemisch unterschiedlich langer DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und die einzelnen Stränge anhand der Fluoreszenz des Abbruchnukleotids identifiziert. Die Elektrophorese, die Detektion der Fluoreszenzsignale und deren Auswertung wurden von Herrn Marius Boicu am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried mit einem DNA-Sequenator Modell 373, Applied Biosystems, USA, durchgeführt.

### III.2.1.3 Klonierung in *E. coli*

#### III.2.1.3.1 Präparativer Verdau

Zur Klonierung der PCR Produkte wurden jeweils etwa 2 µg von Produkt und Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nach Angaben der Hersteller geschnitten. Die Reaktion wurde anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten Banden wie unter III.2.1.1.2 beschrieben extrahiert und aufgereinigt.

#### III.2.1.3.2 Ligation

Die kovalente Verknüpfung zweier DNA-Fragmente nach Spaltung durch Restriktionsenzyme erfordert die Bildung von Phosphodiesterbindungen durch DNA-Ligase. Dazu muss mindestens ein DNA-Fragment einen Phosphatrest am 5'-Ende tragen. In einem Ligationsansatz wurden geschnittener Vektor und die Insert-DNA in einem Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Ligation erfolgte für 16 Std. bei 16°C.

Typische Reaktionsbedingungen eines Ligationsansatzes waren wie folgt:

150 - 300 ng	Vektor DNA
x ng	Insert DNA (molares Verhältnis von Vektor zu Insert, siehe oben)
2 µl	10 x Ligationspuffer (NEB)
1 µl	T4 DNA-Ligase (NEB)
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O bidest.

### III.2.1.3.3 Transformation

#### III.2.1.3.3.1 Chemisch kompetente Zellen

Kompetente *E. coli* JM83-Zellen wurden nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Sambrook et al., 1989) hergestellt und in 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden Aliquots vorsichtig auf Eis aufgetaut, der Ligationsansatz hinzugegeben, 30 min auf Eis und 1 min bei 42°C inkubiert, 0,7 ml LB-Medium hinzugegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf SOC-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

#### III.2.1.3.3.2 Elektrokompente Zellen

Im Gegensatz zur Transformation von chemisch kompetenten Zellen (wie unter III.2.1.3.3.1 beschrieben) ist die Elektroporation um den Faktor 100 effizienter und es können auch sehr große Plasmide gut in die Zelle eingeschleust werden.

Elektrokompente *E. coli* JM83-Zellen wurden hergestellt durch Animpfen von LB-Medium mit 2 % einer LB-ÜN-Kultur und Inkubation bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7. Die Zellen wurden zentrifugiert und das Pellet in eisgekühltem H<sub>2</sub>O bidest resuspendiert. Dieser Zentrifugationsschritt und das Resuspendieren in eisgekühltem H<sub>2</sub>O-bidest wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet mit eisgekühltem 15 % Glycerin gewaschen, erneut zentrifugiert, der Überstand quantitativ entfernt und das Pellet im 1,5-fachen des Pelletvolumens in eisgekühltem 15 % Glycerin resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für die Elektroporation wurden die Aliquots vorsichtig auf Eis aufgetaut, zusammen mit dem Ligationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und diese in einen Electroporator 1000 (Stratagene, Heidelberg) gestellt. Die Elektroporation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Sofort anschließend wurde die Bakteriensuspension mit 1 ml LB-Medium versetzt, vorsichtig gemischt, 30 min bei 37°C inkubiert, auf LB-Agar (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

#### III.2.1.3.4 Analyse der Transformanden

Einzelkolonien der Transformation wurden mit sterilen Zahnstochern aufgenommen, in 1,5 ml LB-Medium 12 bis 18 Stunden bei 37°C vermehrt und die Plasmid-DNA mit QIAprep Spin-Plasmid-Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Ein analytischer Restriktionsverdau mit anschließender Gelelektrophorese gab Aufschluß über den Klonierungserfolg. Jeweils 5 bis 7 Klone wurden für die nachfolgende Sequenzierung und Expressionsanalyse ausgewählt.

#### III.2.1.3.5 Expressionsanalyse

4 ml LB-Medium wurden mit 2 % einer LB-ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C bebrütet. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7 bis 0,9 wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert.

Zu verschiedenen Zeitpunkten (typischerweise 0, 4, 18 Stunden nach Induktion) wurde 1 OD<sub>600</sub> Kultur abgenommen, abzentrifugiert und das Pellet bei -20°C gelagert.

Die Pellets wurden in 250 µl 20 mM Tris/HCl (pH 7,2) resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung (2 Pulse à 30 sec mit 50 % Intensität) mit einem Branson Sonifier® 250 Cell-Disruptor (Fa. G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd) aufgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (14000 g, 10 min, 4°C) abgetrennt und in 150 µl reduzierendem 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Der Überstand wurde mit reduzierendem 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden durch Erhitzen auf 95°C denaturiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

### III.2.1.3.6 Glyzerinkulturen

Zur längeren Lagerung von Zellen wurden Glyzerinkulturen hergestellt. Nach Vermehrung der Zellen in LB-Medium (6 bis 18 Stunden bei 37°C) bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 1 wurden zur Zellsuspension 15 % (v/v) Glycerin zugegeben, schnell gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

## III.2.2 Proteinanalytische Methoden

### III.2.2.1 Polyacrylamid - Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Gelanalyse

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe auf Polyacrylamidgele wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt.

Für die denaturierende SDS-PAGE wurden 12 % Trenngele und 3 % Sammelgele mit 0,1 % SDS gegossen.

Die Proben wurden in SDS-haltigem Probenpuffer aufgekocht. Es wurden typischerweise 8 µl Probe in die Gelspuren geladen. Als Größenstandard wurden 10 µl des *Broad Range Premixed Prestained Protein Molecular Weight Markers* SEEBLUE (Novex) verwendet.

Die Auftrennung erfolgte in Gegenwart von SDS-haltigem Laufpuffer in einer vertikalen Gelapparatur bei 80 bis 180 V.

Nach Austritt der Bromphenolblau-Lauffront aus dem Gel (nach 1,5 bis 2 Stunden Laufzeit) wurde der Lauf gestoppt. Das Gel wurde in Coomassie-Färbelösung kurz in einer Mikrowelle erhitzt und anschließend 10 min gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit H<sub>2</sub>O.

Die entfärbten Gele wurden zur Dokumentation mit Eagleeye II (Stratagene) fotografiert oder mittels eines Flachbettscanners (HP Scanjet 6100C) eingescannt und anschließend mit etwas Wasser und Na-Azid in Plastikfolie eingeschweißt bei 4°C aufbewahrt.

### III.2.2.2 Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration wird das Protein von einer Membran zurückgehalten, während Lösungsmittelmoleküle (meist Wasser) und niedermolekulare Pufferbestandteile durch Druck oder Zentrifugationskräfte durch die Membran gepreßt werden.

Zur Aufkonzentrierung wurden in der vorliegenden Arbeit Zentrifugationskonzentratoren des Typs Centriprep ( $V = 15$  ml) und Centricon ( $V = 2$  ml) der Firma Millipore verwendet. Die Ausschlussgrenze der Zentrifugationseinheiten richtete sich nach der Größe des bearbeiteten Proteins.

### III.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde photometrisch über die Absorption bei 280 nm bestimmt. Aus der Aminosäuresequenz von Proteinen lässt sich anhand der Anzahl der Tryptophan- und Tyrosinreste der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon_{280}$ ) für das Protein errechnen (Gill & von Hippel, 1989). Bei ungereinigten Präparationen wurde der Zusammenhang von  $1 E_{280} = 1$  mg/ml Protein angenommen.

### III.2.2.4 Aminoterminaler Sequenzierung nach Edman

Die automatisierte Sequenzanalyse arbeitet nach dem Prinzip des Edman-Abbaus (Edman & Henschen, 1975). Bei diesem Verfahren wird die N-terminale Aminosäure mit Phenylisothiocyanat (PITC) zur Reaktion gebracht, dabei als Phenylthiohydantoin-Derivat (PTH-Derivat) abgespalten und nach einer HPLC-Auftrennung durch den Vergleich mit einem Standard-Aminosäurengemisch identifiziert.

Zur N-terminalen Sequenzierung wurden ca. 30  $\mu$ g Dcp in einem Niedrigsalzpuffer dialysiert. Die anschließende aminoterminaler Sequenzierung wurde von Herrn Dr. Mann am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried auf einem Applied Biosystems Sequenzierer 470A durchgeführt.

## III.2.3 Herstellung rekombinanter Dicarboxypeptidase (Dcp)

### III.2.3.1 Allgemeines

#### III.2.3.1.1 Umpuffern durch Dialyse

Alle Dialysen wurden bei 4°C gegen ein mindestens 100-faches Volumen Dialysepuffer durchgeführt. Das 100-fache Volumen konnte bei kleinen Probenvolumina in einem Schritt erreicht werden (Beispiel: 1 ml gegen 100 ml), bei größeren Volumina wurden die Dialysen in mehreren Schritten durchgeführt (Beispiel: 1 l gegen 2 x 10 l). Je größer das Probenvolumen war, desto länger wurden die einzelnen Schritte durchgeführt, um die verlängerten Diffusionszeiten auszugleichen.

#### III.2.3.2 Präparative Expression

Für die präparative Expression wurden 6 l LB-Medium (100 mg/l Ampicillin) mit 2 % einer ÜN-Kultur beimpft und die Kultur unter Schütteln bei 37°C bebrütet. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 bis 0,9 wurde die Expression durch Zugabe von IPTG ad 1 mM induziert. Nach etwa

15 Stunden Expression bei RT wurde die Biomasse durch Zentrifugation (Beckman J-6M/E Zentrifuge, JS 4.2 Rotor, 4200 rpm, 25 min, 4°C) geerntet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Die Ausbeute lag bei etwa 4 bis 5 g Biomasse (Naßgewicht) je Liter Schüttelkultur.

### III.2.3.3 Periplasmaaufschluß

Zur Extraktion von Dcp aus dem Periplasma wurden die Zellpellets in 100 ml eisgekühlten Polymyxin B-Puffer resuspendiert und 30 Minuten lang vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert (Beckman Avanti J-25 Zentrifuge, JA-25.50 Rotor, 20000 rpm, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde weiteren Reinigungsschritten zugeführt.

### III.2.3.4 Gesamtzellaufschluß

Die Zellpellets des Periplasmaaufschlusses wurden in 40 ml 100 mM Tris/HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA resuspendiert und die Zellen unter Eiskühlung durch Ultraschallbehandlung (2 Pulse à 4 min und ein Puls à 2 min mit jeweils 50 % Intensität) mit einem Branson Sonifier 250 aufgeschlossen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (Beckman Avanti J-25 Zentrifuge, JA-25.50 Rotor, 20000 rpm, 20 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und weiteren Reinigungsschritten zugeführt. Die abzentrifugierten Zelltrümmer wurden verworfen.

### III.2.3.5 Reinigung des Enzyms

Die Extrakte der beiden Aufschlüsse wurden auf verschiedene Arten gereinigt. Zunächst wurden die Überstände des Periplasma- und Gesamtzellaufschlusses jeweils gegen 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) dialysiert. Nach der Dialyse des Gesamtzellextrakts wurde vor weiteren Reinigungsschritten präzipitiertes Protein durch Zentrifugation (Beckman Avanti J-25 Zentrifuge, JA-25.50 Rotor, 20000 rpm, 20 min, 4°C) abgetrennt.

Beide dialysierten Lösungen wurden jeweils im ersten Schritt über Anionenaustauschchromatographie (DE52 Cellulose, Whatman, Maidstone, MA, USA) aufgereinigt. 20 g DE52 Cellulose je 100 ml Extraktlösung wurden mit Dialysepuffer äquilibriert und das Dialysat mit einem Fluss von 2 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde mit Äquilibrierungspuffer bis zum Erreichen einer Basislinie gewaschen und das gebundene Protein im NaCl-Gradienten (0 - 400 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 8 CV) eluiert. Dcp eluierte bei etwa 200 mM NaCl zu Beginn des Elutionsprofils.

Dcp aus dem Periplasmaextrakt wurde gegen 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dialysiert und durch hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose High Performance (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) weiter aufgereinigt.

1 ml Phenyl-Sepharose pro 9 mg vorgereinigtem Dcp wurde mit 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  äquilibriert und das Protein mit einem Fluss von 3 ml/min aufgetragen. Es

wurde bis zum Erreichen einer Basislinie mit Äquilierungspuffer nachgewaschen und das gebundene Dcp im Ammoniumsulfat-Gradienten eluiert (1 M - 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 8 CV). Das saubere Dcp eluierte bei etwa 500 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Es folgte eine Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 100  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ . Die Ausbeute lag bei etwa 2 mg Dcp je Liter *E. coli*-Fermentationsansatz.

Dcp aus dem Gesamtzellextrakt wurde nach der DE52-Reinigung und einer anschließenden Dialyse gegen 10 mM  $(\text{K/Na})_3\text{PO}_4$  (pH 7,5) mittels Chromatographie an Hydroxyapatit (Bio-Gel HT, Biorad, Hercules, CA, USA) weiter gereinigt. 1 ml Hydroxyapatit pro 7 mg vorgereinigtem Dcp wurde mit 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) äquilibriert und das Protein mit einem Fluss von 2 ml/min aufgetragen. Die Verunreinigungen adsorbierten an das Säulenmaterial und Dcp lief ohne zu binden durch die Säule.

Dieser Durchlauf wurde gegen 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl dialysiert und anschließend in Centricons (clear, cut-off 30.000 Da) auf 1,5 ml konzentriert.

Der letzte Schritt der Reinigung war eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex-Säule (HiLoad 26/60, Superdex 75 prep grade, Amersham Pharmacia Biotech). Die Säule wurde mit 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl äquilibriert und das Protein mit einem Fluss von 2 ml/min aufgetragen. Die Dcp-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Ausbeute lag bei etwa 7 mg Dcp je Liter *E. coli*-Fermentationsansatz.

## III.2.4 Enzymatische Methoden

### III.2.4.1 Aktivitätsassay

Die Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Dcp erfolgte im chromogenen Assay.

Das Substrat (*para*-nitrobenzyloxycarbonylglycyl-(*S*-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol)-L-cysteinyglycin,  $\text{NO}_2\text{-Z-S-NBD-CysGly}$ ) wird durch Dcp schnell zu 7-*S*-Cysteinyglycin-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (*S*-NBD-CysGly) hydrolysiert. Dieses erfährt spontan einen  $\text{S} \rightarrow \text{N-Shift}$  und lagert sich zu 7-*N*-Cysteinyglycin-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (*N*-NBD-CysGly) um. *N*-NBD-CysGly hat ein zu höheren Wellenlängen verschobenes Absorptionsmaximum von 461 nm (*S*-NBD-CysGly eines von 423 nm). Zugabe von 4,4'-dithiodipyridin führte zur Bildung des gemischten Disulfids, einhergehend mit einem Anstieg der Absorption bei 470 nm.

Aus der linearen Anfangssteigung der Absorptionsänderung wurde die  $\Delta\text{OD}_{470}/\text{min}$  als Maß für die Aktivität des untersuchten Enzyms berechnet. Die linearen Anfangssteigungen wurden über lineare Regression erhalten, wobei die Korrelation immer über 0,99 lag.

Das Substrat wurde in sterilem destilliertem Wasser gelöst und die Konzentration photometrisch bei 423 nm bestimmt ( $\epsilon_{423} = 13900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , (Persson et al., 1978)). Die Absorptionsänderung wurde in 1 ml Plastikkuvetten in einem Lambda 17 Photometer (Perkin Elmer, Weiterstadt) über einen Zeitraum von 100 sec verfolgt. In Tabelle III-5 sind die Bedingungen aufgeführt, unter denen eine  $\Delta\text{OD}_{470}/\text{min}$  von etwa 0,1 erreicht wurde.

**Tabelle III-5:** Bedingungen im Aktivitätstest

Reaktionsvolumen 400 µl bei 37°C	
37,5 µM	Hepes, pH 7,3
100 mM	NaCl
400 mM	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,5 µM	Dcp
200 µM	DTB
36 µM	Substrat (NO <sub>2</sub> -Z-S-NBD-CysGly)

### III.2.4.2 Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Konstanten

Für die Cokristallisation von Dcp mit Inhibitor sollten aus verschiedenen ACE-Inhibitoren gut inhibierende Hemmstoffe ausgewählt werden. Um eine schnelle Charakterisierung zu ermöglichen, wurden die IC<sub>50</sub>-Werte von 5 verschiedenen Inhibitoren ermittelt. Dazu wurden die linearen Anfangsgeschwindigkeiten der Substrathydrolyse bei 10 bis 15 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bestimmt. Zunächst wurden die  $\Delta OD_{470}/\text{min}$  wie unter III.2.4.1 beschrieben bei 37°C gemessen. Diese Anfangsgeschwindigkeiten wurden anschließend gegen die entsprechenden Inhibitorkonzentrationen aufgetragen und eine an die Daten angepasste Regressionskurve mit der folgenden Formel erstellt:

$$Y = B \left( 1 + \frac{m_0}{A} \right)$$

Y = Anfangsgeschwindigkeit (Y-Wert)

m<sub>0</sub> = Inhibitorkonzentration (X-Wert)

A = IC<sub>50</sub>

B = Fittingparameter

**Tabelle III-6:** Verwendete Inhibitoren

Inhibitor Nr.	Name/Formel
H-2205	Bradykinin Potentiator B Pyr-GLPPRPKIPP-OH
N-1170	H-Val-Trp-OH
H-2215	BBP 9A Pyr-WPRPQIPP-OH
N-1450	H-PTHIKWGD-OH
N-1140	H-Lys(Tfa)-Pro-OH

Sämtliche Inhibitoren wurden von BACHEM Biochemica GmbH, Heidelberg bezogen.

## III.3 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

### III.3.1 Kristallisation von Proteinen

Alle Kristallisationsexperimente wurden nach der Dampfdiffusionsmethode (McPherson, 1976) durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein Tropfen einer verdünnten Lösung in einer abgeschlossenen Kammer zusammen mit einer größeren Menge höher konzentrierter Lösung (Reservoir) inkubiert. Über den Dampfdruck stellt sich im verdünnten Tropfen die Konzentration der Reservoirlösung ein.

Mittels eines sparse matrix screens (Jancarik et al., 1991; Cudney et al., 1994) mit Reservoirlösungen, in denen eine Reihe von Zusätzen (Präzipitationsmittel, Lösungsmittel, Salze, Stabilisatoren etc.) gegen verschiedene pH-Werte variiert wurde, erfolgte die Suche nach Kristallisationsbedingungen für die verschiedenen im Verlauf der Arbeit bearbeiteten Proteinase.

Alle Screening-Experimente wurden mit sitzendem Proteintropfen in Polystyrol-Chryschem-Platten durchgeführt und bei 4°C oder 20°C inkubiert. Typischerweise wurden 300 µl Reservoirlösung eingesetzt und 2 µl Reservoir mit 2 µl Proteinlösung (8-20 mg/ml) am Beginn des Experiments gemischt. Das langsame Aufkonzentrieren des Tropfens resultiert in einer übersättigten Proteinlösung, aus welcher unter geeigneten Bedingungen die Kristallisation des Proteins initiiert wird.

### III.3.2 Datensammlung und Datenauswertung

Zur Messung von Diffraktionsdaten bei RT wurden Kristalle in silanisierten Quarzkapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,7 bis 1 mm montiert und mittels einer ausgezogenen Pasteurpipette und dünner Filterpapierstreifen vom Lösungsmittel befreit. Etwas Reservoirlösung wurde räumlich getrennt in der Kapillare belassen, um ein Austrocknen des Kristalls zu verhindern. Anschließend wurde die Kapillare an beiden Enden mit Harvard-Dentalwachs (Harvard Dental GmbH, Berlin) verschlossen.

Alle Datensätze wurden zum Erzielen höherer Auflösungen auch an der Wiggler Beamline BW6 (DESY, HASYLAB, Hamburg) gemessen. Zur Messung am Synchrotron wurden alle Kristalle in Schlaufen aus Nylon (Cryoloops, Hampton Research) aufgenommen, in Cryopuffer transferiert und im Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren. Die Kristalle wurden dann im gefrorenen Zustand montiert und die Diffraktionsbilder bei Wellenlängen von  $\lambda = 1,0503 \text{ \AA}$  mit MarResearch *Charge-Coupled-Device*-Detektoren oder auf *Image Plate* Systemen aufgenommen.

Die Datensammlung im Hause erfolgte bei 100 K durch verschiedene *Image Plates* der Firma MarResearch, die auf Rigaku-Drehanoden-Röntgeneratoren installiert waren ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ).

Zur Bestimmung der Kristallorientierung, Raumgruppe, Elementarzellenparameter sowie zur Integration der Reflexintensitäten wurden die Programme MOSFLM v6.01 (Leslie, 1991) und DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) eingesetzt. Die Datenreduktion wurde mit den Pro-



grammen SCALA (CCP4, 1994), TRUNCATE (CCP4, 1994) und SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) durchgeführt.

### III.3.3 Pattersonsuche

Die Lage der Proteinmoleküle in der asymmetrischen Einheit wurde über Pattersonsuche (*Molecular Replacement*) mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1994) bestimmt. Als Suchmodell dienten für MMP-12 die Koordinaten der katalytischen Domäne von MMP-3 (PDB-Eintrag 1uea (Gomis-Rüth et al., 1997)). Für MT3-MMP wurden die Koordinaten des PDB-Eintrags 1bqq (Fernandez-Catalan et al., 1998) verwendet und für den Komplex aus MMP-13 mit TIMP-2 die Koordinaten von cdMMP-13 (PDB-Eintrag 830c (Lovejoy et al., 1999)) und TIMP-2 (PDB-Eintrag 1bqq (Fernandez-Catalan et al., 1998)).

### III.3.4 Modellbau und Verfeinerung

Atomare Proteinmodelle wurden auf Silicon Graphics Computern sowie einem unter Windows NT 4.0 betriebenen PC (nur O (Jones et al., 1991)) mit den Programmen MAIN (Turk, 1992), O (Jones et al., 1991) und XTALVIEW (McRee, 1993) in  $2Fo-Fc$ - und  $Fo-Fc$ -Fouriersynthesen eingepaßt. Initiale Wassermoleküle wurden mit ARP (Lamzin & Wilson, 1997) in Differenz-Fouriersynthesen lokalisiert.

Proteinstrukturen mit individuellen isotropen Temperatur-Faktoren (MMP-13/TIMP-2 und MT3-MMP) wurden mit den Programmen XPLOR (Brünger, 1992b), CNS (Brünger et al., 1998) und REFMAC (CCP4, 1994; Murshudov et al., 1999) verfeinert. Die Verfeinerung individueller anisotroper Temperatur-Faktoren (Merritt, 1999) erfolgte mit den Programmen SHELXL (Sheldrick, 1997) und REFMAC (CCP4, 1994; Murshudov et al., 1999).

Alle Verfeinerungen wurden durch die Auszeichnung eines Testsets, das nicht für Verfeinerungen verwendet wurde, kontrolliert (Brünger, 1992a; Brünger, 1993).

### III.3.5 Analyse von Atommodellen

Die Molekülgeometrien der verfeinerten Modelle wurden mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) und WHATCHECK (Hoofst et al., 1996) analysiert. Überlagerungen und *least-square-fits* von Koordinaten wurden mit TOP3D (CCP4, 1994) durchgeführt. Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Programm STRIDE (Frishman & Argos, 1995) zugeordnet und gegebenenfalls anhand des finalen Proteinmodells manuell korrigiert.

### III.3.6 Graphische Darstellungen

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme BOBSCRIPT (Esnouf, 1997), MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), Raster3D (Merritt & Murphy, 1994), Swiss-PdbViewer (<http://www.expasy.ch/spdbv>) und PovRay (<http://pov-ray.org>) / MEGA POV benutzt. Oberflächen wurden mit den Programmen GRASP (Nicholls *et al.*, 1993) und

WebLab<sup>®</sup>ViewerPro<sup>™</sup> (Molecular Simulations Inc., 1999) sowie Swiss-PdbViewer (<http://www.expasy.ch/spdbv>) und PovRay / MEGA POV (<http://pov-ray.org>) berechnet und dargestellt. Zur Darstellung von Sequenzvergleichen wurde das Programm ALSRIPT (Barton, 1993) benutzt.

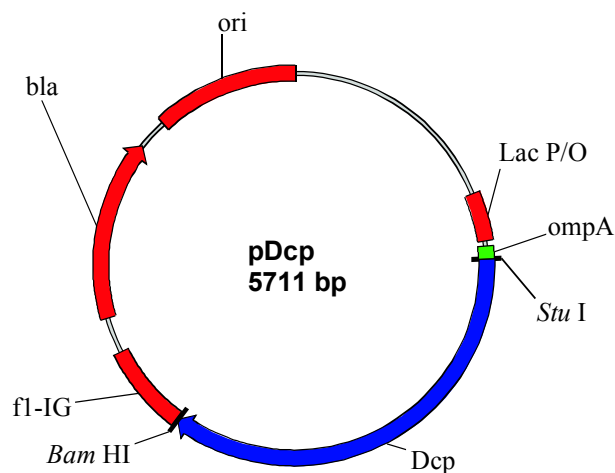
Zur Nachbearbeitung von Bildern sowie zur Konvertierung zwischen verschiedenen Formaten fanden die Programme GHOSTSCRIPT (Aladin Enterprises, USA), XV (J. Bradley, Pennsylvania, USA), PHOTOSHOP (Adobe Systems Inc., USA), ILLUSTRATOR (Adobe Systems Inc., USA) und CorelDRAW (Corel Corporation Limited, 1998) Verwendung.

## IV ERGEBNISSE

### IV.1 Dcp

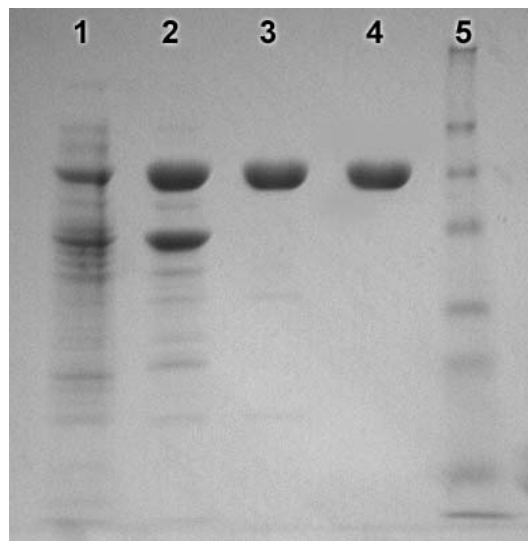
#### IV.1.1 Klonierung und Reinigung von Dcp

Das für Dcp kodierende Gen wurde wie in Material und Methoden beschrieben amplifiziert. Um einen Export von Dcp ins Periplasma zu ermöglichen, wurde das Dcp-Gen über die Schnittstelle *Stu* I und *Bam* HI in pRBI-DsbC kloniert und erhielt dadurch die OmpA-Signalsequenz.



**Abbildung IV-1:** Plasmid pDcp. lac P/O: lac Promotoroperator Region, OmpA: OmpA Signalsequenz, f1-IG: Intergenische Region von Phage f1; bla:  $\beta$ -Lacamase; ori: ColE1-Ursprung der Replikation.

Nach Aufschluß der *E. coli* Zellen durch Ultraschall wurde der lösliche Überstand nach Dialyse im ersten Schritt durch Anionenaustauschchromatographie über eine DE52-Cellulose-Säule gereinigt. Die Dcp enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Hydroxyapatit-chromatographie weiter gereinigt. Im letzten Schritt wurde eine Gelfiltration an Superdex S75 HiLoad 26/60 eingesetzt (vgl. Abbildung IV-2). Die Ausbeute betrug etwa 7 mg reines Dcp je Liter *E. coli* Kultur (siehe Kapitel III.2.3.5).



**Abbildung IV-2:** Coomassie gefärbtes, 12 %iges reduzierendes SDS-Gel der Reinigungsschritte für Dcp:

1. Gesamtzellaufschluß
2. Dcp enthaltende Fraktionen nach DE52
3. nach Hydroxyapatit
4. nach Superdex S75
5. Molekulargewichtstandard.

## IV.1.2 Biochemische Charakterisierung

### IV.1.2.1 N-terminale Sequenzierung

Bedingt durch die Schnittstelle *Stu* I ist das Codon der ersten Aminosäure nicht mehr frei wählbar. Dadurch erhält das prozessierte Dcp ein Leu anstelle des Met am N-Terminus.

Native Sequenz: MTTMN...

Rekombinante Sequenz: L TTMN...

Diese Sequenz konnte durch N-terminale Sequenzierung bestätigt werden.

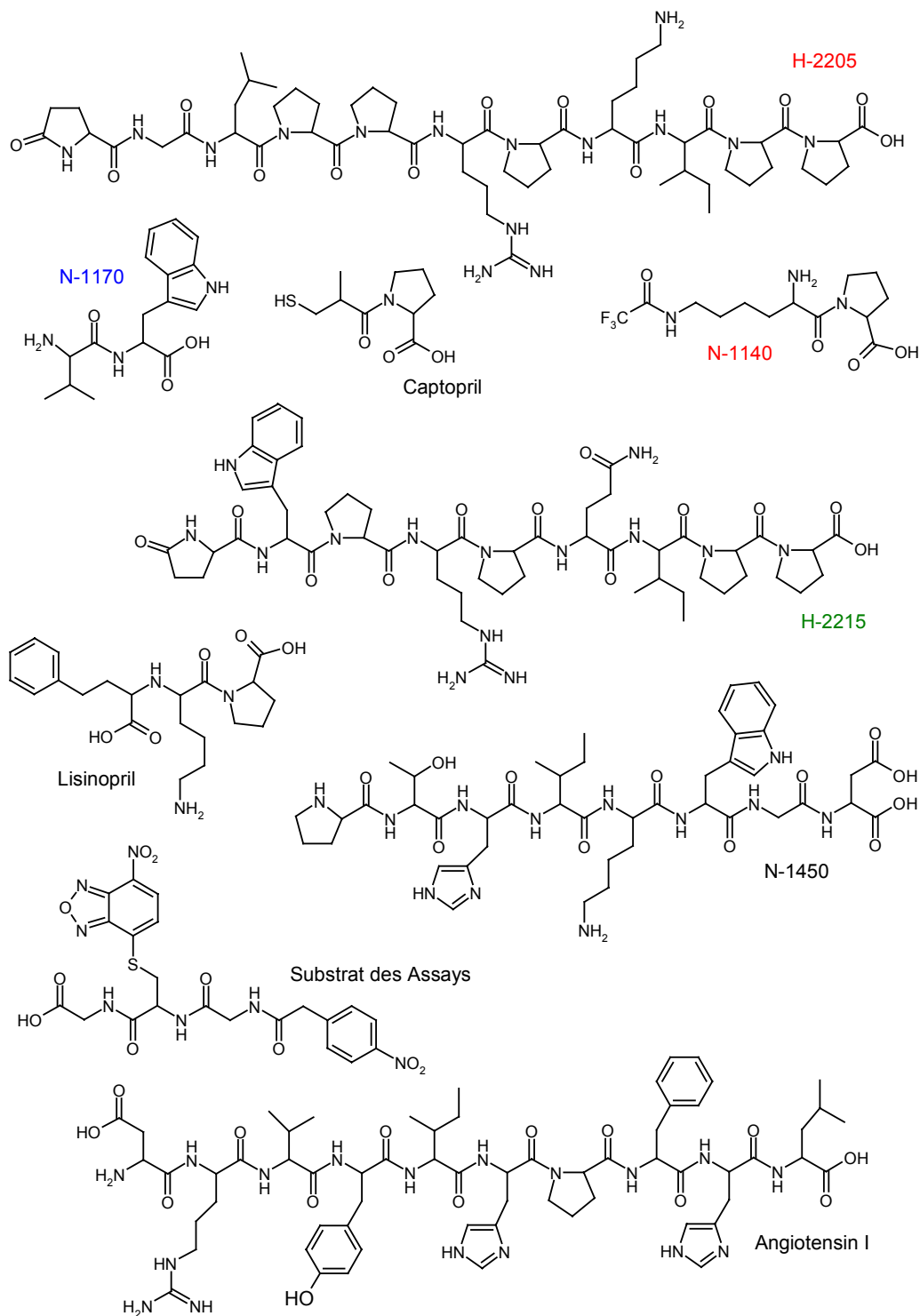
### IV.1.2.2 Enzymkinetik und $IC_{50}$ Bestimmung

ACE und Dcp weisen ähnliche aktive Zentren auf. Dies ist durch einige Substrat- und Inhibitoruntersuchungen belegt (Henrich et al., 1993). Um aus kommerziellen ACE-Inhibitoren möglichst viele für die Kristallisation von Dcp geeignete zu finden, wurden  $IC_{50}$ -Werte für eine Reihe von Inhibitoren bestimmt.

Der  $IC_{50}$ -Wert ist definiert als die Konzentration eines Inhibitors, die nötig ist, um die enzymatische Aktivität auf 50 % zu senken.

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte, wie in Kapitel III.2.4 beschrieben, photometrisch bei einer Wellenlänge von 470 nm. Die Enzymaktivität wurde auf die Ausgangsaktivität normiert und die relative Enzymaktivität gegen die Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Die tabellarische Aufstellung der  $IC_{50}$ -Werte erfolgt in Tabelle IV-1, die graphische in Abbildung

IV-4. Die folgende Abbildung IV-3 zeigt die Inhibitoren, das Substrat der betrachteten Reaktion und Angiotensin I, das natürliche Substrat von ACE.



**Abbildung IV-3:** Strukturformeln von ACE und Dep Inhibitoren, des im Inhibitionstest verwendeten Substrats und das natürliche Substrat von ACE, Angiotensin I.

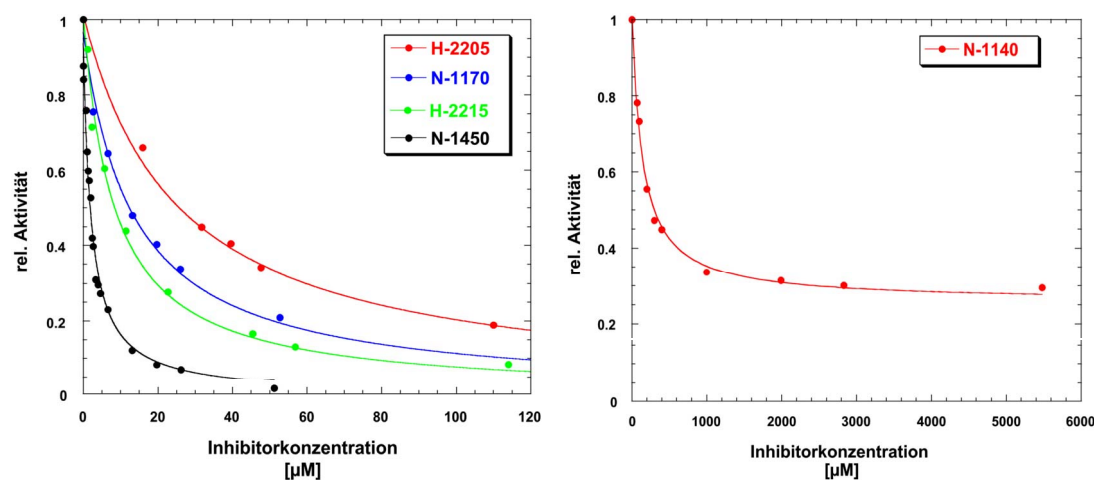


Abbildung IV-4: Inhibitionskurven zur  $IC_{50}$ -Bestimmung. Die maximale Hemmung für N-1140 betrug 75 %.

Tabelle IV-1:  $IC_{50}$ -Werte von ACE (human) und Dcp (*E. coli*) Inhibitoren.

INHIBITOR	NAME/FORMEL	Dcp $IC_{50}$ [ $\mu$ M]	ACE $IC_{50}$ [ $\mu$ M]
H-2205	Bradykinin Potentiator B Pyr-GLPPRPKIPP-OH	25,0	3 <sup>a</sup>
N-1170	H-Val-Trp-OH	13,3	1,6 <sup>b</sup>
H-2215	BBP 9A Pyr-WPRPQIPP-OH	8,2	0,9 <sup>c</sup>
N-1450	H-PTHIKWGD-OH	2,1	2 <sup>a</sup>
N-1140	H-Lys(Tfa)-Pro-OH	141,3	
	Captopril <sup>d</sup>	40 nM <sup>e</sup>	23 nM <sup>f</sup>
	Lisinopril <sup>g</sup>		5,6 nM <sup>f</sup>

<sup>a</sup> ACE aus Hasenlunge (Kohama et al., 1988)

<sup>b</sup> (Cheung et al., 1980)

<sup>c</sup> (Ondetti et al., 1971)

<sup>d</sup> (2S)-1-(3-Mercapto-2-methylpropionyl)-L-prolin

<sup>e</sup> (Deutch & Soffer, 1978)

<sup>f</sup> (Udupa & Rao, 1997)

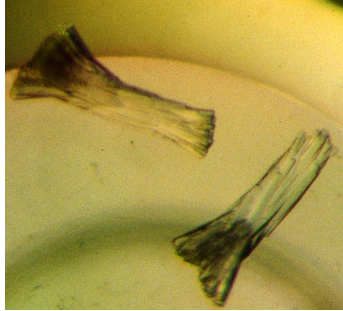
<sup>g</sup> ([S]-N $\alpha$ -[1-Carboxy-3-phenylpropyl]-Lys-Pro

Alle Inhibitoren bis auf N-1140 führen zur vollständigen Hemmung von Dcp. Die  $IC_{50}$ -Werte bei allen getesteten peptidischen Inhibitoren finden sich in denselben Größenordnungen wie für ACE, was die Ähnlichkeit der aktiven Zentren auch für unmodifizierte Peptide unterstreicht. Zum Vergleich mit den aktuellen Inhibitoren in der Bluthochdrucktherapie wurden Captopril und Lisinopril mit in Abbildung IV-3 aufgenommen.

### IV.1.3 Kristallisation

Für die Kristallisation von Dcp wurden die vereinigten Fraktionen des dritten Säulenschritts (Gelfiltration mittels Superdex S75) mit Centricons (Ausschlußgrenze 30 kDa) auf 20 mg/ml

konzentriert. Kristallisationsversuche wurden mittels der Dampfdiffusionsmethode unter Verwendung der *sitting drop* Methode bei 20°C durchgeführt. Ein anfängliches multifaktorielles Kristallisations-Screening (Hampton Research, Riverside, USA) führte zu einer vielversprechenden Kristallisationsbedingung. Weitere Verfeinerung führte zur folgenden Bedingung: In 4 µl Tropfen (2 µl Proteinlösung, mit 1 mM Captopril plus 2 µl Reservoirlösung), die gegen 300 µl Reservoirlösung (200 mM KCl, 100 mM MgAc<sub>2</sub>, 50 mM Cacodylatpuffer (pH 6,5), 10 % PEG 8000, 30 % Sucrose) äquilibriert waren, wuchsen nach ein paar Tagen



nadelförmige Kristalle. Die größten Kristalle erreichten dabei eine maximale Ausdehnung von 150 x 40 x 40 µm<sup>3</sup>, jedoch beugten sie die Röntgenstrahlen in Diffraktionsexperimenten nur bis zu einer Auflösung von 8 Å. Diese Auflösung ließ sich bislang weder durch eine weitere Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen noch durch eine kontrollierte Feuchtigkeitsregelung der Kristalle (Kiefersauer et al., 2000) erhöhen.

**Abbildung IV-5:** Fehlgeordnete Kristalle von Dep.

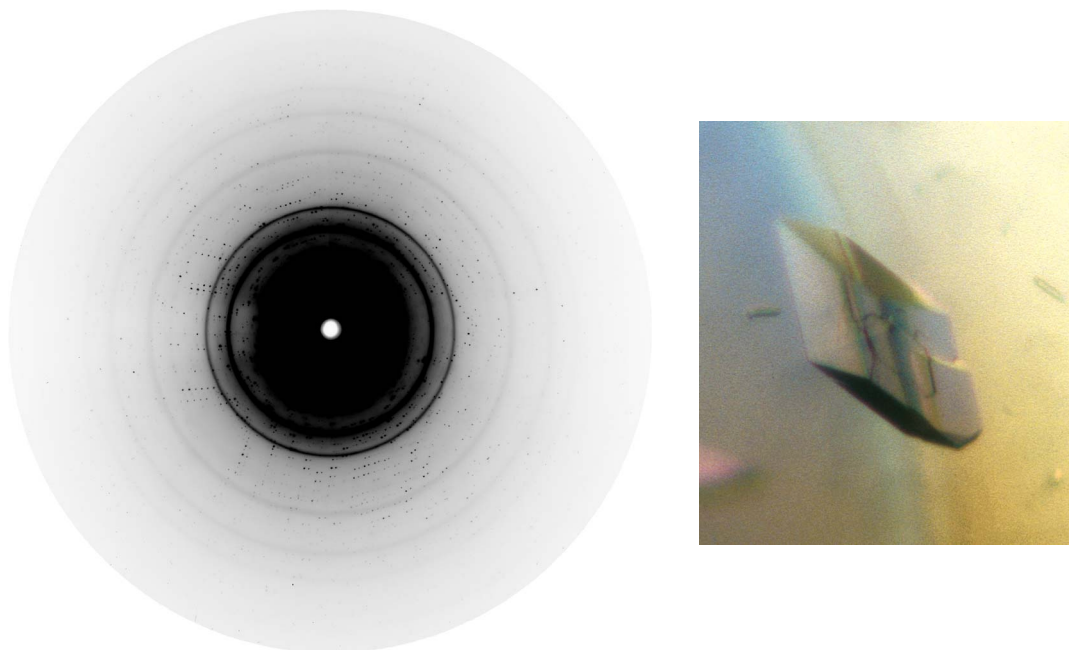
## IV.2 MMP-12 im Komplex mit Batimastat

### IV.2.1 Kristallisation

Für die Kristallisation von humanem MMP-12 wurde die Proteinlösung (MMP-12 in 5 mM Tris (pH 8,5), 50 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM Batimastat ([4-(*N*-Hydroxyamino)-2*R*-isobutyl-3*S*-(thiophen-2-ylthiomethyl)succinyl]-*L*-phenylalanin-*N*-methyamid)) über Membranen (Ausschlußgrenze 10 kDa) auf 4 mg/ml aufkonzentriert. Ein ausgedehntes *screening*-Verfahren bei 20°C führte zu einem anfänglichen Kristallisationspuffer, der zu folgender Kristallisationsbedingung verfeinert wurde:

100 mM Mes (pH 6,4), 100 mM LiCl.

Die Kristallisation wurde im Dampfdiffusionsverfahren nach der *sitting drop*-Methode durchgeführt (2 µl Protein + 2 µl Reservoir). Die Kristalle wuchsen innerhalb von einigen Tagen bis zu einer Größe von 600 x 200 x 200 µm<sup>3</sup> und streuten bis 1,09 Å (Synchrotronstrahlung, Wellenlänge:  $\lambda = 1,0503$  Å), vgl. Abbildung IV-6.



**Abbildung IV-6:** MMP-12/Batimastat-Kristalle und Beugungsbild einer 0,5°-Rotationsaufnahme von MMP-12 im Komplex mit Batimastat. Der Plattenrand entspricht einer Auflösung von 1,09 Å.

### IV.2.2 Datensammlung

Ein erster Datensatz von MMP-12-Kristallen wurde mit Graphit-monochromatisierter Cu-K<sub>α</sub>-Röntgenstrahlung ( $\lambda = 1,5418$  Å) auf einem Image Plate Detektor (wie in Kapitel III.3.2 beschrieben) gemessen. Die MMP-12-Kristalle wurden zur Messung in einen Tropfen aus Mutterlauge und 30 % Glycerin als Cryoprotektans überführt, 10 sec äquilibriert, an-



schließlich in einem *Cryoloop* geerntet, sofort auf der Meßapparatur montiert und in einem Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren. Eine zweite, hochaufgelöste Messung wurde an der Beamline BW6, DESY, Hamburg durchgeführt. Die Datensammlung erfolgte bei 100 K mit Synchrotron-Strahlung ( $\lambda = 1,0503 \text{ \AA}$ ) auf einem CCD-Detektor (Marresearch, Hamburg). Der Drehwinkel je Aufnahme betrug  $0,5^\circ$  über einen Meßbereich von  $100^\circ$ . Die Kristalle streuten bis zu einer maximalen Auflösung von  $1,09 \text{ \AA}$ .

Die Bestimmung der Raumgruppe, die Verfeinerung der Zellparameter und die Integration der Daten erfolgte mit dem HKL-Programmpaket Denzo und Scalepack (Otwinowski & Minor, 1997).

Die Datenprozessierungsstatistik ist in Tabelle IV-2 zusammengefasst.

**Tabelle IV-2:** Datenprozessierungsstatistik für MMP-12/Batimastat

DATENSAMMLUNG	
Raumgruppe	C2
Zellkonstanten [ $\text{\AA}$ , $^\circ$ ]	
a	51,91
b	60,26
c	54,61
$\alpha$	90
$\beta$	114,65
$\gamma$	90
Einheitszellvolumen [ $\text{\AA}^3$ ]	155258
$V_m$ [ $\text{\AA}^3/\text{Da}$ ] (entspricht % $\text{H}_2\text{O}$ )	2,1 (42 %)
Anzahl der Komplexe pro asymmetrischer Einheit	1
Begrenzende Auflösung	1,09
Gemessene Reflexe	359642
Unabhängige Reflexe	60360
$I/\sigma$	12,68
$I/\sigma$ letzte Schale (1,13 - 1,09 $\text{\AA}$ )	3,23
Vollständigkeit der Daten	95,0 %
letzte Schale (1,13 - 1,09 $\text{\AA}$ )	91,9 %
$R_{\text{merge}}$	6,3 %
letzte Schale (1,13 - 1,09 $\text{\AA}$ )	25,6 %

### IV.2.3 Patterson-Suche

Die Struktur der katalytischen Domäne von MMP-12 im Komplex mit dem Inhibitor Batimastat wurde mittels der Patterson-Suchmethode (*Molecular Replacement*) mit Hilfe des Programms AMoRe (Navaza, 1994) gelöst. Es wurden Daten mit einer Auflösung von 15 - 3,5  $\text{\AA}$  verwendet. Als Suchmodell diente die Kristallstruktur der katalytischen Domäne von humanem MMP-3 (Stromelysin-1, PDB Eintrag: 1uea, (Gomis-Rüth et al., 1997) mit den Resten Lys91 - Pro250). Die erste Lösung hatte einen Korrelationsfaktor von  $c = 0,484$  und einen R-Faktor von  $R = 0,529$  und hob sich klar von den weiteren gefundenen Lösungen ab (Zweite Lösung:  $c = 0,376$  und  $R = 0,569$ ).

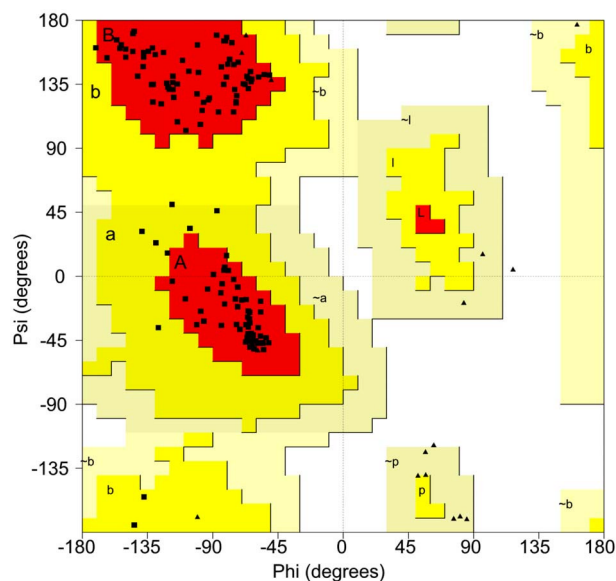
#### IV.2.4 Modellbau und Verfeinerung

Die MMP-12-Kristallstruktur wurde anfänglich mit dem Programm X-PLOR (Brünger, 1992b) unter der Verwendung der Engh & Huber Parameter (Engh & Huber, 1991) verfeinert. Die  $R_{free}$ -Überprüfung basierte auf einem Testset von 5 % der Daten, die von der Verfeinerung ausgeschlossen waren. Die berechnete  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte bis zu einer Auflösung von 1,09 Å war von ausgezeichneter Qualität und erlaubte einen manuellen Einbau der Aminosäuren Gly106 bis Gly263 der katalytischen Domäne. Die Verfeinerung startete zunächst mit konventioneller Powell Energie Minimierung gefolgt von Gruppen-B-Faktor und individueller B-Faktor-Verfeinerung mit Daten des Bereichs von 22 bis 1,09 Å. In späteren Phasen der Verfeinerung wurde der *maximum-likelihood* Algorithmus des Programms CNS (Brünger et al., 1998) verwendet. Jedem Verfeinerungsschritt folgte ein manuelles Überbauen des Modells mit dem Programm O (Jones et al., 1991), bei dem auch die automatisch positionierten Solvensmoleküle überprüft, bei Bedarf entfernt, oder Neue eingefügt wurden. Die finalen Verfeinerungsschritte wurden mit den Programmen SHELXL-97 (Sheldrick, 1997) und REFMAC (CCP4, 1994) durchgeführt und schlossen anisotrope B-Faktorverfeinerung ein. Um alternative Seitenkettenkonformationen komfortabel in das Atommodell einzuführen, wurde das Modell mit XTAL-VIEW (McRee, 1993) überbaut. Die Elektronendichte der N-terminalen sieben Aminosäuren wurde auch in späteren Verfeinerungs- und Bauzyklen nicht interpretierbar, so dass sich das finale Atommodell auf 175 Aminosäuren erstreckt. Es umfasst die Reste Gly106 - Gly263 (MMP-12), den Inhibitor Batimastat, 211 Wassermoleküle, zwei Zink- und drei Calciumionen. Für die Seitenketten einiger Reste wurden alternative Konformationen in das Modell eingebaut (Val108, Arg110, Ser142, Pro146, Lys148, Met156, His183, Ile191, Asn211, Ser229, Lys233, Val235, Lys241, Ile258 sowie für den Thiophen- und Phenylring des Inhibitors Batimastat).

#### IV.2.5 Qualität des Modells

Im final verfeinerten Molekülmodell von MMP-12 sind abgesehen von den N-terminalen sieben Aminosäuren und der Seitenkette von Asn246 alle restlichen Aminosäuren, der Inhibitor, die Metallionen und Solvensmoleküle sehr gut in ihrer  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte definiert.

Eine Überprüfung der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette im MMP-12-Atommodell zeigte, dass sich 92,5 % aller Aminosäuren (Glycin und Prolin ausgenommen) in dem am meisten bevorzugten Bereich und 7,5 % im zusätzlich erlaubten Bereich befinden. Keine Aminosäure zeigt eine Bindungsgeometrie, die in den weitläufig erlaubten oder verbotenen Bereich der Ramachandran-Statistik (Ramachandran & Sasisekharan, 1968) fallen würde. In Abbildung IV-7 ist die Ramachandran-Statistik aller Aminosäuren des finalen MMP-12-Atommodells graphisch dargestellt. Die Qualität des verfeinerten Modells wurde mit den Programmen PROCHECK (Laskowski et al., 1993) und WHATCHECK (Hooft et al., 1996) überprüft, die Verfeinerungsstatistik des endgültigen Modells mit einem R-Faktor von 16,7 ( $R_{free}$  19,3) ist in Tabelle IV-3 zusammengefasst.



**Abbildung IV-7:** Ramachandran-Plot der dihedralen Hauptkettenwinkel Phi und Psi des finalen MMP-12 Modells. Die Bereiche, die für L-Aminosäuren erlaubt sind, sind gelb dargestellt, wobei die sterisch günstigsten Regionen rot gezeichnet sind. Die weißen Flächen markieren die sterisch verbotenen Bereiche.

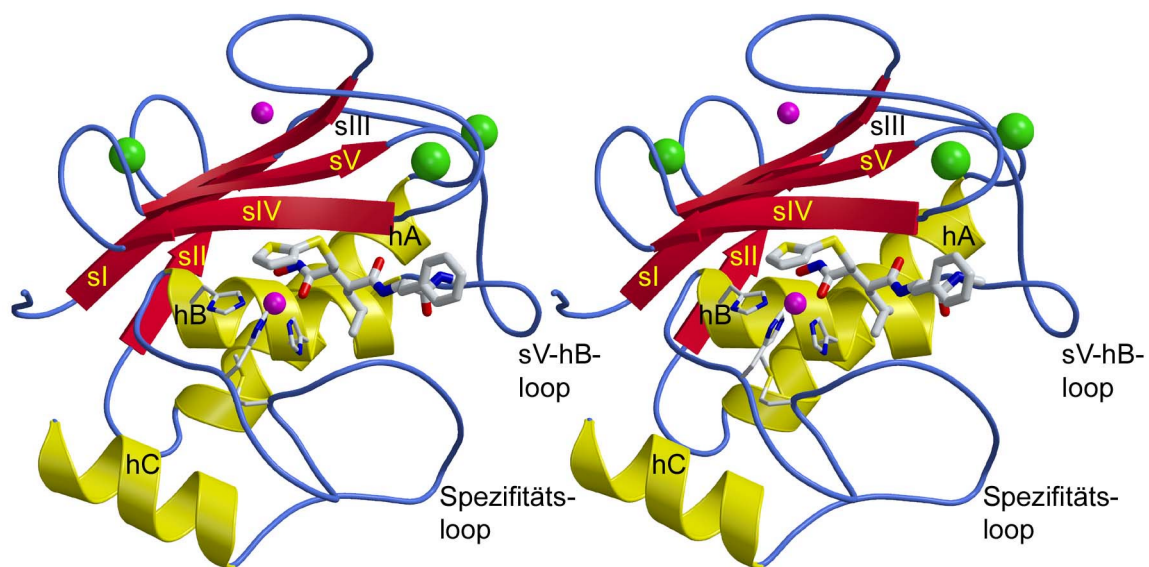
**Tabelle IV-3:** Verfeinerungsstatistik für MMP-12/Batimastat

VERFEINERUNG	
Auflösungsbereich	22,36 - 1,09 Å
verwendete Reflexe	60360
Reflexe im Arbeitsset	57313
Reflexe im Testset	3047
R-Faktor [%]	16,7
R <sub>free</sub> [%]	19,3
r.m.s.-Abweichungen von Idealwerten der	
Bindungslängen [Å]	0,013
Bindungswinkel [°]	1,875
r.m.s. B [Å <sup>2</sup> ]	1,35
Mittlerer B-Faktor	
Hauptkettenatome [Å <sup>2</sup> ]	12,28
Seitenkettenatome [Å <sup>2</sup> ]	14,09
Wassermoleküle [Å <sup>2</sup> ]	26,39
Anzahl der Atome in der asymmetrischen Einheit	
Proteinatome (ohne Wasserstoff)	1214
Inhibitoratome (ohne Wasserstoff)	32
Solvensmoleküle	211
Metallatome	5
(Φ, Ψ) - Winkel Verteilung im	
bevorzugten Bereich	123 (92,5 %)
zusätzlich erlaubten Bereich	10 (7,5 %)

## IV.2.6 Strukturbeschreibung

### IV.2.6.1 Katalytische Domäne

Die Struktur der katalytischen Domäne von MMP-12 (wie auch anderer MMPs) hat die Form eines abgeflachten Ellipsoids, das durch eine tiefe, sich über die ganze Front des Enzyms hinziehende Spalte, die sogenannte *active-site cleft*, in zwei Subdomänen unterteilt wird. In der "Standard-Orientierung" (Abbildung IV-8) erstreckt sich diese *active-site cleft* horizontal und zeigt auf den Betrachter. Ein Peptidsubstrat würde von links (N-Terminus) nach rechts (C-Terminus) binden.

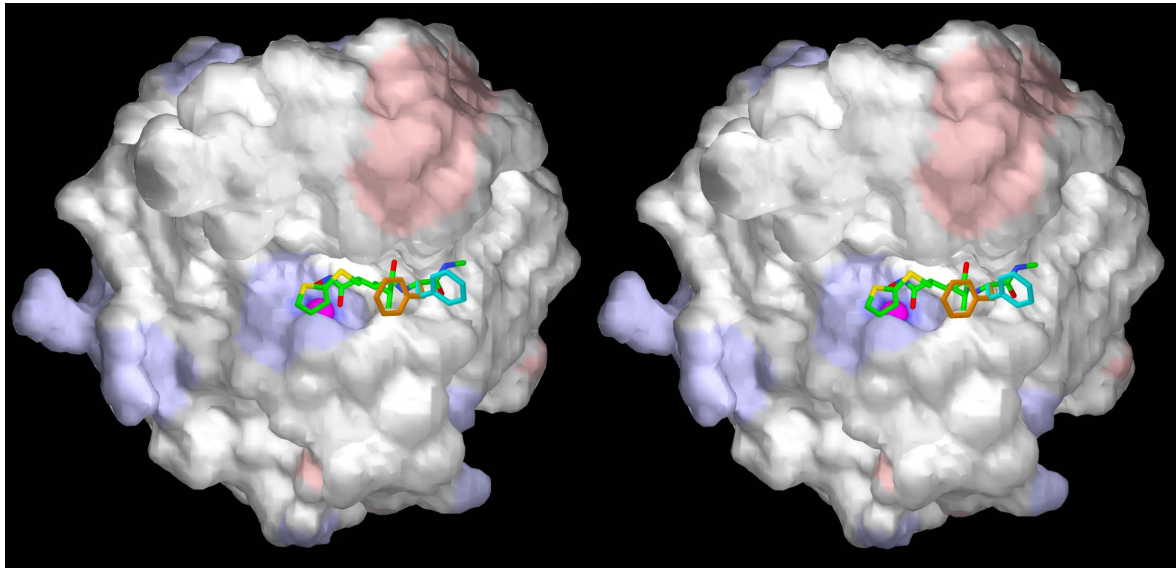


**Abbildung IV-8:** Die katalytische Domäne von MMP-12 in *Ribbon* Darstellung, inhibiert durch Batimastat (*stick*-Darstellung). Die Liganden des katalytischen Zinks (His218 His222 und His228) sind als dünneres Stäbchenmodell dargestellt. Außerdem ist das konservierte Met236 zu sehen. Die Zink- und Calciumionen sind als Kugeln dargestellt (pink, bzw. grün). Die Proteinase ist in Standard-Orientierung gezeigt.

Die größere obere Subdomäne besteht aus einem fünfsträngigen stark gebogenen  $\beta$ -Faltblatt, das auf der oberen Seite von 3 Oberflächenloops flankiert wird und auf der unteren Seite mit zwei  $\alpha$ -Helices einen stark hydrophoben Kernbereich umfasst. Vier der fünf  $\beta$ -Stränge laufen parallel, nur  $\beta$ -Strang sIV, der einen Teil der *active-site cleft* Begrenzung darstellt, verläuft antiparallel. Der sogenannte *S-loop* zwischen Strang sIII und sIV interagiert mit dem  $\beta$ -Faltblatt durch das strukturelle Zinkion und einem der drei Calciumionen.

Der Bereich des *S-loops* vor  $\beta$ -Strang IV stellt den zweiten Teil der *active-site cleft* Begrenzung dar (*bulge-edge*-Segment). Dieser Teil der *active-site cleft* ist von außerordentlicher Bedeutung für die Bindung von peptidischen Substraten und Inhibitoren an das aktive Zentrum. Die *loops*, welche die  $\beta$ -Stränge sIV und sV (*sIVsV-loop*) sowie sII und sIII (*sII-sIII-loop*) verbinden, komplexieren "Sandwich"-artig das zweite Calciumion. Das dritte

Calciumion ist zwischen dem sIhA-loop (verbindet  $\beta$ -Strand sI und  $\alpha$ -Helix hA) und  $\beta$ -Strang sV fest gebunden.



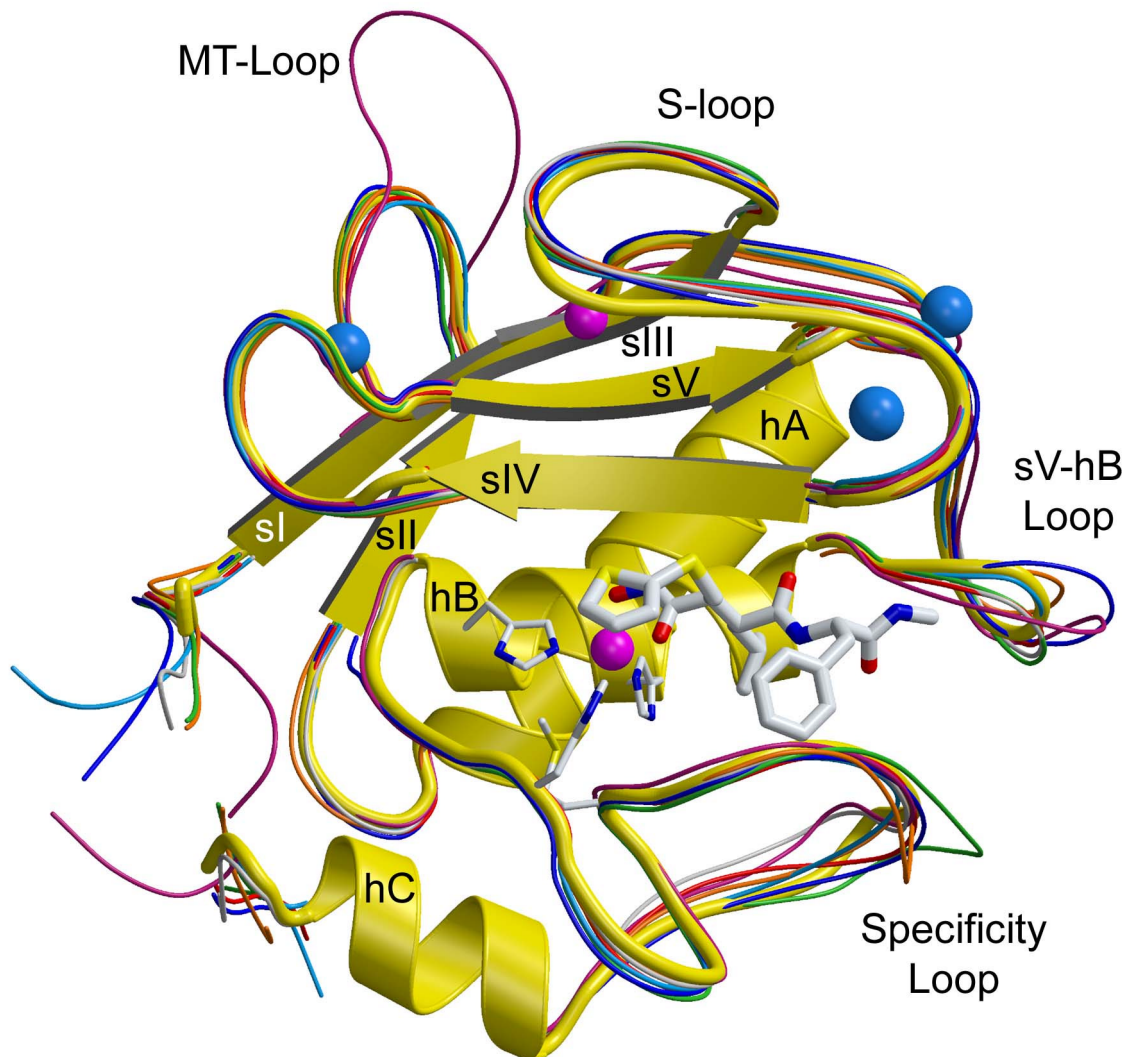
**Abbildung IV-9:** Oberflächendarstellung von MMP-12. Die Oberfläche ist eingefärbt nach dem elektrostatischen Potential (konturiert von  $-18$  kT/e (rot) bis  $+18$  kT/e (blau). Beim Inhibitor Batimastat sind zwei alternative Konformationen der Phenylalaninseitenkette gezeigt (türkis und orange).

Nach Strang sV läuft die Kette über einen großen Oberflächenbogen in die lange horizontale *active-site* Helix hB. In dieser Helix befinden sich die ersten beiden der drei Histidine (His218 und His222 - unter Verwendung der Nummerierung von ProMMP-12), die das katalytisch aktive Zinkion binden. An Position 219 befindet sich normalerweise die katalytisch aktive Glutaminsäure. In der vorliegenden Struktur ist dieses Glutamat jedoch durch ein Alanin ersetzt. Die inaktive MMP-12 Mutante wurde präpariert, um Stabilitätsprobleme zu überwinden. Die aktive Form degradiert sich selbst autokatalytisch.

Die Helix hB endet abrupt bei Gly225. Dort folgt die Peptidkette einem Bogen nach unten, präsentiert den dritten Zinkliganden His228 und läuft über einen Bogen, der einer weiten Spirale ähnelt bis zum "Met-turn" bei Met236. Die Kette nähert sich dann wieder dem aktiven Zentrum und begrenzt mit der für MMPs typischen Sequenz Pro-X-Tyr die rechte Seite der *active-site cleft*. Bei MMP-12 ist diese untere Begrenzung ein Pro238-Thr-Tyr und wird S1'-*wall forming segment* genannt (Bode et al., 1994). An dieses Segment schließt sich ein langer *loop* mit einer flexiblen Konformation an. Dieser *loop* umfasst die S1'-Spezifitätstasche und trägt deshalb den Namen *specificityloop*. Bei Asn246 hat dieser *loop* wahrscheinlich seine höchste Flexibilität, da dort die Elektronendichte nur schwach ausgeprägt ist. Der C-Terminus befindet sich am Ende der zehn Aminosäuren umfassenden an den *specificityloop* anschließenden  $\alpha$ -Helix hC.

In diesem MMP-12 Konstrukt ist die Polypeptidkette erst ab der Aminosäure Gly106 in der Elektronendichte sichtbar. Der Grund für die offensichtlich fehlgeordneten N-terminalen

sieben Reste liegt wahrscheinlich in Met99, das zusätzlich N-terminal des normalen Phe100-Arg-Glu N-Terminus von MMP-12 als Klonierungsartefakt vorhanden war. Dieses Met99 verhindert die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen der N-terminalen Phe100 Ammoniumgruppe und dem absolut konservierten Asp253, wie bei anderen MMPs beobachtet werden konnte (siehe Kapitel IV.4.6.1 und Reinemer et al., 1994).



**Abbildung IV-10:** Überlagerung der katalytischen Domänen von MMP-1 (rot, pdb-Eintrag: 966c), MMP-2 (Mutante ohne Fibronectin-ähnlichen Domänen, dunkelblau, 1qib), MMP-3 (grün, 1caq), MMP-7 (dunkelorange, 1mmq), MMP-8 (silber, 1mmb) MMP-13 (hellblau, 830c), MMP-14 (MT1-MMP, lila, 1bqq) mit MMP-12 (gold). Der Inhibitor Batimastat und die Seitenketten der drei Histidine, die das katalytische Zink komplexieren und das charakteristische Methionin sind als Stäbchenmodell gezeigt. Die Zink- und Calciumionen sind als Kugeln dargestellt (pink, bzw. blau).

Es finden sich keine größeren Abweichungen von den schon bekannten MMP-Strukturen. Eine Überlagerung von MMP-12 mit allen bekannten MMP-Strukturen auf Basis ihrer C $^{\alpha}$ -

Atomen ergibt r.m.s Abweichungen von 0,68 Å für die katalytische Domäne von MMP-2 (Morgunova et al., 1999) bis 0,82 Å für MMP-7 (Browner et al., 1995). Die Sequenzhomologie beträgt knapp 60 % innerhalb der Familie. Die größten Unterschiede werden im sV-hB- und *specificityloop* beobachtet.

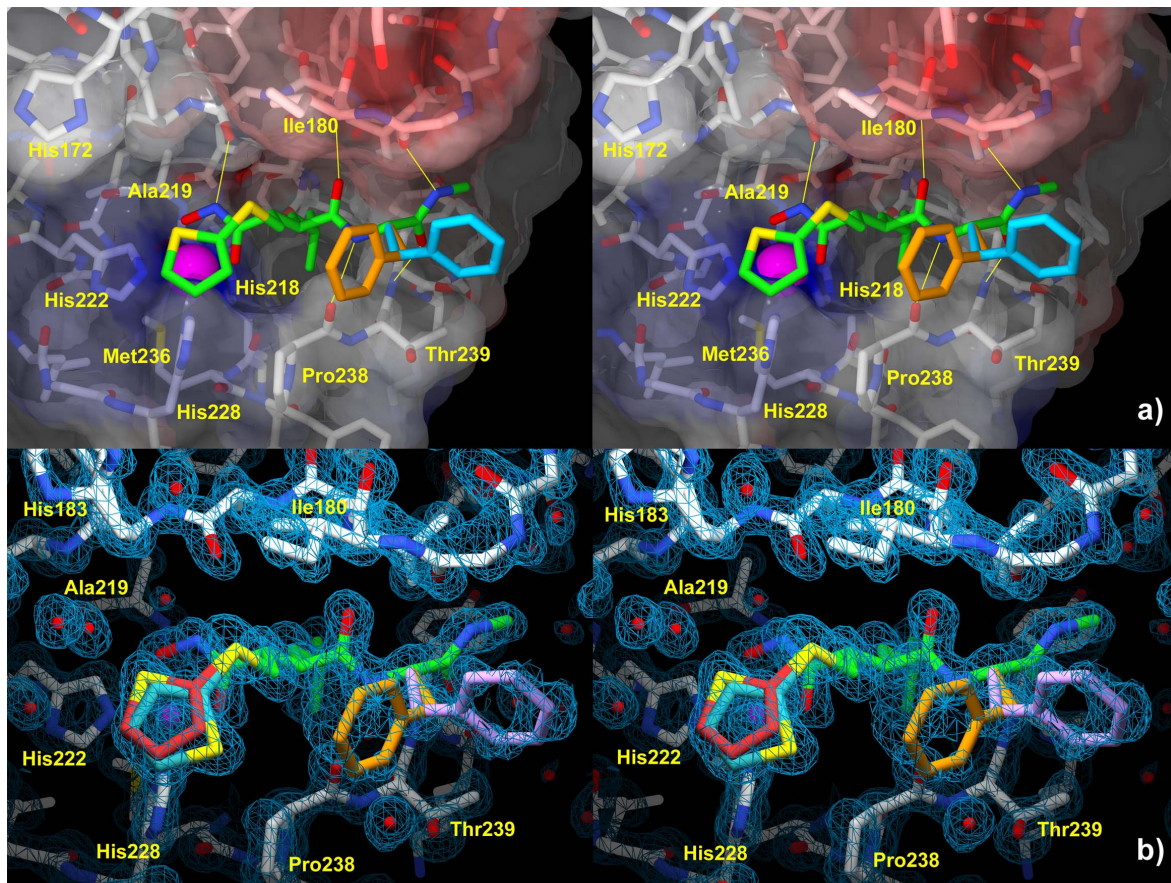
#### IV.2.6.2 Aktives Zentrum und die Bindung von Batimastat/Substrat

Im Überblick ähneln die Bindungsstellen zur Linken des katalytischen Zinks einer wenig strukturierten Ebene, während zur Rechten deutliche Einkerbungen zu erkennen sind.

Der obere Rand der *active-site cleft* von MMP-12 ist vom *S-loop* begrenzt, der wie ein Dach über der MMP-12-Oberfläche liegt und aus dem die Seitenkette von His172 hervorsticht. Dieses His172 ist der Grund für eine deutlichere Ausbildung von *subsite* S3 und einer stärkeren Abgrenzung zur S1-Tasche im Vergleich zu anderen MMPs. Die Bindungsstelle für den S2-Rest zeigt keine charakteristische Einbuchtung. Die S1'-Spezifitätstasche führt als Tunnel durch das ganze Molekül, gebildet durch die konservierte Pro238-X-Tyr-Sequenz (X = Thr bei MMP-12) und weiteren Bereichen des *specificityloops*. Das katalytische Zink ist durch die drei Imidazol-N<sup>e2</sup>-Atome von His218, His222, His228 und von den Hydroxyl- und Carbonyl-Sauerstoffen der Hydroxamatgruppe des Inhibitors Batimastat gebunden.

Die Pseudo-Peptid Hauptkette von Batimastat verläuft antiparallel zum *bulge-edge*-Segment (Gly179 - Ala182) des *S-loops* der oberen und parallel mit dem Pro238-Tyr240 Teilstück der unteren Begrenzung der *active-site cleft* und bildet insgesamt fünf Wasserstoffbrücken ( $\cong 2,9$  Å) mit deren Hauptketten. Die Ebene des Thiophenrings von Batimastat ist eindeutig in der Elektronendichte definiert. Die beiden möglichen Ringkonformationen sind gleich besetzt, d. h. dass das Schwefelatom sowohl nach oben (*S-loop*) als auch nach unten (in Richtung Spezifitäts-*loop*) zeigen kann. In beiden Orientierungen befindet sich der Thiophenring direkt über dem katalytischen Zinkion. Diese Anordnung erinnert an Halb-Sandwichverbindungen (Ferrocen), aber die Entfernung des Zinkions vom Zentrum des Thiophenrings ist mit 4,6 Å zu groß für eine starke Wechselwirkung.

Die Isobutylgruppe von Batimastat, die einer Leucinseitenkette entspricht, erstreckt sich in den relativ hydrophoben Flaschenhals der S1'-Spezifitätstasche und bildet hydrophobe Kontakte zu folgenden Resten: dem aromatischen System des Imidazolrings von His218, der flachen Seite der Pro238-Thr239 Amidbindung und den Seitenketten von Thr215 und Tyr240.



**Abbildung IV-11:** Stereodarstellung der *active-site cleft* von MMP-12 mit semitransparenter Oberfläche (a) und mit Elektronendichte (b). Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist in (a) nur eine alternative Konformation des Thiophenrings dargestellt, während in (b) alle alternativen Konformationen gezeigt werden. In (a) sind die Wasserstoffbrückenbindungen, die Batimastat zur MMP-12 Hauptkette ausbildet als gelbe Linien gezeichnet. Die Kohlenstoffatome des Proteins und des Inhibitors sind als weiße, bzw. grüne *sticks* dargestellt. Die zwei alternativen Seitenkettenkonformationen des Phenylalanins von Batimastat ist orange/blau in (a) und orange/violett in (b) eingefärbt. (b): Die zwei Konformationen des Thiophenrings sind in rot und blau dargestellt. Die  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte ist bei  $1 \sigma$  konturiert.

In der asymmetrischen Einheit des MMP-12 Kristalls befindet sich ein Komplex aus der katalytischen Domäne von MMP-12 mit dem Inhibitor. Im Kristall sind zwei benachbarte Moleküle so positioniert, dass die *active-site clefts* einander zugewandt sind und die dort gebundenen Inhibitoren eine nicht identische Konformation der Phenylringe nötig machen. In der Elektronendichte konnten diese Konformationen eindeutig identifiziert werden und ließen auf eine 50 %ige Besetzung jeder Orientierung schließen. Jedoch brechen beide Konformationen die Symmetrie. Der Batimastat-Phenylring berührt in beiden Orientierungen seinen Symmetrieäquivalenten. Trotz dieses Symmetriebruchs wurde eine statistische 50 %-Verteilung der Phenylringkonformationen angenommen und ein einziger Komplex in die Elektronendichte gebaut und verfeinert.

In der "normalen" Konformation zeigt der Phenylring in Richtung des Thiomethylspacers und des Thiophenrings des Moleküls. In der alternativen Konformation ist der Phenylring um ca.  $120^\circ$  gedreht und zeigt in Richtung der Gabelung der Thr239-Seitenkette.

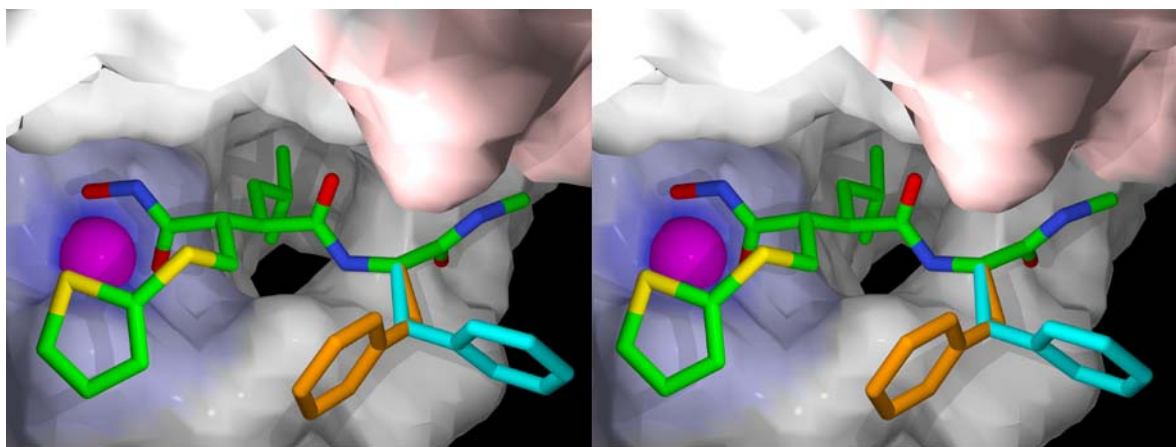


### IV.2.7 Spezifitätsdeterminanten

Die Substratspezifität von MMP-12 ist deutlich vom *S-loop* bestimmt. Dieser liegt im Vergleich zu anderen MMPs wesentlich näher am darunterliegenden  $\beta$ -Faltblatt und ist damit der Grund für eine stärkere Ausbildung der S1- und S3-Spezifitätstaschen. Die veränderte *S-loop* Konformation ist wahrscheinlich bedingt durch Ala173, das ein ansonsten hochkonserviertes Prolin ersetzt und damit den *S-loop* weniger rigide werden lässt. Aus dem *S-loop* ragt His172 hervor und liegt wie ein Dach über der S3-Tasche. Im Gegensatz zu dieser hydrophoben Tasche ist diejenige von z. B. MMP-3 negativ geladen und die von MMP-1 sehr flach und in dem Sinne, dass man von einer definierten Tasche sprechen könnte, nicht vorhanden.

Die *S2-subsite* ist ähnlich geformt wie die von MMP-7, aber im Gegensatz zu der von MMP-3, oder MMP-14 nicht begrenzt. Bei diesen MMPs bildet die Seitenkette der Aminosäure (Phe bei MMP-1 und Glu bei MMP-14), auf die der dritte Zinkligand (His228) folgt, eine Begrenzung, welche die Bindung eines Rests mit einer langen Seitenkette verhindern würde. In MMP-12 befindet sich an der entsprechenden Position ein Glycin.

Die S1'-Spezifitätstasche hat die Gestalt eines Tunnels, der sich durch das ganze Enzym hindurchzieht und auf der unteren Seite austritt. Dieser Tunnel hat im unteren Drittel eine kleine laterale Öffnung und ist deutlich länger, als für die Beherbergung einer Leucinseitenkette nötig wäre.



**Abbildung IV-12:** Die S1'-Tasche ist ein Tunnel, der sich durch das ganze Enzym hindurchzieht. Es ist deutlich zu sehen, wie die Isobutyl-Seitenkette von Batimastat sich in den oberen Teil des Tunnels erstreckt. Die alternativen Konformationen, die der Phenylring von Batimastat einnehmen kann, sind in orange und türkis dargestellt, das Zink ist als Kugel in pink zu sehen.

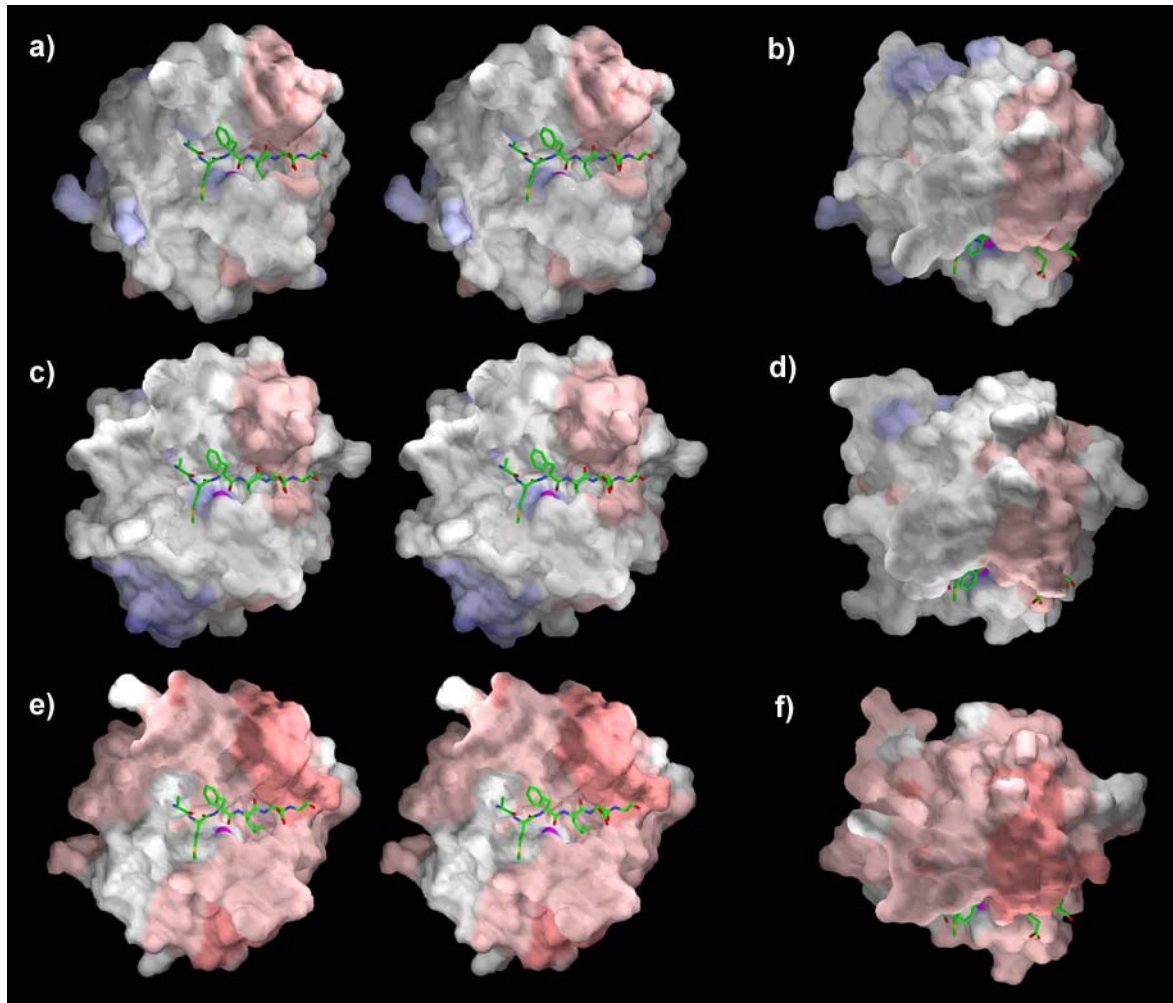
Der obere Teil des nicht durch den Inhibitor besetzten Raums ist mit drei Wassermolekülen aufgefüllt, die untereinander und mit den Sauerstoffen der umgebenden Hauptkettencarbonyl Wasserstoffbrücken ausbilden. Zwei weitere und einige weniger genau lokalisierte Wassermoleküle füllen den unteren Teil der S1'-Tasche.

Bemerkenswert ist, dass das im Kapitel IV.2.6.2 angesprochene Thr215 (Teil der  $\alpha$ -Helix hB) für MMP-12 spezifisch ist. Bei anderen MMPs ist an dieser Position ein hochkonserviertes Valin. Dieses Thr215 könnte der Grund sein, dass MMP-12 als einzige MMP in der Lage ist, Substrate mit einem Arginin an P1'-Position zu spalten. Modelling Experimente konnten belegen, dass die Guanidiniumgruppe eines Substrats mit einem Arginin in P1'-Position mit dem O<sup>γ1</sup>-Sauerstoffatom von Thr215 günstige Wasserstoffbrücken ausbilden könnte.

Bemerkenswert erscheint außerdem die insgesamt sehr hydrophobe Oberfläche von MMP-12, die es MMP-7 (Matrilysin) ähnlich macht, aber von anderen MMPs (z. B. MMP-1 / Kollagenase-1) unterscheidet (Abbildung IV-13). Diese deutliche Oberflächeneigenschaft, die sicherlich auch die Spezifität beeinflusst, gilt auch für den oberen Teil des Enzyms, an dem sich Bindungsstellen für die Erkennung spezifischer Substrate wie Elastin befinden könnten.

#### **IV.2.8 Modellierung des Substrates $\alpha$ 1-PI**

Eines der spezifischen Substrate von MMP-12 ist  $\alpha$ 1-PI. Die Spaltstelle ist gut untersucht und liegt zwischen Phe352 und Leu353. In Abbildung IV-13 ist das Hexapeptid (Ala1-Met2-Phe3--Leu4-Glu5-Ala6) um die Spaltstelle des *reactive-site loops* des Serinproteinaseinhibitors  $\alpha$ 1-PI derart modelliert, wie es in die *active-site cleft* von MMP-12 binden würde, um prozessiert zu werden. Das Hexapeptid orientiert sich dabei an der Ausrichtung von Inhibitorstrukturen im aktiven Zentrum von MMP-8 (Grams et al., 1995b). Ähnlich wie Batimastat bildet die Peptid-Hauptkette fünf Wasserstoffbrücken nach oben zum S-loop und  $\beta$ -Strang sIV und zwei zum Pro-X-Tyr-Segment aus. Die Ala1-Seitenkette füllt die eng begrenzte, sehr gut definierte S3-Tasche, die von den Phe185- und His183-Seitenketten limitiert wird, genau aus. Der Imidazolring von His172 liegt wie ein Deckel auf der S3-Tasche. Im Gegensatz zu Ala1 kann sich die Seitenkette von Met2 dieser Sequenz entlang der hydrophoben, flachen S2-Tasche erstrecken, die von den zinkkoordinierenden Imidazolringen von His222 und His228 gebildet wird.



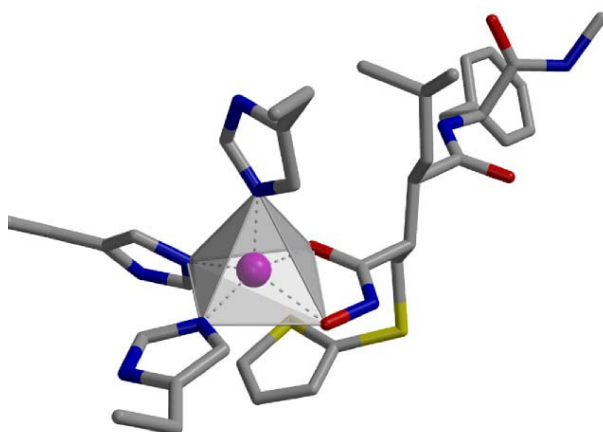
**Abbildung IV-13:** Oberflächendarstellung der katalytischen Domänen von MMP-12 (a und b), MMP-7 (c und d) und MMP-1 (e und f). Die Moleküle sind in (a, c und e) Standard-Orientierung gezeigt, während die Proteine in b, d und f um 90° nach oben gedreht wurden. In die *active-site clefts* wurde ein von  $\alpha$ 1-PI abgeleitetes Hexapeptid mit der Sequenz Ala-Met-Phe--Leu-Glu-Ala modelliert. Die Oberflächen sind nach ihrem elektrostatischen Potential eingefärbt (negativ: rot bis positiv: blau).

Die Phe3-Seitenkette liegt sehr günstig in der hydrophoben S1-Tasche, die bei keiner anderen MMP so stark ausgeprägt ist wie hier. Die Begrenzungen dieser S1-Tasche werden durch die Kante des His172-Imidazolrings und der Isobutyl-Seitenkette von Ile180 gebildet. Die hydrophobe und am oberen Ende leicht basische S1'-Spezifitätstasche nimmt die Leu4-Seitenkette in identischer Weise auf wie die equivalente Isobutyl-'Seitenkette' von Batimastat. Die Glu5-Seitenkette zeigt wahrscheinlich von der Enzymoberfläche weg, während Ala6 eine schwache Wechselwirkung mit der sehr flachen und nicht besonders ausgeprägten S3'-Tasche eingeht.

## IV.2.9 Metallkoordinierung

Aufgrund der sehr hohen Auflösung der Daten und der damit verbundenen Genauigkeit des Modells wird den fünf Metallen in der Struktur ein eigenes Kapitel gewidmet.

Das katalytische Zink ist pentakoordiniert und zwar nicht wie sonst üblich in Form einer trigonalen Bipyramide, sondern in Form einer beinahe perfekten quadratischen Pyramide. Die beiden Sauerstoffe der Hydroxamatgruppe von Batimastat spannen mit den zwei N<sup>ε2</sup>-Stickstoffen von His218 und His222 die quadratische Grundfläche auf, über dem das N<sup>ε2</sup> von His228 thront.



**Abbildung IV-14:** Das katalytisch aktive Zinkion ist in einer nahezu perfekten quadratisch-planaren Pyramide koordiniert. Die beiden Sauerstoffe der Hydroxamatfunktion des Inhibitors Batimastat und die Stickstoffe der Histidine His218 und His222 bilden die quadratische Basis, über der das Stickstoffatom von His228 die Spitze bildet.

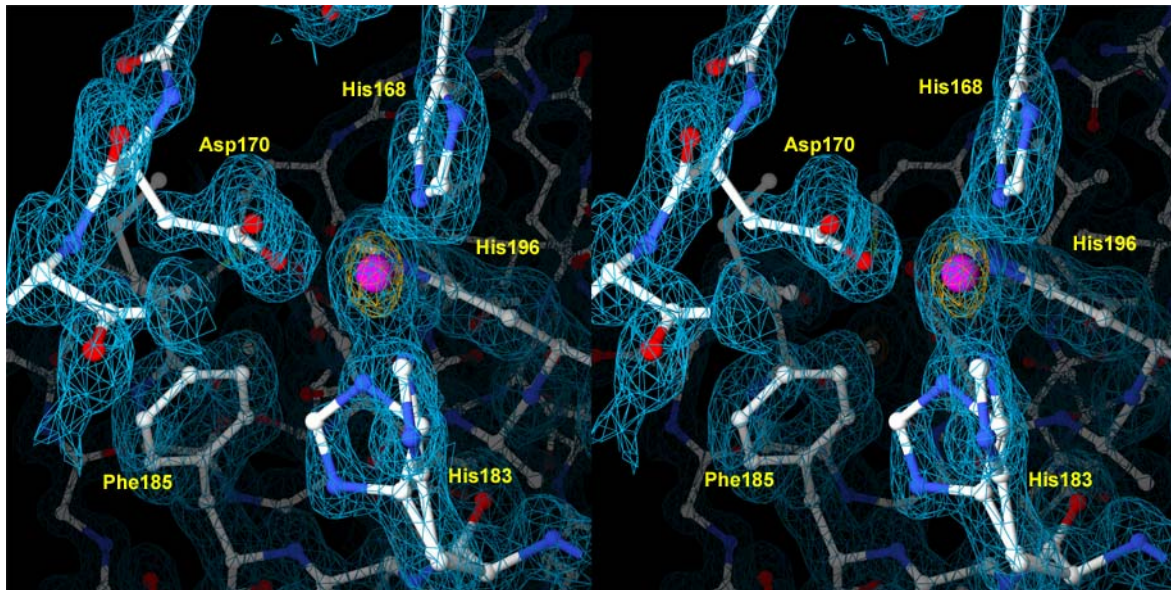
Die Zink-Ligand Abstände besitzen alle einen bemerkenswert ähnlichen Wert ( $2,10 \pm 0,01 \text{ \AA}$ , Tabelle IV-4).

**Tabelle IV-4:** Ion-Ligand-Abstände der fünf Kationen in MMP-12

METALL	LIGAND	DISTANZ [Å]
kat. Zn400	His218 N <sup>ε2</sup>	2,09
	His222 N <sup>ε2</sup>	2,11
	His228 N <sup>ε2</sup>	2,09
	Bat900 O1 <sup>a</sup>	2,11
	Bat900 O2	2,09
strukt. Zn401	His168 N <sup>ε2</sup>	1,98
	Asp170 O <sup>δ1</sup>	1,95
	His183 N <sup>ε2</sup> A	1,92
	(His183 N <sup>ε2</sup> B	2,36) <sup>b</sup>
Ca402	His196 N <sup>δ1</sup>	2,12
	Asp175 O <sup>δ2</sup>	2,35
	Gly176 O	2,33
	Gly178 O	2,34
	Ile180 O	2,33
	Asp198 O <sup>δ1</sup>	2,41
Ca403	Glu201 O <sup>ε2</sup>	2,23
	Asp158 O	2,39
	Gly190 O	2,35
	Gly192 O	2,27
	Asp194 O <sup>δ2</sup>	2,44
	H <sub>2</sub> O1037	2,41
Ca404	H <sub>2</sub> O1109	2,28
	Asp124 O <sup>δ1</sup>	2,40
	Asp124 O <sup>δ2</sup>	2,55
	Glu199 O	2,39
	Glu199 O <sup>ε2</sup>	2,38
	Glu201 O	2,40
	H <sub>2</sub> O1015	2,40
	H <sub>2</sub> O1017	2,35

<sup>a</sup> Bat, Batimastat  
<sup>b</sup> zweite Konformation

Das zweite, strukturelle Zink ist tetraedrisch von einem N<sup>δ1</sup>- und zwei N<sup>ε2</sup>-Imidazol-Stickstoffen von His196, His168 und His183 sowie vom O<sup>δ1</sup>-Atom der Asp170 Säuregruppe koordiniert.



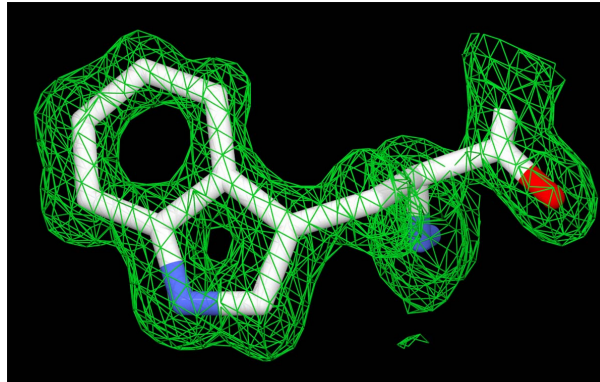
**Abbildung IV-15:**  $2F_0-F_c$ -Elektronendichte um die Koordinationssphäre des strukturellen Zinkions (konturiert bei  $1 \sigma$ , blau, bzw. bei  $9 \sigma$ , orange). Die  $9 \sigma$ -Dichte um das Zinkion ist nicht kugelförmig, sondern ein Ellipsoid und demonstriert die Anisotropie des Zinkions, verursacht durch His183, das in zwei alternativen Konformationen vorliegt, die senkrecht aufeinander stehen. Auch Asp170 liegt in zwei leicht unterschiedlichen Konformationen vor (die zweite wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt).

His183 zeigt in Fourier- und Differenzfourierelektronendichten eindeutig zwei verschiedene Konformationen, die in ca. 50 %iger Besetzung vorliegen. In der zweiten Orientierung des Rings, die senkrecht auf der ersten steht, ist das  $N^{\epsilon 2}$ -Atom weiter vom Dichtezentrum des Zinks entfernt als in der ersten. Die stark ausgeprägte Anisotropie der Elektronendichte des strukturellen Zinks läßt auf zwei alternative Positionen des Zinkions schließen, je eine für jede Konformation von His183. Entsprechend den zwei verschiedenen Zinkpositionen kann auch bei der Seitenkette von Asp170 eine leichte Konformationsänderung beobachtet werden. Aufgrund der geringen Distanz, die zwischen den beiden alternativen Zinkionen liegen würde, wurde darauf verzichtet, für das strukturelle Zinkion eine zweite Position mit 50 % Besetzungswahrscheinlichkeit einzuführen. Ebenso wäre der Unterschied bei Asp170 nicht signifikant. Deshalb wurde auch hier auf die Einführung einer zweiten Konformation verzichtet.

Das erste Calcium (Ca402), das sich zwischen dem zweiten Teil des *S-loops* und dem  $\beta$ -Faltblatt befindet, ist von den Carbonylsauerstoffen von Gly176, Gly178 und Ile180 sowie von den Carboxylsauerstoffen von Asp175, Asp198 und Glu201 in einem fast idealen Oktaeder gebunden. Die Distanzen der drei Ca-Carbonylsauerstoffbindungen sind mit 2,33 bis 2,34 Å wieder in einem extrem engen Bereich. Hingegen variieren die Bindungslängen der Carboxylatsauerstoffe zum Calcium mit 2,23 bis 2,41 Å deutlich stärker.

Das zweite gebundene Calciumion ist wie das erste oktaedrisch durch sechs Sauerstoffatome, nämlich von drei Carbonylgruppen (Asp158, Gly190, und Gly192), der Asp194 Säuregruppe und zwei Wassermolekülen komplexiert.

Im Gegensatz zu den ersten beiden ist das dritte Calciumion von sieben Liganden umgeben. Trotzdem kann man die Koordination verzerrt oktaedrisch beschreiben, wenn man die beiden Sauerstoffatome der Asp124 Säuregruppe als einen einzigen Liganden betrachten würde.



**Abbildung IV-16:** Zur Demonstration der hohen Qualität der Daten ist die  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte um Tryptophan109 dargestellt. Konturierung  $1\sigma$ .

#### IV.2.10 PDB-Datenbank

Die Koordinaten des Komplexes von MMP-12 mit Batimastat sind in der Protein-Datenbank in Brookhaven (<http://www.rcsb.org/pdb/>) hinterlegt. PDB-Eintrag: 1jk3.

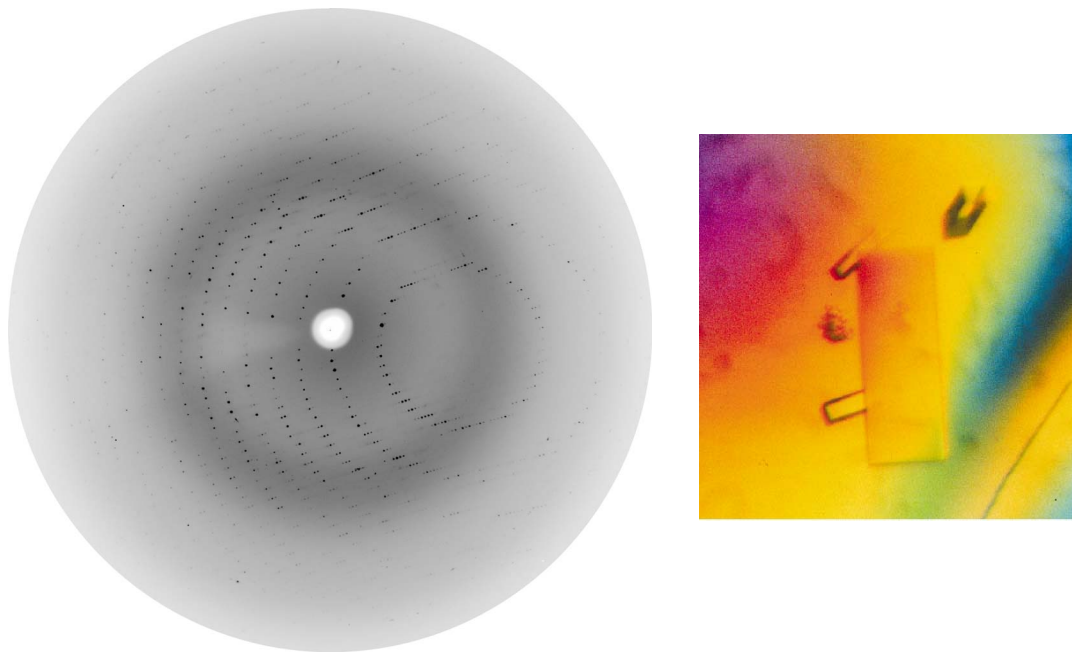
## IV.3 MMP-16 im Komplex mit Batimastat

### IV.3.1 Kristallisation

Für die Kristallisation von humanem MMP-16 (MT3-MMP) wurde die Proteinlösung (MT3-MMP in 50 mM Tris (pH 8,5), 100 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) über Membranen (Ausschlußgrenze 10 kDa) auf 10 mg/ml aufkonzentriert. Nach Zugabe von 1 mM Batimastat führte ein ausgedehntes *screening*-Verfahren bei 20°C zu einem anfänglichen Kristallisationspuffer, der zu folgender Kristallisationsbedingung verfeinert wurde:

100 mM Tris (pH 8,7), 1,1 M K/Na-Tartrat.

Die Kristallisation wurde im Dampfdiffusionsverfahren nach der *sitting drop* Methode durchgeführt (1 µl Protein + 1 µl Reservoir). Innerhalb von einigen Tagen wuchsen quaderförmige Kristalle bis zu einer Größe von 200 x 200 x 100 µm<sup>3</sup> und streuten bis 1,80 Å (Synchrotronstrahlung, Wellenlänge:  $\lambda = 1,0503$  Å), vgl. Abbildung IV-17.



**Abbildung IV-17:** MT3-MMP/Batimastat-Kristalle und Beugungsbild einer 1° Rotationsaufnahme von MT3-MMP im Komplex mit Batimastat. Der Plattenrand entspricht einer Auflösung von 1,77 Å.

### IV.3.2 Datensammlung

Ein erster Datensatz wurde von MT3-MMP Kristallen mit Graphit-monochromatisierter Cu-K<sub>α</sub>-Röntgenstrahlung ( $\lambda = 1,5418$  Å) auf einem Image Plate Detektor (wie in Kapitel III.3.2 beschrieben) gemessen. Zur Messung wurden die MT3-MMP-Kristalle in einen Tropfen, der



aus Mutterlauge und 20 % Glycerin als Cryoprotektans bestand, überführt, 10 sec äquilibriert und anschließend in einem Cryoloop geerntet, sofort auf der Meßapparatur montiert und in einem Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren.

Eine zweite, hochaufgelöste Messung wurde an der Beamline BW6, DESY, Hamburg durchgeführt. Die Datensammlung erfolgte bei 100 K mit Synchrotron-Strahlung ( $\lambda = 1,0503 \text{ \AA}$ ) auf einem CCD-Detektor (Marresearch, Hamburg). Der Drehwinkel je Aufnahme betrug  $1^\circ$  über einen Messbereich von  $45^\circ$ . Die Kristalle streuten bis zu einer maximalen Auflösung von  $1,8 \text{ \AA}$ .

Die Bestimmung der Raumgruppe, die Verfeinerung der Zellparameter und die Integration erfolgte mit dem HKL-Programmpaket Denzo und Scalepack (Otwinowski & Minor, 1997).

Die Datenprozessierungsstatistik ist in Tabelle IV-5 zusammengefasst.

**Tabelle IV-5:** Datenprozessierungsstatistik für MT3-MMP/Batimastat

DATENSAMMLUNG	
Raumgruppe	P4 <sub>3</sub> 22
Zellkonstanten [ $\text{\AA}$ , °]	
a	51,21
b	51,21
c	149,37
$\alpha$	90
$\beta$	90
$\gamma$	90
Einheitszellvolumen [ $\text{\AA}^3$ ]	391717
$V_m$ [ $\text{\AA}^3/\text{Da}$ ] (entspricht % $\text{H}_2\text{O}$ )	2,3 (46 %)
Anzahl der Komplexe pro asymmetrischer Einheit	1
Begrenzende Auflösung	1,8
Gemessene Reflexe	119029
Unabhängige Reflexe	18455
$I/\sigma$	5,50
$I/\sigma$ letzte Schale (1,9 - 1,8 $\text{\AA}$ )	2,2
Vollständigkeit der Daten	96,7 %
letzte Schale (1,9 - 1,8 $\text{\AA}$ )	91,1 %
$R_{\text{merge}}$	8,3 %
letzte Schale (1,9 - 1,8 $\text{\AA}$ )	32,7 %

### IV.3.3 Patterson-Suche

Die Struktur der katalytischen Domäne von MT3-MMP im Komplex mit dem Inhibitor Batimastat wurde mittels der Patterson-Suchmethode (*Molecular Replacement*) mit Hilfe des Programms AMoRe (Navaza, 1994) gelöst. Es wurden Daten mit einer Auflösung von 15 - 4,0  $\text{\AA}$  verwendet. Als Suchmodell diente die Kristallstruktur der katalytischen Domäne von humanem MMP-14 (MT-1-MMP, PDB Eintrag: 1bqq, (Fernandez-Catalan et al., 1998) mit den Resten Ile114 - Ser287). Die erste Lösung hatte einen Korrelationsfaktor von  $c = 0,387$  bei einem R-Faktor von  $R = 0,465$  und hob sich klar von den weiteren gefundenen Lösungen ab (Zweite Lösung:  $c = 0,237$  und  $R = 0,506$ ).

### IV.3.4 Modellbau und Verfeinerung

Die MT3-MMP Kristallstruktur wurde anfänglich mit dem Programm X-PLOR (Brünger, 1992b) unter der Verwendung der Engh & Huber-Parameter (Engh & Huber, 1991) verfeinert. Die  $R_{free}$ -Überprüfung basierte auf einem Testset von 4,9 % der Daten, die von der Verfeinerung ausgeschlossen waren. Die berechnete  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte bis zu einer Auflösung von 1,8 Å war von ausgezeichneter Qualität und erlaubte einen manuellen Einbau der Aminosäuren Gly124 bis Pro292 der katalytischen Domäne. Zunächst startete die Verfeinerung mit konventioneller Powell-Energie-Minimierung gefolgt von Gruppen-B-Faktor und individueller B-Faktor-Verfeinerung mit Daten des Bereichs von 17 bis 1,8 Å. In späteren Phasen der Verfeinerung wurde der *maximum-likelihood* Algorithmus des Programms CNS (Brünger et al., 1998) verwendet. Jedem Verfeinerungsschritt folgte ein manuelles Überbauen des Modells mit dem Programm O (Jones et al., 1991) oder MAIN (Turk, 1992), bei dem auch die automatisch positionierten Solvensmoleküle überprüft, bei Bedarf entfernt oder Neue eingefügt wurden. Die finalen Verfeinerungsschritte wurden mit dem Programm REFMAC5 (CCP4, 1994) durchgeführt und führten zu einem Atommodell mit einem R-Faktor von 20,76 %.

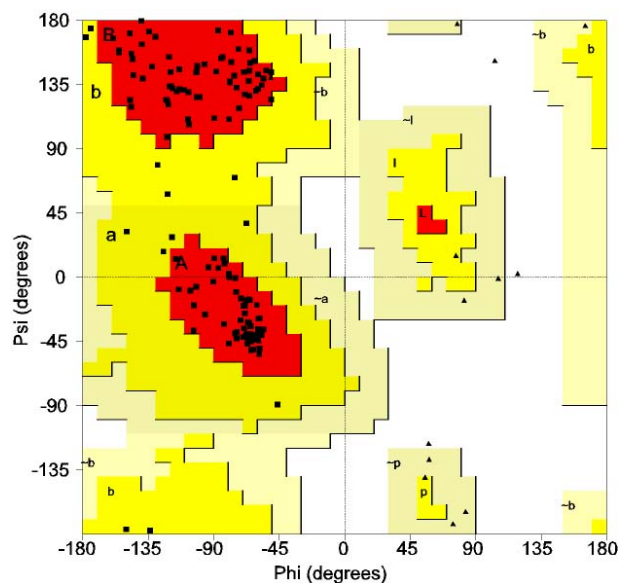
Das finale Modell besteht aus den Segmenten Gly124 - Pro292 (MT3-MMP), dem Inhibitor Batimastat, 116 Wassermolekülen, zwei Zink- und zwei Calciumionen.

Die Elektronendichte der N-terminalen vier Aminosäuren (Tyr120-Ala-Leu-Thr) wurde auch in späteren Verfeinerungs- und Bauzyklen nicht interpretierbar, so dass das finale Atommodell 178 Aminosäuren umfasst. Bis auf die Aminosäuren Leu175 bis Gly178 (MT-Loop) sowie His325 bis Asp236 (*specificityloop*) kann die gesamte Aminosäurekette in kontinuierlicher Elektronendichte verfolgt werden.

### IV.3.5 Qualität des Modells

Im final verfeinerten Molekülmodell von MT3-MMP sind, abgesehen von den N-terminalen vier Aminosäuren und den genannten Aminosäuren des MT- und *specificityloops* alle weiteren Aminosäuren, der Inhibitor, die Metallionen und Solvensmoleküle sehr gut in ihrer  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte definiert.

Eine Überprüfung der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette im MT3-MMP-Atommodell zeigt, dass sich 92,2 % aller Aminosäuren (Glycin und Prolin ausgenommen) in dem am meisten bevorzugten Bereich und 7,8 % im zusätzlich erlaubten Bereich befinden. Keine Aminosäure zeigt eine Bindungsgeometrie, die in den weitläufig erlaubten oder verbotenen Bereich der Ramachandran-Statistik (Ramachandran & Sasisekharan, 1968) fallen würde. In Abbildung IV-18 ist die Ramachandran-Statistik aller Aminosäuren des finalen MT3-MMP-Atommodells graphisch dargestellt. Die Qualität des verfeinerten Modells wurde mit den Programmen PROCHECK (Laskowski et al., 1993) und WHATCHECK (Hooft et al., 1996) überprüft, die Verfeinerungsstatistik des endgültigen Modells mit einem R-Faktor von 20,7 ( $R_{free}$  23,6) ist in Tabelle IV-6 zusammengefasst.

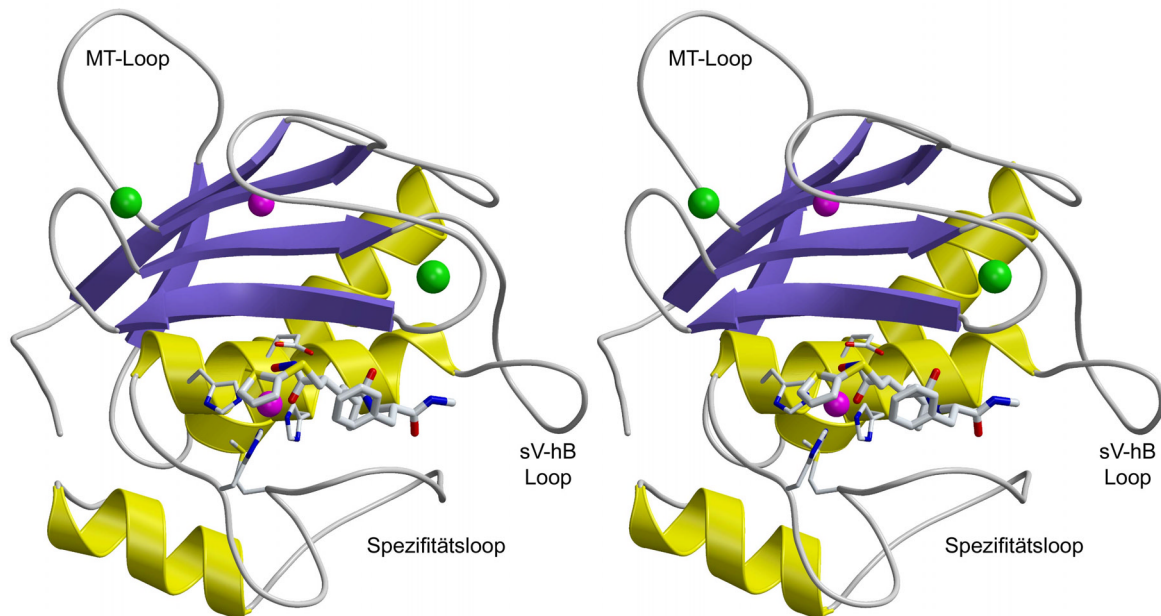


**Abbildung IV-18:** Ramachandran-Plot der dihedralen Hauptkettenwinkel Phi und Psi des finalen MT3-MMP-Modells. Die Bereiche, die für L-Aminosäuren erlaubt sind, sind gelb dargestellt, wobei die sterisch günstigsten Regionen rot gezeichnet sind. Die weißen Flächen markieren die sterisch verbotenen Bereiche.

**Tabelle IV-6:** Verfeinerungsstatistik für MT3-MMP

VERFEINERUNG	
Auflösungsbereich	16,6 - 1,8 Å
verwendete Reflexe	18455
Reflexe im Arbeitsset	17555
Reflexe im Testset	900
R-Faktor [%]	20,7
R <sub>free</sub> [%]	23,6
r.m.s.-Abweichungen von Idealwerten der	
Bindungslängen [Å]	0,014
Bindungswinkel [°]	1,71
r.m.s. B [Å <sup>2</sup> ]	3,90
Mittlerer B-Faktor	
Hauptkettenatome [Å <sup>2</sup> ]	28,67
Seitenkettenatome [Å <sup>2</sup> ]	31,11
Wassermoleküle [Å <sup>2</sup> ]	37,32
Anzahl der Atome in der asymmetrischen Einheit	
Proteinatome (ohne Wasserstoff)	1346
Inhibitoratome (ohne Wasserstoff)	32
Solvensmoleküle	116
Metallatome	4
(Φ, Ψ) - Winkel Verteilung im	
bevorzugten Bereich	119 (92,2 %)
zusätzlich erlaubten Bereich	10 (7,8 %)

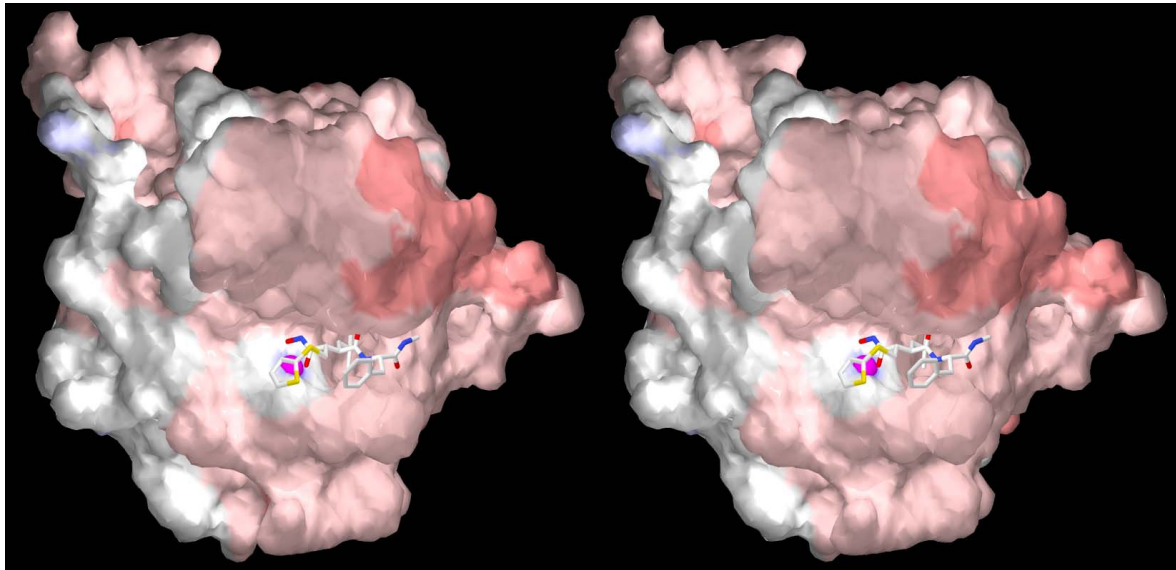
### IV.3.6 Strukturbeschreibung



**Abbildung IV-19:** Ribbondarstellung (stereo) der katalytischen Domäne von MT3-MMP. Batimastat ist als dickes Stäbchenmodell gezeichnet, während die Histidine, die das katalytische Zink koordinieren, das katalytische Glutamat und das charakteristische Met264 als dünne Stäbchen gezeigt werden. Die Zink- und Calciumionen sind als Kugeln dargestellt (pink, bzw. grün).

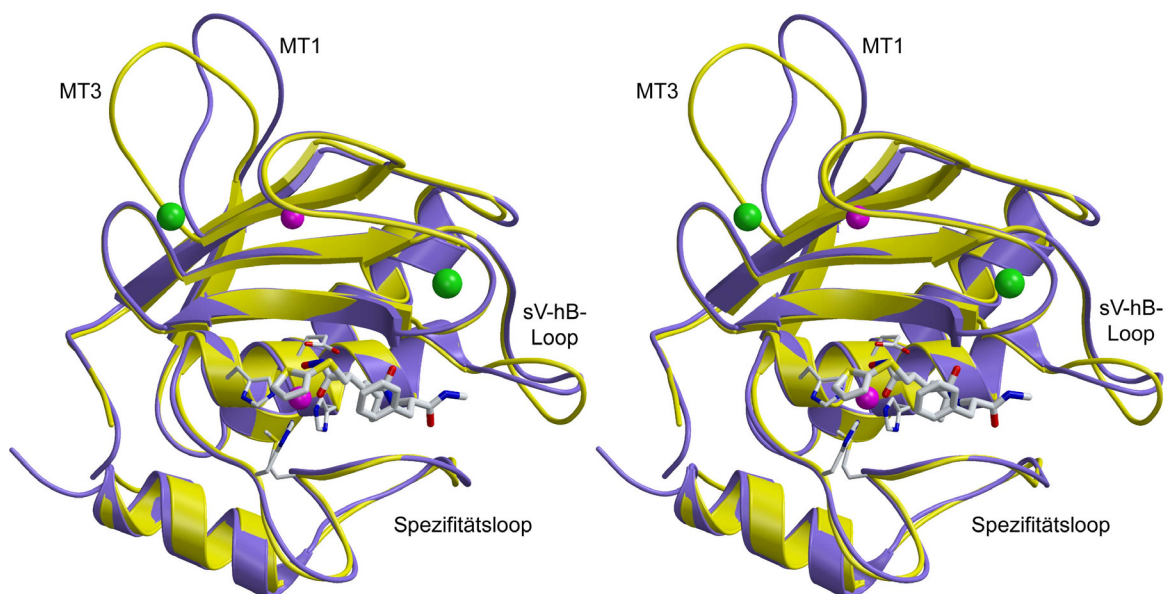
#### IV.3.6.1 Überblick

Die katalytische Domäne von MT3-MMP zeigt die typische Faltung, die allen MMPs zu eigen ist. Die obere Subdomäne besteht aus dem stark verbogenen  $\beta$ -Faltblatt und den darunterliegenden  $\alpha$ -Helices hA und *active-site*-Helix hB. Die untere Subdomäne besteht aus dem langen *specificityloop*, der am Ende der  $\alpha$ -Helix hB beginnt, die untere Begrenzung der *active-site cleft* bildet, sich um die S1'-Spezifitätstasche windet und in der C-terminalen  $\alpha$ -Helix hC mündet. Für eine detailliertere Beschreibung des typischen MMP-Hauptkettenverlaufs sei auf Kapitel IV.2.6.1 verwiesen.



**Abbildung IV-20:** Stereodarstellung der MT3-MMP-Oberfläche, die nach dem elektrostatischen Potential eingefärbt ist (negativ: rot bis positiv: blau). Der Inhibitor Batimastat ist als Stäbchenmodell dargestellt und das katalytisch aktive Zinkion als Kugel (pink).

MT3-MMP ähnelt nicht nur in ihren biochemischen sondern auch in ihren strukturellen Eigenschaften sehr MMP-14 (MT1-MMP) (Fernandez-Catalan et al., 1998). Zwischen den katalytischen Domänen der beiden MT-MMPs besteht 68 % Identität auf der Aminosäureebene, und beide Strukturen sind mit einer RMS-Abweichung von 0,65 Å (es wurden 148 C<sup>α</sup>-Atome zur Berechnung benutzt) äußerst ähnlich.



**Abbildung IV-21:** Überlagerung (stereo) von MT3-MMP (gelb) mit MT1-MMP (lila).

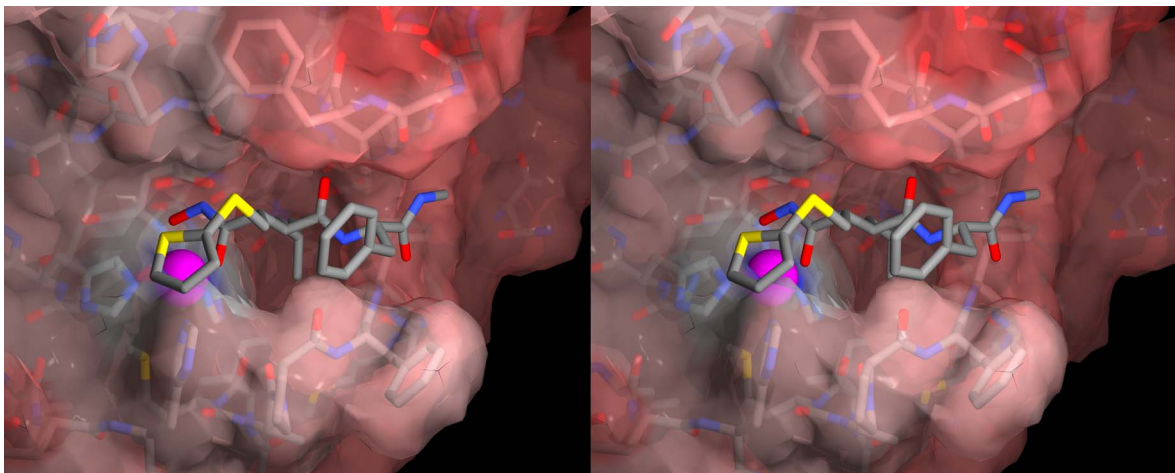
Einer der wesentlichsten Unterschiede kann in der Form der S1'-Tasche beobachtet werden. In MT1-MMP ist diese Spezifitätstasche für den P1'-Rest ein Tunnel, der sich durch das ganze Enzym hindurchzieht. In der vorliegenden MT3-MMP Struktur ist dieser Tunnel durch die Seitenkette von Met271 am unteren Ende verschlossen. Dieses Methionin ist zwar auch in MT1-MMP konserviert, jedoch liegt dort die Seitenkette in einer solchen Konformation vor, dass der Tunnel geöffnet bleibt.

#### IV.3.6.2 Batimastat

Der Breitband-MMP-Inhibitor Batimastat ist im aktiven Zentrum von MT3-MMP in einer ähnlichen Konformation wie in MMP-12 gebunden (vgl. Kapitel IV.2.6.2). Batimastat bildet ebenso wie in MMP-12 mit seinem peptidischen *backbone* fünf Wasserstoffbrücken zu den Carbonylen und Stickstoffen der MT3-MMP Hauptkette und komplexiert mit seiner Hydroxamatgruppe das aktive Zinkion. Ebenso wie in MMP-12 wird auch hier das Zinkion zusammen mit den drei Histidinen in Form einer quadratischen Pyramide koordiniert. Allerdings ist die Pyramide etwas stärker verzerrt als in MMP-12.

Die beiden Konformationen des Thiophenrings sind gleich besetzt, so dass der Schwefel sowohl nach oben in Richtung *S-loop* als auch nach unten in Richtung des *specificityloops* zeigen kann. Jedoch ist der Thiophenring im Komplex mit MT3-MMP stärker nach hinten in Richtung des *S-loops* gedreht und zudem stärker geneigt als in MMP-12.

Der Phenylring ist eindeutig definiert und liegt in einer einzigen Konformation vor, die der im Komplex mit MMP-8 (Grams et al., 1995a) ähnelt. In MT3-MMP ist der Phenylring leicht nach hinten in Richtung *S-loop* gedreht, jedoch im Vergleich zur MMP-12 Struktur stärker nach vorne geneigt.



**Abbildung IV-22:** Nahaufnahme von Batimastat im aktiven Zentrum von MT3-MMP als Stereodarstellung. Die Oberfläche ist semitransparent dargestellt und nach dem elektrostatischen Potential eingefärbt.

### IV.3.6.3 MT-loop

Der größte, sofort ins Auge fallende Unterschied zu den löslichen MMPs ist der MT-loop. Diese etwa 8 Aminosäuren lange Insertion verlängert den *loop*, der Strang sII mit Strang sIII verbindet. Die Funktion dieses *loops*, den alle MT-MMPs besitzen, ist noch unklar. Es wird spekuliert, dass er bei der Aktivierung von ProMMP-2 eine maßgebliche Rolle spielt (Fernandez-Catalan et al., 1998; Murphy et al., 1999).

Trotz der nicht interpretierbaren Dichte um die Reste Leu175-Glu-Asn-Gly178, die als Indiz für die Flexibilität des *loops* gedeutet werden kann, liegt der MT-loop in einer deutlich anderen Konformation vor als in MT1-MMP (MMP-14). Da jedoch dieser *loop* nicht durch interne Disulfid- oder Wasserstoffbrücken stabilisiert wird, ist die Konformation, die in der Elektronendichte sichtbar ist, wahrscheinlich nur eine von mehreren, die dieser *loop* einnehmen kann. Der MT-loop ist in der vorliegenden Struktur um eine Aminosäure kürzer, als derjenige von MT1-MMP und weist eine andere Ladungsverteilung seiner Seitenketten auf. So ist in MT1-MMP die Ladung insgesamt eher neutral, weil saure und basische Seitenketten direkt aufeinander folgen: Tyr164-Ala-Tyr-Ile-Arg-Glu-Gly-His-Glu-Lys-Gln-Ala-Asp-Ile177 (saure Aminosäuren sind einfach, basische doppelt unterstrichen). Ausgenommen ist Asp176, das keinen basischen Partner besitzt. Bei MT3-MMP liegen die Ladungen dagegen "sortiert" vor: Am Anfang des *loops* befinden sich zwei Glutaminsäuren (Glu174 und Glu176). Darauf folgen in kurzem Abstand die beiden basischen Reste von Lys179 und Arg180 und darauf wiederum die beiden sauren Seitenketten von Asp181 und Asp183. Sequenz des MT-loop von MT3-MMP: Tyr172-Leu-Glu-Leu-Glu-Asn-Gly-Lys-Arg-Asp-Val-Asp-Ile184.

### IV.3.6.4 ProMMP-2 Aktivierung

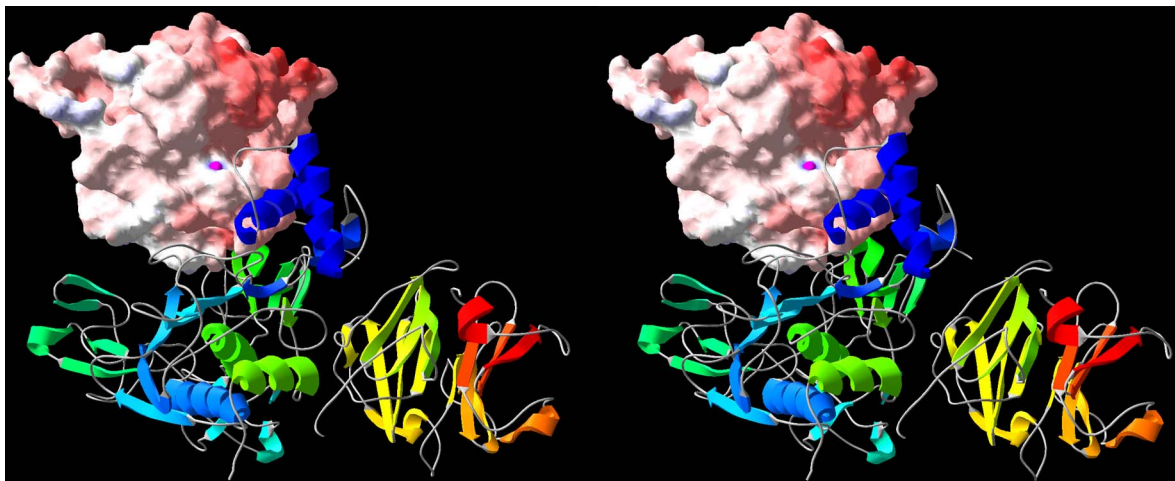
Eine wichtige Funktion von MT3-MMP ist neben dem Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix ebenso wie bei MT1-MMP die Aktivierung von ProMMP-2 (Sato & Seiki, 1996). Der Mechanismus der ProMMP-2 Aktivierung ist in Kapitel II.2.4.9 beschrieben. Dabei wird in einem ternären Komplex aus einer mit TIMP-2 inhibierten MT1-MMP und ProMMP-2 die Prodomäne von MMP-2 einer zweiten, ebenfalls membrangebundenen MT1-MMP präsentiert (Butler et al., 1998). Diese spaltet im *loop* nach  $\alpha$ -Helix h1 kurz vor h2 an der Sequenz Ser64-Cys-Asn-/-Leu-Phe-Val69.

Modelling Experimente, die mit MT3-MMP durchgeführt wurden zeigten, dass ein *Docking* der Prodomäne von ProMMP-2 an MT3-MMP komplementäre Kontaktflächen ergäbe. Konstruktive Interaktionen sind zu sehen bei  $\alpha$ -Helix h1, die in einer Furche in der MT3-MMP-Oberfläche liegt, welche von  $\alpha$ -Helix hC und dem unteren Rand der *active-site cleft* gebildet wird. Dabei ist es einer ganzen Reihe von Resten beider Enzyme möglich Wasserstoffbrücken auszubilden. So könnten z. B. die Seitenketten von Lys47, Asp55 und Thr57 (ProMMP-2) mit den Seitenketten von Tyr270, His256, bzw. Asn258 (MT3-MMP) interagieren. Hydrophobe Wechselwirkungen sind möglich zwischen z. B. Val41 und Ala42 (ProMMP-2) und beiden Seitenketten von Met271 und Pro279 sowie zwischen Leu49 (ProMMP-2) und Pro260 (MT3-MMP).

Die Seitenkette von Phe267, welches einen Teil des unteren Randes des aktiven Zentrums von MT3-MMP bildet, ragt in diesem Modell in eine hydrophobe Tasche von ProMMP-2, die aus den Resten Val51, Leu67, Val69 und Leu70 gebildet wird.

Weitere Interaktionen sind beim *S-loop* von ProMMP-2 möglich. Hier schmiegt sich der *S-loop* in eine Mulde links unterhalb des aktiven Zentrums von MT3-MMP. Diese Mulde liegt zwischen der C-terminalen  $\alpha$ -Helix und dem ersten Teil des Spezifitäts-*loops* von MT3-MMP. Auch hier ist die Ausbildung von mehreren Wasserstoffbrücken möglich (z.B. von den Seitenketten Thr45, Lys47, Asn55 und Thr56 (ProMMP-2) zu den MT3-MMP-Seitenketten Glu269, Tyr270, His256 und Asn158).

Abgesehen von den genannten Bereichen sind auch noch vereinzelte weitere hydrophile Wechselwirkungen möglich z. B. von Arg98 zu Asp259, das auf der Unterseite von MT3-MMP liegt.



**Abbildung IV-23:** Modell einer möglichen Komplexbildung von MT3-MMP mit ProMMP-2, die zur Aktivierung von ProMMP-2 führt. Hier wird von einer Schnittstelle bei Ser64-Cys-Asn-/-Leu-Phe-Val69 ausgegangen. MT3-MMP ist in Oberflächendarstellung (mit Färbung nach elektrostatischem Potential) gezeigt, während ProMMP-2 als Ribbonplot gezeichnet ist. Die Ribbons von ProMMP-2 sind nach Kettenverlauf von blau (N-Terminus) bis rot (C-Terminus) eingefärbt.

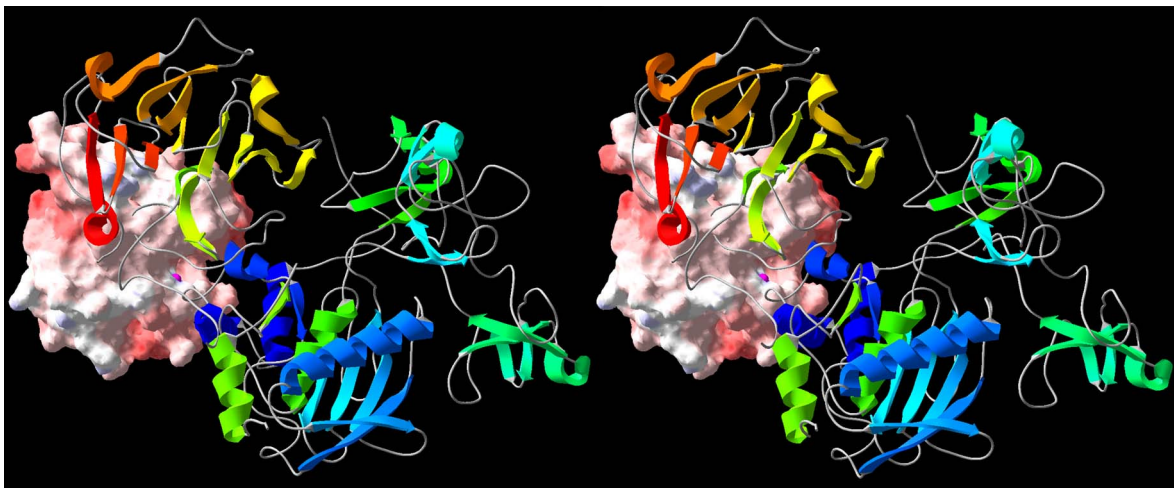
Bisher wird davon ausgegangen, dass nach der ersten Prozessierung durch MT1-MMP weitere Spaltungen von ProMMP-2 autokatalytisch durchgeführt werden. Eine weitere Schnittstelle lässt sich aber bei Gly82-Leu-Pro-/-Gln-Thr-Gly-Asp-Leu89 vermuten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine MT-MMP an dieser Stelle spaltet. Bei einem Docking, bei dem ProMMP-2 so orientiert wird, dass die Schnittstelle Pro85-/-Gln86 in die *active-site cleft* von MT3-MMP gelegt wird, würde das Proenzym "verkehrt" herum (in einer Orientierung, in der die Hämopexin-ähnliche Domäne nach oben zeigt) an die katalytische Domäne von MT3-MMP binden. In dieser Orientierung können in mehreren Bereichen der Oberfläche beider Enzyme Kontaktflächen beobachtet werden, die auf eine starke Bindung schließen lassen:

- Die  $\alpha$ -Helix h2 (Reste Leu67 - Phe81) der Prodomäne passt nahezu perfekt in eine Mulde auf der Oberfläche von MT3-MMP unterhalb der *active-site cleft*. Diese Mulde wird vom



ersten Teil des *specificityloops* gebildet und auf der unteren Seite von Asn258-Asp-Thr und oben vom konservierten Pro266-X-Tyr-Motiv begrenzt. Die Seitenketten der Reste von z. B. Glu255 und Asp259 (MT3-MMP) sind an Positionen, in denen sie Wasserstoffbrücken zu Lys75 bzw. Lys71 (ProMMP-2) bilden könnten. Hydrophobe Wechselwirkungen könnten in diesem Bereich die Reste Pro260 und Phe267 (MT3-MMP) mit Leu67 und Phe68 (ProMMP-2) eingehen.

- Ein weiterer Bereich, der eine starke Wechselwirkung vermuten lässt, liegt am Ende von  $\beta$ -Strang sI von MT3-MMP. Hier könnten Wasserstoffbrückenbindungen von Lys137 (MT3-MMP) zum Hauptketten-Carbonylsauerstoff von Gly625 oder zur Seitenkette von Glu624 in einem *hairpinloop* (ProMMP-2) gebildet werden.
- Es zeigt sich, dass in dieser Orientierung der flexible MT-loop in der Nähe von Propellerblatt 4 der Hämopexin-ähnlichen Domäne von ProMMP-2 zu liegen kommt. In einer der ProMMP-2 zugewandten Konformation des MT-loops sind dann die Interaktionen der beiden Enzyme mit Wasserstoffbrücken zwischen z. B. Lys179 und Arg180 des MT-loops von MT3-MMP mit der Carboxylfunktion von Asp656 möglich. Weitere Wasserstoffbrücken wären zwischen der Seitenkette von Asp181 (MT3-MMP) und Lys639 (ProMMP-2) und zwischen dem Hauptketten-Carbonyl von Gly178 (MT3-MMP) und der Lys649-Seitenkette von ProMMP-2 möglich.
- Einige weitere hydrophobe Kontakte (zwischen Pro214 und Cys660) im Bereich des sIV-sV-loops von MT3-MMP und Propellerblatt 1 und 4 der Hämopexin-ähnlichen Domäne von ProMMP-2 vervollständigen die Modellkontakte.



**Abbildung IV-24:** 2. Modell einer Aktivierung von ProMMP-2 durch MT3-MMP. Hier ist die ProMMP-2 so orientiert, dass die Sequenz um eine Schnittstelle bei Gly82-Leu-Pro-/Gln-Thr-Gly87 in der *active-site cleft* liegt. Bei dieser Orientierung liegt ProMMP-2 "verkehrt" herum (d.h. ihre Hämopexin-ähnliche Domäne zeigt nach oben) vor MT3-MMP. In dieser Ausrichtung kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem MT-loop von MT3-MMP und der Hämopexin-ähnlichen Domäne von ProMMP-2. MT3-MMP ist in Oberflächendarstellung gezeigt (gefärbt nach seinem elektrostatischen Potential) und ProMMP-2 in Ribbondarstellung. Die Ribbons von ProMMP-2 sind nach dem Kettenverlauf eingefärbt (N-Terminus, blau bis C-Terminus, rot)

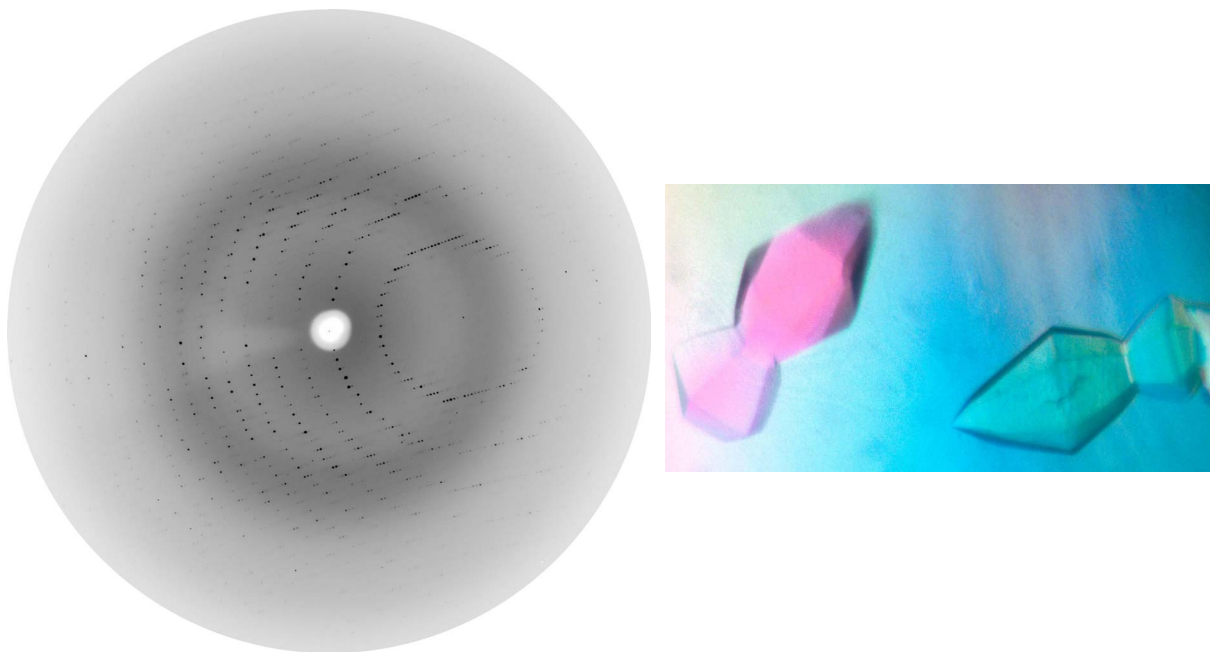
## IV.4 MMP-13 im Komplex mit TIMP-2

### IV.4.1 Kristallisation

Für die Kristallisation von humanem MMP-13 mit bovinem TIMP-2 wurde die Proteinlösung (MMP-13/TIMP-2 in 30 mM Tris (pH 7,5), 500 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) über Membranen (Ausschlussgrenze 10 kDa) auf 15 mg/ml aufkonzentriert. Ein ausgedehntes *screening*-Verfahren bei 20°C führte zu einem anfänglichen Kristallisationspuffer, der zu folgender Kristallisationsbedingung verfeinert wurde:

100 mM Mes (pH 6,5), 200 mM Magnesiumacetat, 20 % (w/v) PEG 8000.

Die Kristallisation wurde im Dampfdiffusionsverfahren nach der *sitting drop* Methode durchgeführt (1,5 µl Protein + 1 µl Reservoir + 0,3 µl 0,1 M NAD). Innerhalb von einigen Tagen wuchsen speerförmige Kristalle bis zu einer Größe von 400 x 100 x 100 µm<sup>3</sup> und streuten bis 2,0 Å (Synchrotronstrahlung, Wellenlänge:  $\lambda = 1,0503$  Å), vgl. Abbildung IV-25.



**Abbildung IV-25:** MMP-13/TIMP-2-Kristall und Beugungsbild einer 1°-Rotationsaufnahme dieses Komplexes. Der Plattenrand entspricht einer Auflösung von 1,93 Å.

### IV.4.2 Datensammlung

Ein erster Datensatz der MMP-13/TIMP-2 Kristalle wurde mit Graphit-monochromatisierter Cu-K<sub>α</sub>-Röntgenstrahlung ( $\lambda = 1,5418$  Å) auf einem Image Plate Detektor (wie unter Kapitel III.3.2 beschrieben) gemessen. Zur Messung wurden die Kristalle in einen Tropfen, der aus Mutterlauge und 30 % Glycerin als Cryoprotektans bestand, überführt, 10 sec äquilibriert,

anschließend in einem Cryoloop geerntet, sofort auf der Messapparatur montiert und in einem Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren.

Eine zweite, hochaufgelöste Messung wurde an der Beamline BW6, DESY, Hamburg, durchgeführt. Die Datensammlung erfolgte bei 100 K mit Synchrotron-Strahlung ( $\lambda = 1,0503 \text{ \AA}$ ) auf einem CCD-Detektor (Marresearch, Hamburg). Der Drehwinkel je Aufnahme betrug  $1^\circ$  über einen Messbereich von  $70^\circ$ . Die Kristalle streuten bis zu einer maximalen Auflösung von  $2,0 \text{ \AA}$ .

Die Bestimmung der Raumgruppe, die Verfeinerung der Zellparameter und die Integration erfolgte mit dem HKL-Programmpaket Denzo und Scalepack (Otwinowski & Minor, 1997).

Die Datenprozessierungsstatistik ist in Tabelle IV-7 zusammengefasst.

**Tabelle IV-7:** Datenprozessierungsstatistik für MMP-13/TIMP-2

DATENSAMMLUNG	
Raumgruppe	P6 <sub>5</sub>
Zellkonstanten [ $\text{\AA}$ , °]	
a	72.53
b	72.53
c	181.38
$\alpha$	90
$\beta$	90
$\gamma$	120
Einheitszellvolumen [ $\text{\AA}^3$ ]	526060
$V_m$ [ $\text{\AA}^3/\text{Da}$ ] (entspricht % H <sub>2</sub> O)	2,2 (44 %)
Anzahl der Komplexe pro asymmetrischer Einheit	1
Begrenzende Auflösung	2,0
Gemessene Reflexe	312646
Unabhängige Reflexe	36246
$I/\sigma$	25,1
$I/\sigma$ letzte Schale (2,07 - 2,00 $\text{\AA}$ )	3,1
Vollständigkeit der Daten	99,8 %
letzte Schale (2,07 - 2,00 $\text{\AA}$ )	99,9 %
$R_{\text{merge}}$	6,0 %
letzte Schale (2,07 - 2,00 $\text{\AA}$ )	49,8 %

#### IV.4.3 Patterson-Suche

Die Struktur der katalytischen Domäne von MMP-13 im Komplex mit TIMP-2 wurde mittels der Patterson-Suchmethode (*Molecular Replacement*) mit Hilfe des Programms AMoRe (Navaza, 1994) gelöst. Es wurden Daten mit einer Auflösung von  $15 - 3,0 \text{ \AA}$  verwendet. Als Suchmodell dienten die Kristallstrukturen der katalytischen Domäne von humanem MMP-13 (PDB Eintrag: 830c, (Lovejoy et al., 1999)) und diejenige von bovinem TIMP-2 aus dem Komplex mit MT1-MMP (PDB Eintrag: 1bqq, (Fernandez-Catalan et al., 1998)). Die erste Lösung hatte einen Korrelationsfaktor von  $c = 0,505$  bei einem R-Faktor von  $R = 0,420$  und hob sich klar von den weiteren gefundenen Lösungen ab (Zweite Lösung:  $c = 0,343$  und  $R = 0,480$ ).

#### IV.4.4 Modellbau und Verfeinerung

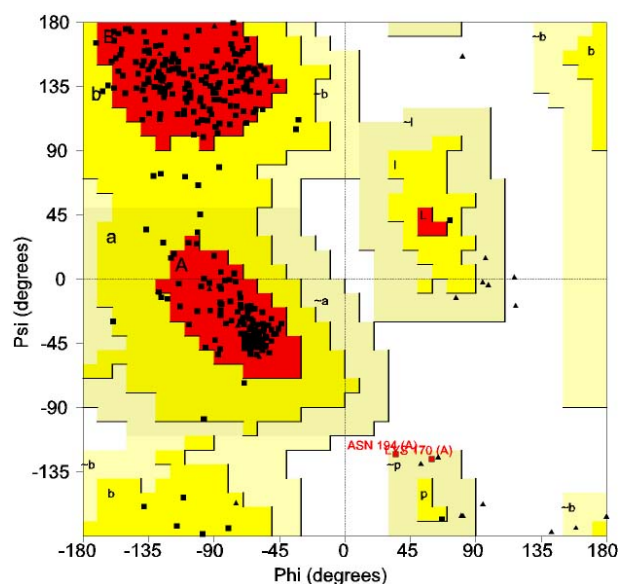
Die Kristallstruktur des Komplexes wurde anfänglich mit dem Programm X-PLOR (Brünger, 1992b) unter der Verwendung der Engh & Huber-Parameter (Engh & Huber, 1991) verfeinert. Die  $R_{free}$ -Überprüfung basierte auf einem Testset von 5,0 % der Daten, die von der Verfeinerung ausgeschlossen waren. Die berechnete  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte bis zu einer Auflösung von 2,0 Å war von ausgezeichneter Qualität und erlaubte einen manuellen Einbau der Aminosäuren Gly104 bis Pro268 der katalytischen Domäne von MMP-13 und von Cys1 bis Gly180 von TIMP-2. Zunächst startete die Verfeinerung mit konventioneller Powell Energie Minimierung gefolgt von Gruppen-B-Faktor und individueller B-Faktor-Verfeinerung mit Daten des Bereichs von 23 bis 2,0 Å. In späteren Phasen der Verfeinerung wurde der *maximum-likelihood* Algorithmus des Programms CNS (Brünger et al., 1998) verwendet. Jedem Verfeinerungsschritt folgte ein manuelles Überbauen des Modells mit dem Programm O (Jones et al., 1991) oder MAIN (Turk, 1992), bei dem auch die automatisch positionierten Solvensmoleküle überprüft, bei Bedarf entfernt oder Neue eingefügt wurden. Die finalen Verfeinerungsschritte wurden mit dem Programm REFMAC5 (CCP4, 1994) durchgeführt und führten zu einem Atommodell mit einem R-Faktor von 19,99 %.

Die Elektronendichte der vier Aminosäuren Gly-248-Lys-Ser-His251 (*specificityloop*) von MMP-13 und der C-terminalen 14 Reste (AAPPKQEFLLIEDP) von TIMP-2 wurde auch in späteren Verfeinerungs- und Bauzyklen nicht interpretierbar.

#### IV.4.5 Qualität des Modells

Das finale Modell besteht aus den Segmenten Gly104 - Pro268 (MMP-13), Cys1 - Gly180 (TIMP-2), 325 Wassermolekülen, zwei Zink- und zwei Calciumionen. Abgesehen von den genannten Aminosäuren des *specificityloops* (MMP-13) und des C-Terminus von TIMP-2 sind alle weiteren Aminosäuren, die Metallionen und die Solvensmoleküle sehr gut in ihrer  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte definiert.

Eine Überprüfung der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette im Modell des MMP-13/TIMP-2 Komplexes zeigte, dass sich 90,0 % aller Aminosäuren (Glycin und Prolin ausgenommen) in dem am meisten bevorzugten, 9,3 % im zusätzlich erlaubten und 0,7 % im weitläufig erlaubten Bereich befinden. Keine Aminosäure zeigt eine Bindungsgeometrie, die in den verbotenen Bereich der Ramachandran-Statistik (Ramachandran & Sasisekharan, 1968) fallen würde. In Abbildung IV-26 ist die Ramachandran-Statistik aller Aminosäuren des finalen MMP-13/TIMP-2-Atommodells graphisch dargestellt. Die Qualität des verfeinerten Modells wurde mit den Programmen PROCHECK (Laskowski et al., 1993) und WHATCHECK (Hoof et al., 1996) überprüft, die Verfeinerungsstatistik des endgültigen Modells mit einem R-Faktor von 19,99 ( $R_{free}$  23,13) ist in Tabelle IV-8 zusammengefasst.

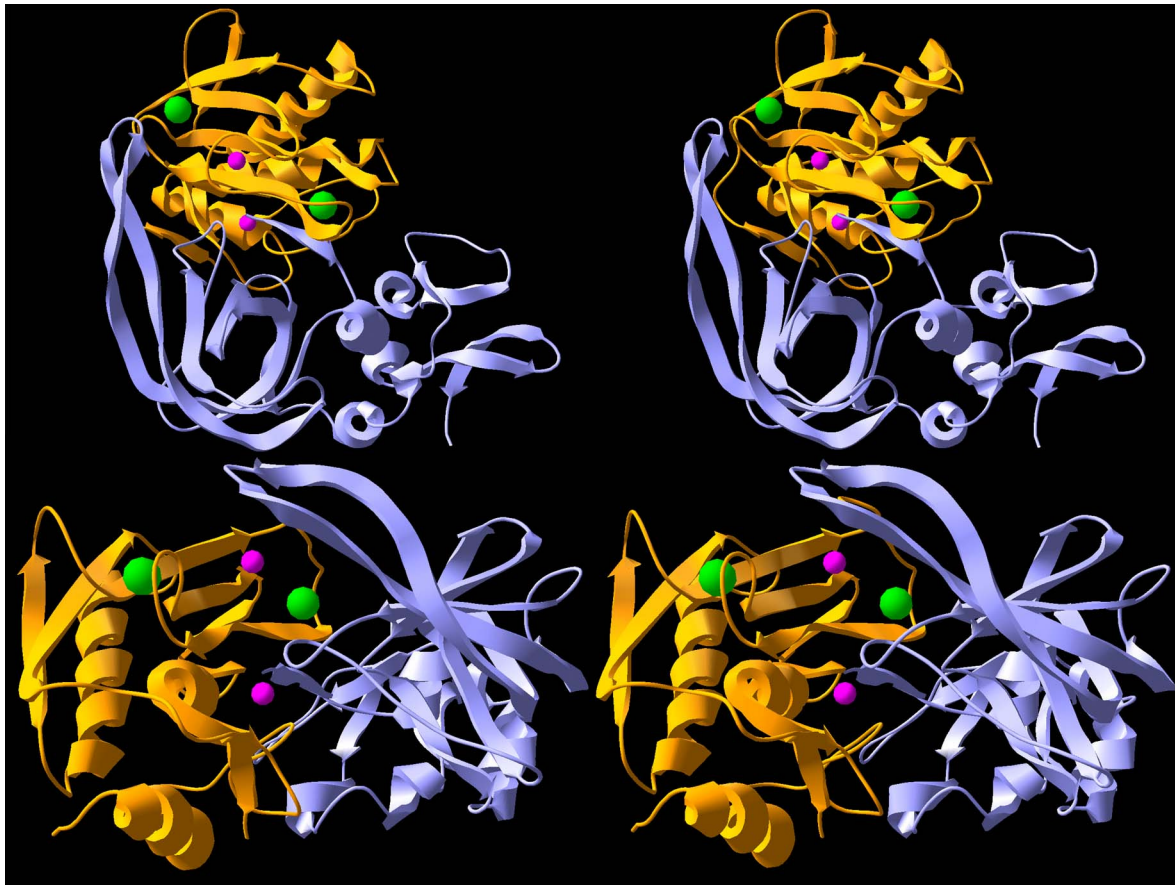


**Abbildung IV-26:** Ramachandran Plot der dihedralen Hauptkettenwinkel Phi und Psi des finalen MMP-13/TIMP-2-Modells. Die Bereiche, die für L-Aminosäuren erlaubt sind, sind gelb dargestellt, wobei die sterisch günstigsten Regionen rot gezeichnet sind. Die weißen Flächen markieren die sterisch verbotenen Bereiche.

**Tabelle IV-8:** Verfeinerungsstatistik für MMP-13/TIMP-2

VERFEINERUNG	
Auflösungsbereich	23,8 - 2,0 Å
verwendete Reflexe	36246
Reflexe im Arbeitsset	34446
Reflexe im Testset	1800
R-Faktor [%]	19,99
R <sub>free</sub> [%]	23,13
r.m.s.-Abweichungen von Idealwerten der	
Bindungslängen [Å]	0,014
Bindungswinkel [°]	1,62
r.m.s. B [Å <sup>2</sup> ]	1,59
Mittlerer B-Faktor	
Hauptkettenatome [Å <sup>2</sup> ]	34,53
Seitenkettenatome [Å <sup>2</sup> ]	36,47
Wassermoleküle [Å <sup>2</sup> ]	46,04
Anzahl der Atome in der asymmetrischen Einheit	
Proteinatome (ohne Wasserstoff)	2725
Inhibitoratome (ohne Wasserstoff)	32
Solvensmoleküle	325
Metallatome	4
(Φ, Ψ) - Winkel Verteilung im	
bevorzugten Bereich	261 (90,0 %)
zusätzlich erlaubten Bereich	27 (9,3 %)
weitläufig erlaubten Bereich	2 (0,7 %)

#### IV.4.6 Strukturbeschreibung



**Abbildung IV-27:** Stereodarstellung des Komplexes aus der katalytischen Domäne von MMP-13 (orange) in Komplex mit bovinem TIMP-2 (flieger). Die Zink- und Calciumionen sind als Kugeln dargestellt (pink, bzw. grün). Orientierung des Komplexes:

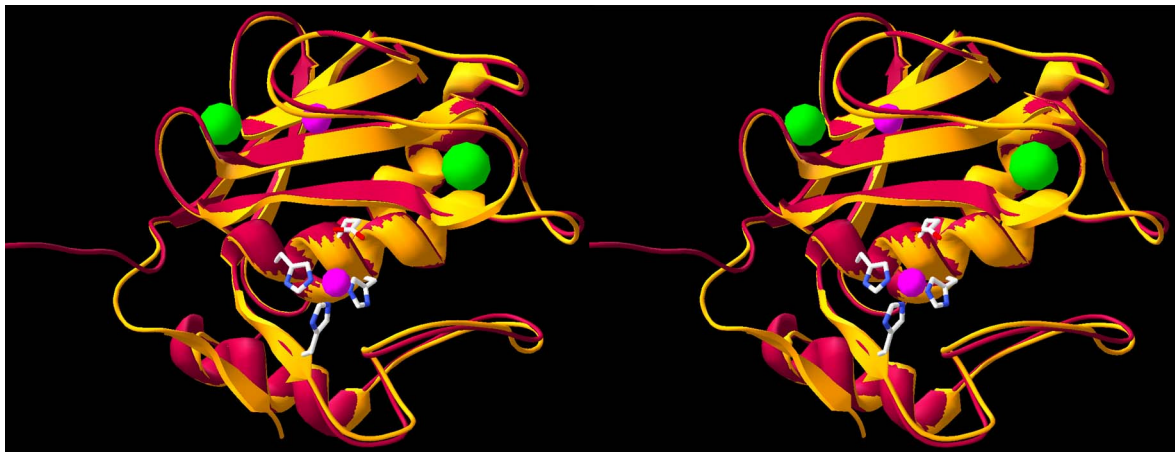
Oben: Sicht auf das  $\beta$ -Faltblatt und den *S-loop* von MMP-13. Die *active-site-cleft* zeigt nach unten.

Unten: Drehung um  $90^\circ$  nach oben und nach rechts. Die Blickrichtung ist entlang der *active-site cleft*.

##### IV.4.6.1 Katalytische Domäne von MMP-13

Die Struktur der katalytischen Domäne von MMP-13 zeigt die typische MMP-Faltung. Sie besteht aus einem fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt (mit vier parallelen und einem antiparallelen Strang) und zwei  $\alpha$ -Helices für die obere Subdomäne sowie einer  $\alpha$ -Helix und einem langen *loop* für die untere Subdomäne. Dieser *specificityloop* beginnt am Ende der '*active-site-Helix*' hA, läuft in einer weiten Spirale wieder in die Nähe des aktiven Zentrums, bildet die untere Begrenzung der *active-site cleft*, windet sich um die S1'-Tasche und mündet schließlich in der C-terminalen  $\alpha$ -Helix hC. Wie auch bei MMP-12 ähnelt die S1'-Tasche eher einem Tunnel, der sich durch die ganze MMP-13 hindurchzieht. Der restliche Raum dieser Höhlung ist mit einem Netzwerk von 8 Solvensmolekülen erfüllt, die untereinander und mit der Hauptkette von MMP-13 Wasserstoffbrücken ausbilden.

Im Gegensatz zu vielen anderen Kristallstrukturen von katalytischen Domänen von MMPs ist hier der N-Terminus sehr gut in der Elektronendichte definiert. Das liegt wahrscheinlich daran, dass die normalerweise vorhandene Flexibilität der N-terminalen Reste durch die Ausbildung einer Salzbrücke zur C-terminalen  $\alpha$ -Helix hC minimiert wird. Dabei bindet die N-terminale Aminogruppe von Tyr104 über eine Salzbrücke an die Carboxylatgruppe des hochkonservierten Asp257-Restes. Diese Art der Bindung wurde bei MMP-8 auch als Superaktivierung beschrieben (siehe dazu Kapitel II.2.4.3 und Reinemer et al., 1994). Die Anlagerung des N-Terminus an die  $\alpha$ -Helix hC wird außerdem durch die Ausbildung eines  $\beta$ -Faltblatts zwischen den ersten N-terminalen Resten und des Beginns des *specificityloops* begünstigt.

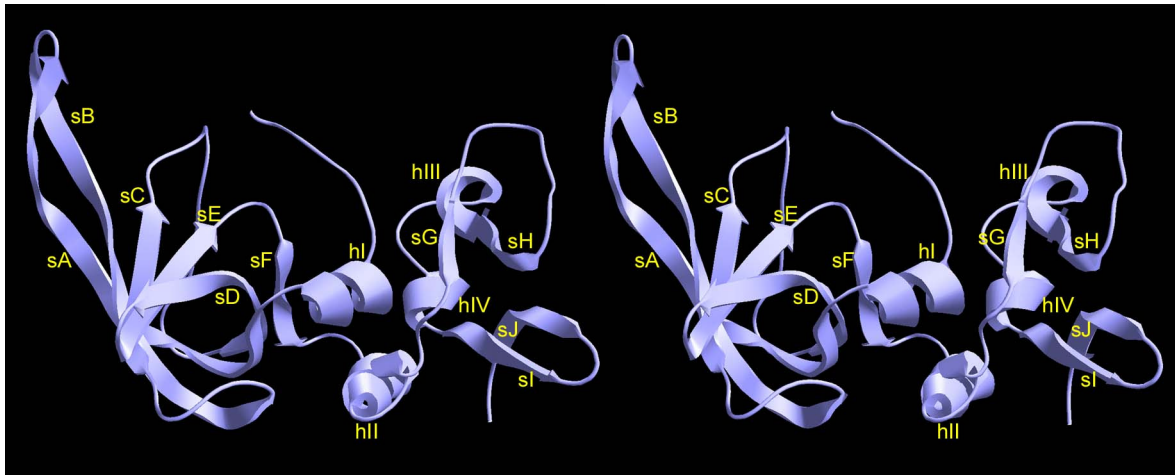


**Abbildung IV-28:** Überlagerung der katalytischen Domäne von MMP-13 aus der vorliegenden Arbeit (orange) mit der MMP-13-Struktur (rot), die mit einem LMW-Inhibitor kristallisiert wurde (pdb-Eintrag: 830c).

#### IV.4.6.2 TIMP-2

Die 180 Aminosäuren von TIMP-2 sind in zwei Domänen unterteilt. Die N-terminale Domäne, mit 110 Resten die deutlich größere, wird durch eine  $\beta$ -barrel-Struktur dominiert. Die C-terminale Domäne besteht aus einem  $\beta$ -hairpin und einem  $\beta$ -loop- $\beta$ -Motiv, das aus parallelen Strängen gebildet wird.

Insgesamt zeigt das TIMP-2 Molekül eine keilartige Form. Genau wie bei TIMP-1 bildet die Polypeptidkette mit Cys1-Ser-Cys-Ser den zentralen Teil der Keilkante des Inhibitors. Diese beiden Cysteine sind über Disulfidbrücken mit den *loops* am "unteren" Ende des  $\beta$ -barrels verbunden (Cys1-Cys72 und Cys3-Cys101). Im weiteren Verlauf bildet die Kette im Zentrum des Moleküls die erste  $\alpha$ -Helix hI, welche die Seitenketten beherbergt, die für Wechselwirkungen mit der C-terminalen Domäne verantwortlich sind (z. B. Gln9 mit den Hauptkettenstickstoffen und Sauerstoffen von Cys167). Anschließend folgt die Polypeptidkette einer kurzen Schleife, bevor sie mit Strang sA in das fünfsträngige  $\beta$ -Faltblatt mit *greek-key* Topologie eintritt, das zu einem geschlossenen  $\beta$ -barrel mit elliptischem Querschnitt gerollt ist (OB-Faltung, Gomis-Rüth et al., 1997; Williamson et al., 1994). Diese Faltung wurde erstmals bei Oligosaccharid/Oligonucleotid bindenden (OB) Proteinen entdeckt (Murzin, 1993).



**Abbildung IV-29:** Stereodarstellung von TIMP-2, gezeigt als Ribbons. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde verzichtet, die Disulfidbrücken darzustellen.

Das "untere" Ende des Fasses (jenes, das in Richtung MMP-13 zeigt) ist durch den "*connectorloop*", der die  $\beta$ -Stränge sC und sD verbindet, verschlossen.

Das erste Element des  $\beta$ -barrels ist  $\beta$ -Strang sA, welcher bei TIMP-2 über das *barrel* hinaus ein langes zweisträngiges Faltblatt mit dem unmittelbar nachfolgenden Strang sB bildet. Die beiden Stränge sind über ein  $\beta$ -hairpin miteinander verbunden. Die Kette läuft weiter zu Strang sC, welcher antiparallel zu sB liegt. Nach Strang sC wechselt die Kette mit einem  $3_{10}$  helicalen *turn* die Richtung und verbindet die Stränge sC mit sD. Dieser Strang sD ist sehr stark gebogen und befindet sich im ersten Teil zwischen den Strängen sA und sF, während er im zweiten Teil mit sF Wasserstoffbrücken bildet. Die Topologie des  $\beta$ -barrels wird durch diesen Strang sF komplettiert.

Danach verlässt die Kette das  $\beta$ -barrelmotiv und tritt über drei kurze Helices (einen weiteren  $3_{10}$ -helicalen *turn*, eine  $\alpha$ -Helix hII (die parallel zu hI liegt) und einen weiteren  $3_{10}$ -helicalen *turn*) in die C-terminale Domäne über. Dieser Teil wird durch das Cystin Cys13-Cys126 an das  $\beta$ -barrel fixiert. Daran anschließend faltet sich die Kette zu einem Motiv aus zwei Paaren von zweisträngigen  $\beta$ -Faltblättern, die über einen gestreckten *loop* mit zwei kurzen Helices miteinander verbunden sind. Das erste dieser beiden Faltblätter wird aus den beiden parallelen  $\beta$ -Strängen sG und sH gebildet, die über eine lineare Kette mit acht Aminosäuren und einen anschließenden *turn* miteinander verbunden sind. Dieses Motiv wird weiter durch die Disulfidbrücke Cys133-Cys138 zwischen  $\beta$ -Strang sG und dieser gestreckten Kette stabilisiert. Das zweite  $\beta$ -Faltblatt besteht aus den antiparallelen Strängen sI und sJ, die über einen  $\beta$ -hairpin miteinander verbunden sind. Die beiden Faltblätter sind stabilisiert über die Disulfidbrücke Cys128-Cys175, die die N-Termini der  $\beta$ -Stränge sG und sJ verbindet sowie das Cystin Cys146-Cys167 zwischen den beiden Strängen sH und sI.

Ab den Resten Arg178-Gly180 verlässt die zunehmend flexibler werdende Aminosäurekette die kompakte Oberfläche und kann ab Rest Ala181 nicht mehr in kontinuierlicher

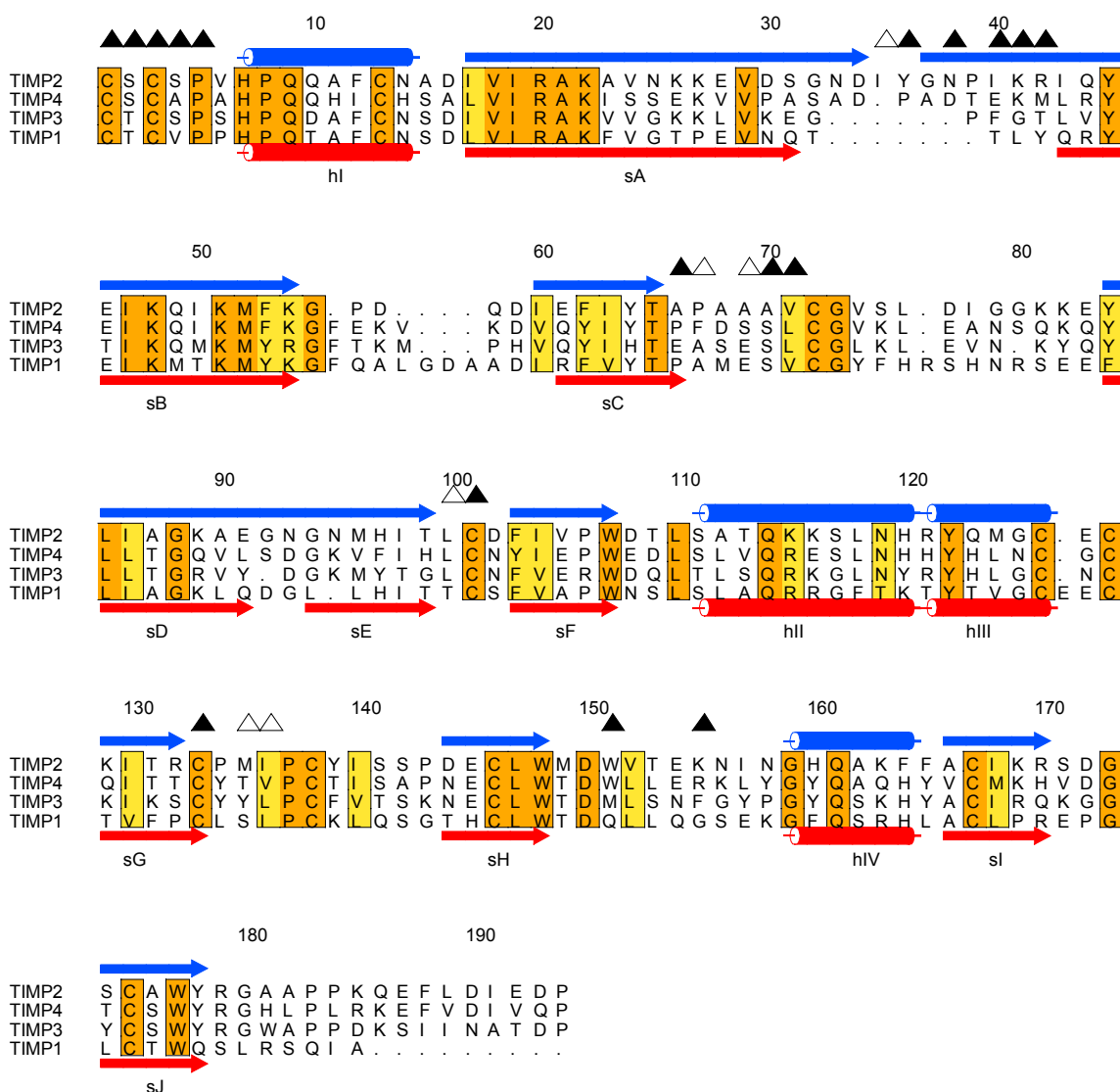


Elektronendichte verfolgt werden. Die letzten C-terminalen Reste zeigen keine definierte Konformation.

### IV.4.7 Grenzfläche zwischen MMP-13 und TIMP-2

Wie in den Komplexen aus MMP-3/TIMP-1 (Gomis-Rüth et al., 1997) und MMP-14/TIMP-2 (Fernandez-Catalan et al., 1998) werden auch hier die Kontakte zwischen den beiden Polypeptiden durch sechs Bereiche von TIMP-2 gebildet (siehe Abbildung IV-30).

Insgesamt bilden 25 Reste Kontakte innerhalb einer Distanz von 4 Å aus. Davon sind 19 Reste (76 %) in der N-terminalen Domäne lokalisiert: Das N-terminale Segment Cys1-Pro5, der *sC-connectorloop* und das verbindende Cystin Cys1-Cys72, der *sE-sF-loop* (Thr99-



**Abbildung IV-30:** Sequenzalignment der humanen TIMP-1, -3 und -4 sowie bovinem TIMP-2. Die  $\beta$ -Stränge (Pfeile) und  $\alpha$ -Helices (Zylinder) sind für TIMP-2 (oben, blau) und für TIMP-1 (unten, rot) angegeben. Reste, die an Wechselwirkungen im Abstand von weniger als 4.0 Å zur katalytischen Domäne beteiligt sind, sind mit Dreiecken gekennzeichnet (gefüllte Dreiecke: starke Wechselwirkungen, offene Dreiecke: schwächere Wechselwirkungen)

Cys101) und besonders der  $\beta$ -*hairpin* und der daran anschließende lange  $\beta$ -Strang sB (Asp34 - Arg42). In der C-terminalen Domäne sind der sG-sH-loop (Arg132, Pro134-Met135-Ile136) und Seitenketten des *loops*, der die  $\beta$ -Stränge sH und sI miteinander verbindet (Trp151 und Ile157), an der Bindung mit MMP-13 beteiligt.

Die ersten 5 Reste (Cys1 - Pro5) von TIMP-2 befinden sich in der *active-site cleft* und binden analog einem Substrat in den Bindungstaschen des aktiven Zentrums. Die Reste Cys1-Ser-Cys-Thr-Pro5 besetzen die Spezifitätstaschen P1, P1', P2', P3', und P4' und bilden mit den Peptidbindungssauerstoffen und -stickstoffen fünf Wasserstoffbrücken zur Hauptkette vom MMP-13. Cys1 komplexiert dabei mit seiner N-terminalen Aminogruppe und der Carbonylfunktion als vierter und fünfter Zinkligand neben den drei Histidinen von MMP-13 das aktive Zinkion. Außerdem bildet die Cys1-Aminogruppe schwache Wasserstoffbrücken zum Carboxylatsauerstoff O<sup>ε</sup>1 der 'katalytischen' Glutaminsäure Glu223 (N-O Distanz: 3,1 Å) und zum Carbonylsauerstoff der Amidbindung zwischen Ala70 und Val71 (N-O Distanz: 3,2 Å). Die Seitenkette von Ser2 erstreckt sich in die S1'-Tasche und bildet dabei eine Wasserstoffbrücke zum zweiten Carboxylatsauerstoff (O<sup>ε</sup>2) der Glutaminsäure des aktiven Zentrums.

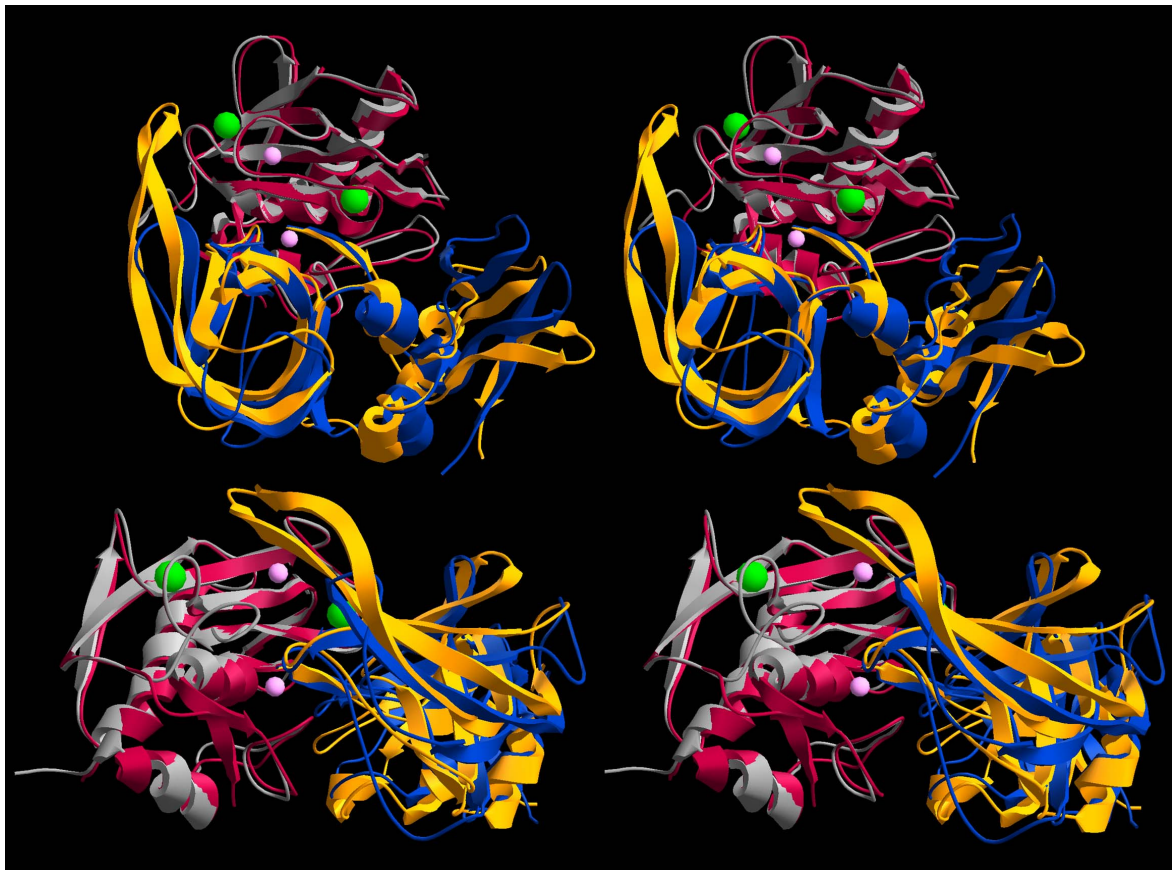


**Abbildung IV-31:** Stereodarstellung der Überlagerung des MMP-13/TIMP-2 Komplexes (rot/orange) mit dem von MT1-MMP/TIMP-2 (blau/flügel) auf Basis der C<sup>α</sup>-Atomen der katalytischen Domänen von MMP-13, bzw. MT1-MMP. Zink- und Calciumionen sind als Kugeln dargestellt (pink, bzw. grün). Zur Orientierung der Überlagerung vgl. Abb. IV-27.

Die linke Seite der *active-site cleft* wird von den Resten Ala70-Val-Cys72 ausgefüllt, die S3-Tasche mit Ala70 und die S2-Tasche mit der Seitenkette von Val71. Dieses Ala68-Val71-Segment schmiegt sich an MMP-13 auf eine solche Art und Weise an, dass sich das C<sup>β</sup> von Ala70 in den hydrophoben Hohlraum, gebildet aus den MMP-13-Seitenketten von Phe107, Pro190 und His226, drückt, während die Seitenkette von Val71 die aus den MMP-13-Seitenketten Tyr176, His187 und Phe189 gebildete Furche ausfüllt.

Ile243 des konservierten Pro-X-Tyr Segments, das die *active-site cleft* von MMP-13 nach unten begrenzt, zeigt dabei in Richtung der Pore in der TIMP-Oberfläche, die von dem N-terminalen Segment Ser4-Pro-Val6 und der direkt anschließenden  $\alpha$ -Helix hI und dem  $\beta$ -hairpin der beiden Stränge sE und sF gebildet wird.

Die lange *hairpin* Schlaufe, gebildet aus sA und sB, legt sich über den linken Rand der *active-site cleft* und reicht hinauf bis zum  $\beta$ -Faltblatt und zum *S-loop* von MMP-13. An der Spitze dieses sA-sB-loops bildet die exponierte Tyr36-Seitenkette hydrophobe Wechselwirkungen zu den Seitenketten von Asn194 und Tyr195 (sIV-sV-loop von MMP-13) aus, wobei die Phenylringe der beiden Tyrosine senkrecht aufeinander stehen. Zwei Wasserstoffbrücken werden zwischen den beiden Asparaginen Asn38 (TIMP-2) und Asn194 (MMP-13) gebildet. .



**Abbildung IV-32:** Stereodarstellung der Überlagerung des MMP-13/TIMP-2 Komplexes (rot/orange) mit dem von MMP3/TIMP-1 (silber/blau) auf Basis der C<sup>α</sup>-Atomen der katalytischen Domänen von MMP-13, bzw. MMP-3. Zink- und Calciumionen sind als Kugeln dargestellt (pink, bzw. grün). Zur Orientierung der Überlagerung vgl. Abb. IV-27.

Weitere hydrophobe Wechselwirkungen üben die Reste Ile40 und Phe175 (*S-loop* von MMP-13) aus. Eine schwache hydrophobe Interaktion bildet dieser Phe175-Rest zur Arg42-Seitenkette (Strang sA, TIMP-2), dessen Flexibilität durch intramolekulare Wasserstoffbrücken zu Glu91 eingeschränkt ist.

Trotz der relativ großen Grenzfläche zwischen den  $\beta$ -Strängen sA und sB (TIMP-2) und der MMP-13-Oberfläche sind die meisten Kontakte nicht perfekt komplementär. Das gleiche gilt für die Interaktionen der C-terminalen Domäne von TIMP-2 mit MMP-13, bei welchen der sH-sI-*loop* die Grenzfläche bildet. Dessen Rest Trp151 bildet eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff von Tyr246 und einen hydrophoben Kontakt zu Thr245 (beide *specificity-loop* von MMP-13). Weitere hydrophobe Wechselwirkungen bestehen zwischen Ile157 (auch sH-sI-*loop* von TIMP-2) und Ile243 (MMP-13) sowie zwischen Pro134 und Met135 (sG-sH-*loop* TIMP-2) einerseits und Tyr246 (*specificityloop*) andererseits. Weitere Wasserstoffbrücken werden zwischen Ile136 des sG-sH-*loops* und dem N<sup>δ</sup> von Lys249 ausgebildet, ebenso wie zwischen Arg132 (sG, TIMP-2), dem Carbonylsauerstoff von Gly213 und dem Phenyl-Sauerstoff von Tyr214.

## V DISKUSSION

### V.1 Dcp

Die genaue Lokalisation von Dcp in der Zelle ist noch nicht geklärt. Ein Teil der Aktivität wird dem Periplasma zugeordnet, wobei jedoch der größte Teil im Cytosol nachzuweisen ist (Deutch & Soffer, 1978; Henrich et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde das *dcp* Gen mit der Signalsequenz von OmpA fusioniert, wodurch Dcp ins Periplasma exportiert wird. Diese Expression verlief äußerst erfolgreich, obwohl kein Helferplasmid verwendet wurde, um die vermutete Problematik der seltenen Codons zu umgehen (Henrich et al., 1993). Die Expressionsprobleme früherer Arbeiten müssen daher einen anderen Grund haben. Eventuell ist Dcp in höheren Konzentrationen im Cytosol toxisch für die Zelle (Henrich et al., 1993) und wäre damit bei der verwendeten Expression ins Periplasma in einem für die Zelle unproblematischen Bereich.

Die Spezifität von Dcp ist der von ACE sehr ähnlich, wobei ACE zwei aktive Zentren besitzt und Dcp nur eines. Beide Enzyme sind Carboxypeptidasen und spalten C-terminal zwei Aminosäuren von Oligopeptiden ab. So z. B. vom natürlichen ACE-Substrat Angiotensin I (H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH) die Aminosäuren His-Leu. Dcp spaltet eine ganze Reihe von Substraten, jedoch keine, bei denen die Spaltstelle von zwei Glycinen flankiert wird. Die kleinsten Substrate sind N-blockierte Tripeptide. Tripeptide mit einem freien N-Terminus werden nicht hydrolysiert. Ebenso ist eine Spaltung von Substraten erschwert oder unmöglich, wenn die Spaltung vor Prolin erfolgen soll. Außerdem ist es nötig, dass das Substrat einen freien Carboxyterminus besitzt, wobei eine Umsetzung eines Substrats mit einer C-terminalen *D*-Aminosäure nicht möglich ist. Eine Inhibitionswirkung wird von Dipeptiden berichtet, besonders von solchen mit basischen Seitenketten (Deutch & Soffer, 1978). Dementsprechend wurde mit bekannten ACE-Inhibitoren ein genauerer Vergleich angestrengt.

Bei der Betrachtung der Inhibitorstrukturen stellt sich nun die Frage, welche Spezifitätstaschen des Enzyms durch die Inhibitoren belegt sind. Zwei der getesteten Inhibitoren (H-2205 und H-2215) nutzen offenbar die Unfähigkeit des Enzyms aus, vor Prolinen zu schneiden. Das Peptid bindet wahrscheinlich zunächst mit der C-terminalen Carboxygruppe an das Enzym und bindet anschließend in die weiteren Spezifitätstaschen. Die beiden C-terminalen Proline beeinträchtigen die Flexibilität der Hauptkette des Substrats so stark, dass es nicht zu einer Hydrolyse der Peptidbindung kommen kann, da das Substrat im aktiven Zentrum nicht optimal ausgerichtet ist.

Zwei weitere Inhibitoren (N-1140, H-Lys(Tfa)-Pro-OH und N-1170, H-Val-Trp-OH) nutzen einen anderen Effekt zur Hemmung von Dcp. Dcp kann Dipeptide nicht weiter prozessieren. Dies passiert wahrscheinlich im Rahmen eines Produkthemmungsmechanismus, wobei Dipeptide einfach die S1'- und S2'-Spezifitätstaschen besetzen. Vermutlich werden die Substrate zuerst am freien C-Terminus erkannt und gebunden.

Das Dipeptid N-1140 vermag Dcp nicht vollständig zu inhibieren. So beträgt die maximale Hemmung in diesen Experimenten nur 75 %. N-1140 ist ein Dipeptid (Lys-Pro), mit einer

durch Tfa geschützten Aminogruppe der Lysinseitenkette. Möglicherweise ist diese Modifikation ausschlaggebend für eine nur schwache Bindung in S1' und die damit einhergehende leichtere Verdrängung des Dipeptides von dieser Position durch ein Substrat. Lediglich bei dem Inhibitor N-1450 ist der Inhibitionsmechanismus nur schwer erklärbar. Vielleicht behindert hier die große Seitenkette des Tryptophans in Kombination mit dem folgenden Glycin eine richtige Orientierung des Inhibitors und verhindert so eine Spaltung. Oder die Carboxygruppe der Seitenkette der C-terminalen Asparaginsäure bindet statt des Hauptkettencarboxylats an das Enzym und bringt so den Inhibitor in eine Position, in der eine Hydrolyse zwischen Tryptophan und Glycin nicht möglich ist.

Während die getesteten Inhibitoren alle Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich aufweisen, liegen die Werte für Lisinopril und Captopril im nanomolaren Bereich. Die Thiofunktion von Captopril dürfte für diesen niedrigen Wert eine maßgebliche Rolle spielen.

Im Falle von ACE wurde berichtet, dass die stark inhibierende Verbindung Captopril durch NOE-Experimente mittels NMR-Spektroskopie im aktiven Zentrum nachgewiesen werden konnte, bei gleichzeitiger Bindung des Substrats (Mayer & Meyer, 2000). In diesen Experimenten wurde allerdings das synthetische Substrat fa-Phe-Gly-Gly (furylacryloyl-Phe-Gly-Gly) verwendet.

Captopril bindet voraussichtlich mit seinem C-terminalen Prolin in die S2'-Tasche, komplexiert mit seiner Thiofunktion das katalytisch aktive Zink und verhindert so das Anlagern von größeren Peptiden in die S1'- und S2'-Tasche des aktiven Zentrums. Bei oben genannten NMR-Experimenten bindet das Substrat jedoch nicht "normal" an die S1'- und S2'-Spezifitätstaschen, sondern nur in die S2- und S1-Taschen. Auch in einer solchen Konformation ist bei ACE offensichtlich die Hydrolyse von einigen Substraten möglich. Eventuell tritt ein ähnlicher Fall bei Dcp mit dem Inhibitor N-1140 und dem in dieser Arbeit beim Aktivitätstest verwendeten Substrat auf.

Ähnlich wie Captopril bindet Lisinopril vermutlich mit seinem Prolinrest in die S2'-Tasche. Die Lysinseitenkette liegt dann in der S1'- und der Phenylring in der S1-Tasche. Die verstärkte Hemmwirkung im Vergleich zu Captopril beruht wahrscheinlich auf den intensiveren Interaktionsmöglichkeiten zwischen Inhibitor und Enzym, da hier möglicherweise eine weitere Spezifitätstasche besetzt ist. Die Carboxygruppe des nichtpeptidischen Rests von Lisinopril bindet wahrscheinlich an das katalytisch aktive Zink und verstärkt weiter die Bindung des Inhibitors an Dcp.

Letztlich kann die Frage nach dem genauen Bindemodus von Substraten und Inhibitoren an das aktive Zentrum von Dcp oder ACE nur durch eine hochaufgelöste Struktur dieser Enzyme beantwortet werden. Angesichts der wachsenden Zahl von Menschen, die an Herz-Kreislaufkrankungen leiden und eine antihypertensive Therapie benötigen, welche die Dipeptidyl-Carboxypeptidase-Aktivität in Schranken hält, ist eine Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehung von Dipeptidyl Carboxypeptidase mit Inhibitoren für ein weiteres rationelles Wirkstoffdesign erforderlich.

## V.2 MMP-12

Die Kristallstruktur der katalytischen Domäne von MMP-12 zeigt zunächst ein ähnliches Faltungsmotiv wie die bekannten Strukturen anderer MMPs. Darüber hinaus aber finden sich einige strukturelle Eigenheiten, durch die sie sich von anderen MMPs unterscheidet. Diese können teilweise die Spezifität für bestimmte Substrate und Peptidspaltstellen erklären.

Ein Charakteristikum von MMP-12 ist die besondere Konformation des *S-loops*, der tiefer und näher als in anderen MMPs am  $\beta$ -Faltblatt liegt. Die besondere Konformation ist wahrscheinlich in Ala173 begründet, das ein ansonsten hochkonserviertes Prolin ersetzt. Durch die veränderte Lage des *S-loops* erstrecken sich einige seiner Seitenketten (z.B. His172) deutlich weiter in die *active-site cleft* und definieren damit die kleine hydrophobe S3-Spezifitätstasche und eine seitlich abgegrenzte hydrophobe S1-Bindungsfurche. Die S2-Bindungsstelle hat die Form einer flachen hydrophoben Fläche und ist im Gegensatz zu z. B. MMP-14 (MT1-MMP) nicht begrenzt. Die S1'-Tasche hat die Form eines Tunnels, der am oberen Ende eine hydrophobe Oberfläche besitzt, die mit zunehmender Tiefe weniger hydrophob wird. Diese abnehmende Hydrophobizität liegt unter anderem in der Präsenz von Thr215 begründet, das ein in fast allen anderen MMPs vorhandenes Val ersetzt. Eine hydrophile S2'- und hydrophobe S3'-Bindungsstelle vervollständigen die *active-site cleft*.

Die Bindungsstellen am aktiven Zentrum von MMP-12 sind derart geformt, dass in Substraten besonders Alanine an P3-Position, lange hydrophobe Seitenketten an P2- und aromatische Seitenketten an P1-Position sehr gut gebunden werden können. Die Form des S1'-Tunnels erlaubt MMP-12 nicht nur die Bindung des in aller Regel gut passenden Leucins an dieser Stelle. Modellierungsversuche zeigen, dass auch die lange Seitenkette von Arginin in diesen Tunnel passt, natürlich ohne dessen volle Länge zu nutzen. Dabei kann die Argininseitenkette Wasserstoffbrückenbindungen zu Thr215 bilden, was die einzigartige Substratspezifität von MMP-12 auch für Arginin in P1'-Position erklären könnte.

Diese beschriebenen Spezifitätscharakteristika passen auf die Ala-Met-Phe352-Leu353-Glu-Ala Sequenz um die Spaltstelle des *reactive-site-loops* von  $\alpha$ 1-PI. Außerdem ist die Umgebung des aktiven Zentrums und die Oberfläche von  $\alpha$ 1-PI in Bezug auf Oberflächenform und -ladung komplementär zueinander, was eine spezifische Bindung vermuten lässt. Diese Tatsache erklärt die hohe Spezifität von MMP-12 für dieses Serpin.

Durch den anderen Reaktionsmechanismus, der bei Metalloproteinasen im Gegensatz zu Serinproteinasen zugrunde liegt, können Serpine MMPs nicht inhibieren. Eine Spaltung des *reactive-site-loops* führt demnach einfach zur Inaktivierung des Serpins ohne Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität der MMP.

Bemerkenswert ist, dass bei der Inaktivierung von  $\alpha$ 1-PI ein Fragment freigesetzt wird, das ein potenter chemotaktischer Faktor für Neutrophile ist. Deshalb ist es möglich, dass zusätzlich zur inhärenten elastinolytischen Kapazität von MMP-12 der Elastinabbau durch die Spaltung des primären HLE-Inhibitors weiter gesteigert wird und weitere Neutrophile zur Stelle der Entzündung gelenkt werden. Interessanterweise kann HLE wiederum TIMPs durch Spaltung inaktivieren und damit MMP-12 vor Inhibition bewahren. Durch dieses Zusammen-

spiel kann es lokal zu einer positiven Rückkopplung kommen, was den Elastinabbau stark beschleunigt (Gronski et al., 1997).

Das Wirken verschiedener MMPs auf bestimmte Substrate ist sicherlich auch durch eine gewebespezifische Expression reguliert. MMP-12 ist die einzige MMP, die fast ausschließlich in Makrophagen exprimiert wird, in denen sie (in Mäusen) für mehr als 95 % der elastinolytischen Aktivität verantwortlich ist.

Ein weiteres MMP-12 spezifisches Charakteristikum ist sein sehr hydrophobes (und leicht basisches) Oberflächenpotential innerhalb und ausserhalb der *active-site cleft*. Es kann nur spekuliert werden, dass diese molekularen Eigenschaften von MMP-12 zu seiner Fähigkeit beitragen, Elastin abzubauen, das Geweben Elastizität verleiht.

Elastin ist ein unlösliches, in hohem Maße quervernetztes Protein, das primär aus Ala- und Pro-reichen Regionen besteht, in die Lysine eingestreut sind, deren Seitenketten die Quervernetzungen bilden. Weiterhin gibt es in Elastin sehr hydrophobe Gly-reiche Regionen, die auch Ala, Pro, Val und Leu enthalten, die zur Elastizität des Proteins beitragen. Die Hydrophobizität von Elastin würde es einzelnen Elastinketten erlauben sich in die *active-site cleft* zu lagern und gespalten zu werden. Es gibt in Elastin viele Stellen, die einer MMP-12-Spaltsequenz entsprechen und auch benutzt werden (Mecham et al., 1997).

Die hydrophobe Oberfläche von MMP-12 dürfte neben dem aktiven Zentrum noch weitere Stellen zur Bindung von Elastin aufweisen. So konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von MMP-12 durch TIMP-1 die Bindung von MMP-12 an Elastin kaum beeinträchtigt (Curci et al., 1998). Nachdem TIMP-1 bei der Bindung an MMP-12 den größten Teil der Front-Oberfläche der Elastase bedeckt, muß es Elastinbindungsstellen geben, die sich in einiger Entfernung, aber immer noch auf der katalytischen Domäne des aktiven Zentrums befinden, da ja MMP-12 seine Hämopexin-ähnliche Domäne sehr schnell autokatalytisch abspaltet.

Neben MMP-12 ist auch MMP-7 sehr effizient beim Abbau von Elastin (Mecham et al., 1997), in der Deaktivierung von  $\alpha$ 1-PI (Sires et al., 1994) und in der Angiostatin Freisetzung (Cornelius et al., 1998; Dong et al., 1997). Der Vergleich der beiden Strukturen zeigt ebenfalls gut definierte hydrophobe S3- und S1-Bindungstaschen, die aber nicht wie bei MMP-12 deutlich voneinander abgegrenzt sind. Die S2-Bindungsstelle ist ebenso eine flache, aber seitlich begrenzte Ebene, während die S1'-Spezifitätstasche, im Gegensatz zu der Situation bei MMP-12, kein durchgängiger Tunnel ist. Die S1'-Spezifitätstasche ist von mittlerer Tiefe, den Boden bildet die Seitenkette von Tyr214.

Äußerst ähnlich sind die beiden Enzyme bezüglich ihres Oberflächenpotentials und zwar nicht nur im Bereich des aktiven Zentrums, sondern auch für den Rest der Oberfläche.

Da beide Enzyme *in vivo* als isolierte katalytische Domänen agieren, könnte auch die geringe Größe dieser MMPs die Aktivität gegen hochvernetzte Substrate wie Elastin beeinflussen.

Ein Vergleich mit MMP-1 (Kollagenase-1), welches hauptsächlich fibrilläre Kollagene zerlegt, aber unfähig ist MMP-12-Substrate wie Elastin abzubauen, zeigt dann auch deutlich andere Spezifitätstaschen und Oberflächeneigenschaften. So findet man bei Kollagenase-1



keine stark begrenzten Spezifitätstaschen für die P3- und P1-Reste und eine viel stärker negativ geladene Oberfläche in der Substratbindungsregion.

Entgegen den Spezifitätserwartungen, die sich aus MMP-Sequenzvergleichen und der MMP-12-Struktur ableiten lassen, kann eine der größten MMPs, MMP-9 (Gelatinase B), auch MMP-12-Substrate spalten. So fehlt in MMP-9 das charakteristische Histidin für die S3-Spezifitätstasche und das Alanin, das für die Änderung der Konformation des *S-loops* verantwortlich ist. Gerade bei  $\alpha$ 1-PI mag die fehlende Spezifität durch Bindung des Substrats an das Enzym über seine Fibronectin-ähnlichen Domänen ausgeglichen werden. Dass  $\alpha$ 1-PI ein Schlüsselsubstrat von MMP-9 bei der Entstehung von Hautpusteln von Mäusen ist, konnte erst kürzlich gezeigt werden. Dabei wird auch hier, wie schon für MMP-12 beschrieben, zunächst  $\alpha$ 1-PI gespalten und damit eine unregelmäßige HLE-Aktivität erzeugt, die dann zum Abbau von Kollagen XVII führt. Auf diese Art und Weise ist MMP-9 indirekt für die Bildung von Hautpusteln verantwortlich (Liu et al., 2000).

Die beschriebenen individuellen Eigenheiten der MMP-12 Struktur sollten bei Einbeziehung der beschriebenen Spezifitätstaschen von P3 bis P1 als Ausgangspunkte für die Entwicklung von spezifischen MMP-12 Inhibitoren dienen und wären vor allem in der Emphysemtherapie von größter Wichtigkeit.

### V.3 MMP-16

MMP-16 (MT3-MMP) gehört zu den MT-MMPs, die ebenso wie MT1-, MT2- und MT5-MMP über eine Transmembranhelix und eine cytosolische Domäne an die Zelloberfläche gebunden sind (im Gegensatz zu MT4- und MT6-MMP, die über einen GPI-Anker immobilisiert sind). Die Kristallstruktur der katalytischen Domäne von MT3-MMP zeigt die für MMPs typische Faltung und ist nach der von MT1-MMP die zweite Kristallstruktur einer membranständigen MMP.

Ein bedeutender Unterschied der "klassischen" MMPs zu den MT-MMPs liegt in dem verlängerten *loop*, der  $\beta$ -Strang sII mit sIII verbindet (MT-*loop*). Die Funktion dieses *loops* ist noch relativ unklar, jedoch wird eine zentrale Bedeutung bei der Aktivierung von ProMMP-2 vermutet (English et al., 2001; Fernandez-Catalan et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass alle vier MT-MMPs mit Transmembranhelix in der Lage sind, ProMMP-2 zu aktivieren (Pei, 1999a; Sato et al., 1994; Takino et al., 1995; Will et al., 1996). In einem allgemein akzeptierten Modell fungiert eine durch TIMP-2 inhibierte, membranständige MT1-MMP als Rezeptor für die Hämopexin-ähnliche Domäne von ProMMP-2 (Butler et al., 1998). Dieser ternäre Komplex wird einer zweiten, nichtinhibierten MT1-MMP präsentiert, was zur Aktivierung von ProMMP-2 führt. Der Mechanismus ist jedoch noch nicht genau verstanden. Die Dimerisierung von MT1-MMP scheint aber eine entscheidende Rolle zu spielen (Itoh et al., 2001).

Der Unterschied, der bei der Betrachtung einer Überlagerung beider MT-MMP-Strukturen zunächst ins Auge fällt, liegt in der voneinander abweichenden Konformation des MT-*loops* beider MMPs. Trotz der fehlenden Elektronendichte an der Spitze des MT-*loops* von MT3-MMP, die ein Zeichen seiner inhärenten Flexibilität ist, ist dieser Loop eindeutig in Richtung des aktiven Zentrums gebogen und kommt somit eher in Reichweite der Bindung an große Substratmoleküle. Dieser *loop* ist bei MT3-MMP um eine Aminosäure kürzer als in MT1-MMP. Außerdem unterscheiden sie sich in der Ladungsverteilung ihrer Seitenketten. Während MT1-MMP ein eher ausgeglichenes Verhältnis von Säuren und Basen in der Sequenz enthält (YIREGHEKQAD), liegen diese bei MT3-MMP eher sortiert vor. So folgen auf zwei Glutaminsäuren ein Lysin und Arginin, ferner folgen darauf wiederum zwei Asparaginsäuren (ELENGKRDVD; Saure Aminosäuren einfach und basische zweifach unterstrichen).

Die Substratbindungstaschen der *active-site cleft* von MT3-MMP weisen einige kleine Besonderheiten im Vergleich zu denen von MT1-MMP auf. So ist die S3-Tasche in MT3-MMP im Gegensatz zu der von MT1-MMP nach links nicht begrenzt, die S2-Tasche hingegen weist eine engere Begrenzung auf, so dass hier Reste mit kürzeren Seitenketten bevorzugt sein dürften. Außerdem weist die S2-Bindungsstelle von MT3-MMP ein etwas stärker negativ geladenes Oberflächenpotential auf als MT1-MMP. Die S1-Tasche zeigt nur geringe Unterschiede. So ist sie bei MT3-MMP wenig profiliert und im Vergleich zu der von MT1-MMP etwas nach rechts verschoben. Der gravierendste Unterschied der beiden Spezifitätstaschen liegt in der Form der S1'-Tasche. Während diese Tasche in MT1-MMP, wie in den meisten MMPs, ein offener Tunnel ist, der sich durch das ganze Enzym erstreckt,

so ist dieser Tunnel in MT3-MMP an seinem unterem Ende von der Seitenkette von Met271 blockiert. Das C<sup>α</sup> dieses Methionins liegt auch in MT1-MMP an der selben Stelle, jedoch liegt dort die Seitenkette in einer anderen Konformation vor, so dass die S1'-Tasche in MT1-MMP ein offener Tunnel bleibt. Die S2'-Tasche ist in MT3-MMP etwas enger als die von MT1-MMP und die S3'-Tasche ist in beiden Enzymen eine unstrukturierte Ebene, die jedoch in MT3-MMP ein stärker negativ geladenes Oberflächenpotential aufweist.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Strukturen liegt in der Geometrie des aktiven Zentrums. Bei MT3-MMP ist die Spalte, in die sich eine Substratkette legen muß, um prozessiert zu werden, etwas schmaler als in MT1-MMP. Wahrscheinlich liegt die Ursache jedoch in der Bindung von unterschiedlichen Inhibitoren der beiden MT-MMPs. Die Kristallstruktur von MT1-MMP liegt als Komplex mit TIMP-2 vor, während MT3-MMP den kleinen synthetischen Inhibitor Batimastat im aktiven Zentrum gebunden hat. So ist anzunehmen, dass in der MT1-Struktur der Inhibitor TIMP-2 das *wall-forming segment* durch Bildung von Wasserstoffbrücken (z.B. vom Hauptkettenstickstoffatom von Cys3 (TIMP-2) zum Carbonylsauerstoff von Pro259 (MT1-MMP)) näher an das aktive Zentrum zieht. Bei MT3-MMP können zu Batimastat nicht so viele Wasserstoffbrücken ausgebildet werden, weil im Inhibitor nicht so viele Donor- und Akzeptormöglichkeiten vorhanden sind.

Abgesehen vom MT-*loop* liegen weitere größere Unterschiede zwischen den beiden bekannten MT-MMP-Strukturen in der Konformation des sV-hB-*loops*. Bei MT3-MMP verläuft dieser in einer gleichmäßigen großen Spirale im Uhrzeigersinn von β-Strang sV zur α-Helix hB, während diese Spirale bei MT1-MMP (vielleicht durch Kristallkontakte) sehr stark deformiert und nach oben gebogen ist.

Weiterhin ist die Carboxygruppe des C-terminalen Prolins (Pro292) von MT3-MMP mit einer Wasserstoffbrückenbindung an Pro164 (hAsII-*loop*) fixiert. In MT1-MMP zeigt der C-Terminus jedoch in Richtung der verlängerten α-Helix hC.

Die einzige bislang beschriebene Spaltstelle von MT-MMPs bei der Aktivierung von ProMMP-2 wurde für MT1-MMP bestimmt und liegt bei Ser-Cys-Asn66/-Leu67-Phe-Val (Murphy, 2001; Strongin et al., 1993). Das entspricht dem *loop* zwischen der ersten und zweiten α-Helix, der aus drei Helices bestehenden Prodomäne von MMP-2.

Docking Experimente der katalytischen Domäne von MT3-MMP mit ProMMP-2 bestätigen die Komplementarität der Spaltstelle zwischen Asn66 und Leu67. Dabei würden die beiden Reste, welche die Schnittstelle flankieren, die S1- (Asn66) bzw. S1'-Spezifitätstaschen und die benachbarten Reste Phe68 und Val69 die S2', bzw. S3'-Bindungstaschen besetzen. Die Reste, die sich in der Nähe der Schnittstelle in Richtung N-Terminus befinden, binden wahrscheinlich nicht optimal in die S2-, bzw. S3-Taschen, da das Cys65 eine Disulfidbrücke zu Cys60 bildet. Deshalb dürfte der *loop* an dieser Stelle einen scharfen Bogen beschreiben und im aktiven Zentrum binden nur die Reste Cys65-Asn-Leu-Phe-Val69. In diesem Modell können weitere Interaktionen beim S-*loop* von MMP-2 beobachtet werden, der sich in die Furche links unterhalb der *active-site cleft* von MT3-MMP anschmiegt. Diese Furche wird durch die C-terminale α-Helix hC und dem *specificityloop* gebildet. Ferner sind in dieser

Orientierung weitere intensive Kontakte durch eine Anlagerung der  $\alpha$ -Helix h2 der Prodomäne von MMP-2 in eine Furche rechts unterhalb der *active-site cleft* möglich. Diese Furche wird durch den *specificityloop* gebildet und nach oben durch den unteren Rand der *active-site cleft*-Begrenzung limitiert.

Eine Überlagerung dieses modellierten Komplexes mit Vollängen-MMP-1 lässt vermuten, dass weitere Interaktionen zwischen der Hämopexin-ähnlichen Domäne von MT3-MMP mit ProMMP-2 (Hämopexin-ähnliche und katalytische Domäne) bestehen. Die Hämopexin-ähnliche Domäne von MT3-MMP würde demnach genau in den Raum passen, der von der Hämopexin-ähnlichen Domäne (Propellerblatt Nr. 1 und Nr. 2), der Fibronektin-ähnlichen Domäne Nr. 3 und einem Teil der Prodomäne ( $\alpha$ -Helix h3) von ProMMP-2 begrenzt wird.

In der beschriebenen Anordnung ergeben sich eine Reihe von konstruktiven Interaktionen von Oberflächenelementen und Ladungseigenschaften. Es gibt an keiner Stelle Interaktionen, die gegen das vorgestellte Modell sprechen. Ein ungeklärter Faktor ist natürlich die Nähe und Lage des gesamten Komplexes zur Zelloberfläche. Der Abstand der katalytischen Domäne einer MT-MMP zur Zellmembran ist, da noch keine Kristallstruktur einer Vollängen-MT-MMP einschließlich der Transmembranhelix vorliegt, nur schwer abzuschätzen. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass es zu weiteren Interaktionen des Komplexes mit der Zelloberfläche kommen kann.

Es ist auch noch nicht endgültig geklärt, ob der Aktivierungsmechanismus in einem Schritt mit nur einer Spaltung innerhalb der Prodomäne durch eine externe Proteinase abläuft und die Aktivierung anschließend (intermolekular) autokatalytisch abläuft, oder ob es ein mehrstufiger Prozess ist, in dessen Verlauf die Prodomäne durch MT-MMPs mit mehreren Spaltungen regelrecht zerlegt wird. Einige Indizien sprechen für die erste Variante, jedoch konnte der Weg über die Aktivierung mit mehreren Spaltungen durch eine externe Proteinase bisher nicht ausgeschlossen werden (Nagase, 1997).

Das oben beschriebene Modell der Aktivierung sieht keine direkte Interaktion mit dem MT-*loop* vor. Es ist jedoch unumstritten, dass dieser *loop* eine Rolle spielt (English et al., 2001). Kinetische Untersuchungen ergaben eine Abhängigkeit der Aktivierungsgeschwindigkeit von Mutationen im MT-*loop*, wobei eine Deletion der Reste Pro163-Tyr-Ala-Tyr-Ile-Arg-Glu-Gly zu einer Verringerung der Aktivierungsgeschwindigkeit um 50 % führte. Unter den Punktmutationen verlor besonders die Tyr164Ser-Variante an Aktivität. Interessanterweise befinden sich die Reste His171-Glu-Lys, die keinen Effekt in der Deletionsstudie ergaben auf der Seite des MT-*loops*, welcher der *active-site cleft* zugewandt ist. Genauso interessant ist, dass sich Tyr164, dessen Mutation einen signifikanten Effekt zeigte, auf der Seite des MT-*loops* befindet, die der *active-site cleft* abgewandt ist und in Richtung  $\alpha$ -Helix hA zeigt. Aus diesen Befunden kann auf eine sterische Verzerrung der MT3-Struktur geschlossen werden, die auftritt, wenn der größte Teil des MT-*loops* deletiert wird. Allerdings wirft die Rolle von Tyr164 neue Fragen zum Mechanismus der ProMMP-2 Aktivierung auf.

Wenn man nun nach der ersten eine zweite Spaltung postuliert, in der sich die ProMMP-2 so umorientiert, dass die Sequenz Gly-Leu-Pro84-/Gln85-Thr-Gly in der *active-site cleft* liegt,

dann kann sich statt  $\alpha$ -Helix h1 die Helix h2 der Prodomäne in die Furche unterhalb der *active-site cleft* von MT3-MMP legen, und die Hämopexin-ähnliche Domäne von ProMMP-2 käme in Reichweite des *MT-loops* von MT3-MMP. Dabei würden Interaktionen zwischen dem *MT-loop* und dem Propellerblatt Nr. 4 möglich, sowie zwischen dem MT3-MMP *S-loop* und Propellerblatt Nr. 1 der ProMMP-2 Hämopexin-ähnlichen Domäne. In dieser Anordnung, die anhand von *Docking* Experimenten als sterisch sinnvoll erachtet werden kann, würde die Hämopexin-ähnliche Domäne von MT3-MMP keinen weiteren Beitrag zur Bindung von ProMMP-2 liefern. Auch ist Pro-MMP-2 dann von der Zelloberfläche deutlich weiter entfernt als in der anderen Orientierung.

Dieses Modell der Spaltung zwischen Pro84-/-Gln85 (ProMMP-2) widerspricht nicht der Erkenntnis eines neuen Mechanismus der ProMMP-2 Aktivierung, die ohne die Beteiligung eines TIMP-Moleküls abläuft. So kann MT2-MMP ProMMP-2 *in vivo* auch ohne das Zusammenspiel mit TIMP-2 aktivieren (Morrison et al., 2001).

## V.4 MMP-13/TIMP-2

Brustkrebs gehört zu den häufigsten krebsbedingten Todesursachen bei Frauen und ist insgesamt die dritthäufigste Todesursache. In Europa wird jährlich bei annähernd 384 000 Frauen neu Brustkrebs diagnostiziert, und 165 000 von ihnen werden im laufenden Jahr an Brustkrebs sterben. Bei etwa der Hälfte der Brustkrebs-Patientinnen bilden sich nach der Erstbehandlung Metastasen. Nach deren Diagnostizierung beträgt die durchschnittliche Lebenserwartung noch 18 bis 30 Monate. Diese drastischen Zahlen verdeutlichen die Dringlichkeit, viel mehr über Brustkrebs, seine molekularen Ursachen und die beteiligten Enzyme und Proteine zu erfahren, als es im Moment der Fall ist. MMP-13 wurde erstmals aus Brustkrebszellen isoliert und gilt nach eingehenden Untersuchungen als Marker für eine schlechte Überlebensprognose.

Die Kristallstruktur von MMP-13 im Komplex mit TIMP-2 könnte einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Wechselwirkungen von MMPs auf der einen Seite und den TIMPs auf der Anderen liefern.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die Kristallstruktur von MMP-13 im Komplex mit TIMP-2 beschrieben. Zwischenzeitlich wurde auch die Kristallstruktur der katalytischen Domäne von humanem MMP-13 mit kleinen synthetischen Inhibitoren veröffentlicht (Lovejoy et al., 1999). Ein Vergleich der Strukturmodelle der beiden katalytischen Domänen zeigt keine größeren Abweichungen. Die mittlere Standardabweichung der C<sup>α</sup>-Atome der Strukturen von rmsd = 0,58 Å belegt dies. Auffallende Unterschiede liegen in der Konformation des *specificityloops*. Im Bereich des *wall-forming-segments* (Pro242-Ile-Tyr) liegen die Hauptkettenatome des MMP-13/TIMP-2-Komplexes so, dass die *active-site cleft* etwas enger wird (im Mittel: 0,88 Å). Die Ursache dafür könnte darin liegen, dass die zwei katalytischen Domänen unterschiedliche Inhibitoren gebunden haben. In der MMP-13-Struktur von Lovejoy und Mitarbeitern (Lovejoy et al., 1999) ist MMP-13 durch ein kleines Hydroxamsäure-Derivat inhibiert, während MMP-13 der vorliegenden Arbeit TIMP-2 im aktiven Zentrum gebunden hat. Während die Haupt- und Seitenkettenstickstoffe und -Sauerstoffe von TIMP-2 eine ganze Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können, bildet das Hydroxamsäure-Derivat nur zwei Wasserstoffbrücken aus und kann deshalb die *active-site cleft* nicht so stark fixieren wie TIMP-2. Beim Vergleich der MT-MMP-Strukturen in Kapitel V.3 wird ein ähnliches Verhalten erkennbar. Dort ist MT1-MMP durch TIMP-2 inhibiert und zeigt eine enge *active-site cleft*, während MT3-MMP durch den kleinen synthetischen Inhibitor Batimastat gehemmt ist und ein etwas aufgeweitetes aktives Zentrum zeigt.

Neben einer kleinen Konformationsänderung des sV-hB-loops liegt ein weiterer wesentlicher Unterschied der Strukturmodelle der beiden MMP-13-Domänen in der Lage der N-terminalen Reste. Während das N-terminale Tyr104 von MMP-13 in der vorliegenden Arbeit eine intramolekulare Salzbrücke zum Asp257 der C-terminalen  $\alpha$ -Helix hC ausbildet, eine Salzbrücke, die ursächlich mit der sogenannten Superaktivierung in Verbindung gebracht wird (Reinemer et al., 1994), ist dies in der Struktur von Lovejoy und Mitarbeitern nicht der Fall. Im Gegen-

satz zu deren Struktur bilden die N-terminalen Reste hier außerdem eine  $\beta$ -Faltblattstruktur zum ersten Teil des *specificityloops* aus.

Ein weiterer Unterschied der beiden MMP-13-Strukturen liegt in der etwas anderen Konformation der Spitze des *S-loops*. Der Grund dafür ist hier wahrscheinlich in der Komplexierung der katalytischen Domäne durch TIMP-2 zu suchen. Die Seitenkette von Phe175 des *S-loops* bildet hydrophobe Wechselwirkungen aus Ile40 des *sB-loops* des TIMP-2-Moleküls und zieht so den *S-loop* nach links vorne in Richtung des aktiven Zentrums und zeigt damit eine weitere Adaptationsmöglichkeit von MMPs an TIMPs außerhalb des aktiven Zentrums.

Keine bemerkenswerten Unterschiede liegen in der Konformation der S1'-Spezifitätstasche vor. Der synthetische Inhibitor mit seiner langen hydrophoben Kette, die sich tief in die S1'-Tasche erstreckt, bildet nur zwei Wasserstoffbrücken aus, die nicht in der Spezifitätstasche liegen. Er ist somit nicht in der Lage, die Architektur dieser Tasche nennenswert zu beeinflussen.

Ein Vergleich des MMP-13/TIMP-2 Komplexes mit der einzigen anderen bisher gelösten Komplexstruktur mit TIMP-2 (MT1-MMP/TIMP-2) zeigt einen etwas anderen Bindungsmodus. Hier ist das TIMP-2, das an MMP-13 gebunden ist, im Vergleich zur anderen Struktur deutlich nach unten geneigt (mit dem katalytischen Zinkion als Drehpunkt, Abbildung IV-31). TIMP-2 im Komplex mit MMP-13 ist zudem im Gegen-Uhrzeigersinn gedreht. Dieser Bindungsmodus sorgt dafür, dass die Spitze des *sA-sB-loops* nicht so weit auf die Oberläche von MMP-13 reichen kann, wie das im Komplex mit MT1-MMP der Fall ist. Dort liegt die Spitze dieses *loops* in einer Furche, die vom *MT-loop* und *sIV-sV-loop* gebildet wird. Bei MMP-13/TIMP-2 liegt die Spitze über dem *sIV-sV-loop* und bildet nur wenige Kontakte aus, wie schon bei MT1-MMP/TIMP-2 beobachtet. Trotz seiner Länge und Flexibilität scheint dieser *loop* nur eine untergeordnete Rolle bei der starken Bindung von TIMP-2 an MMPs zu spielen.

Auf den ersten Blick überlagern die beiden isolierten TIMP-2-Moleküle sehr gut (rmsd = 1,6 Å, bei 180 C $^{\alpha}$ -Atomen). Eine größere Abweichung ist bei dem *loop*, der die  $\beta$ -Stränge *sC* und *sD* verbindet (bei Leu76 bis Lys81) zu beobachten. In der Komplexstruktur mit MT1-MMP beschreibt die Hauptkette an dieser Stelle einen Knick nach unten in Richtung der katalytischen Domäne von MT1. Der Grund für diesen Knick bleibt jedoch unklar, da eine Interaktion mit MT1-MMP bei einer Entfernung von 13 Å ausgeschlossen werden kann. Die Hauptkette der MMP-13/TIMP-2-Struktur verläuft an dieser Stelle ohne Knick und bildet zwischen Gly80 und dem Carbonyl-Sauerstoff des benachbarten Ala23 ( $\beta$ -Strang *sA*) eine Wasserstoffbrücke aus.

Ein weiterer augenfälliger Unterschied liegt in der etwas anderen Konformation eines Teils des *sA*-Strangs. Hier verläuft die Kette zwischen Lys26 und Asn33 so, dass es zu einer Art "frameshift" kommt. Die C $^{\alpha}$ -Atome der Aminosäuren Val24 bis Ser31 (im MMP-13/TIMP-2-Komplex) liegen an den Positionen der darauffolgenden Aminosäure (im MT1-MMP/TIMP-2-Komplex). Da der *sA*-Strang auf der Seite von TIMP-2 liegt, die der katalytischen Domäne abgewandt ist, ist ein direkter Einfluß von MMP-13 bzw. MT1-MMP auf die Bindung unwahrscheinlich und zeigt eher die Möglichkeiten zur Adaptation von TIMP-2 an unterschiedliche MMPs.

Ein weiterer Unterschied der beiden TIMP-2-Komplexe besteht in der verschiedenen Konformation des *sG-sH-loops*. Dieser liegt im Komplex mit MMP-13 im Mittel 3,5 Å näher an der katalytischen Domäne. Durch die Anordnung des *specificityloops* von MMP-13 können Wasserstoffbrücken zwischen dem Carbonylsauerstoff von Ile136 (TIMP-2) und Lys249 (MMP-13) ausgebildet werden, die dann den ganzen *loop* in eine andere Konformation drängen.

Ein Vergleich des MMP-13/TIMP-2-Komplexes mit MMP-3/TIMP-1 betont die enge Verwandtschaft, die unter den MMPs und den TIMPs herrscht. MMP-13 und MMP-3 überlagern mit nur kleineren Abweichungen im *sV-hB*- und im Spezifitäts-*loop* sehr gut. Die größte Abweichung der Strukturen der beiden katalytischen Domänen liegt in der Lage der N-terminalen Reste. Während dieser bei MMP-13, wie oben beschrieben eine Salzbrücke zur  $\alpha$ -Helix hC ausbildet, ist dies bei MMP-3 nicht der Fall. Dort beschreibt der N-Terminus einen Bogen und endet in der Nähe der Spitze des *sA-sB-loops* von TIMP-1. Allerdings werden keine Wasserstoffbrücken gebildet, die die N-terminalen Reste dort verankern könnten, sondern nur hydrophobe Kontakte.

Der auffälligste Unterschied der beiden TIMPs ist der deutlich kürzere *sA-sB-loop*. Dieser reicht im Falle von TIMP-1 nicht bis hinauf zum  $\beta$ -Faltblatt der katalytischen Domäne, bildet aber mit der Spitze des *loops* hydrophobe Wechselwirkungen zu den Seitenketten des *S-loops* und des N-Terminus.

Interessanterweise ist die Lage der N-terminalen Domäne von TIMP-2 im MMP-13/TIMP-2-Komplex ähnlicher zu der von TIMP-1 im MMP-3/TIMP-1-Komplex als der Lage von TIMP-2 im MT1-MMP/TIMP-2-Komplex. Dies könnte als ein Indiz gewertet werden, dass die Bindung an eine MT-MMP eine höhere Beweglichkeit des TIMP-Moleküls relativ zu seinem N-terminalen Peptid erfordert. Das Vorliegen zusätzlicher Wechselwirkungen im Bereich des *sA-sB-loops* im MT1-MMP/TIMP-2-Komplex deutet auch darauf hin, dass der *sA-sB-loop* bei dieser Anpassung hilfreich sein könnte.

Die Lage der C-terminalen Domäne von TIMP-2 im MMP-13/TIMP-2-Komplex ähnelt hingegen mehr der Lage der entsprechenden Domäne im MT1-MMP/TIMP-2-Komplex. Bindungsstudien mit N-terminalen Domänen von TIMPs deuten an, dass die Interaktion der C-terminalen Domäne von TIMPs mit MMPs in der Regel keinen entscheidenden Einfluss auf die Dissoziationskonstante hat. Deswegen dürfte es sich bei den beobachteten Unterschieden um eine Anpassung der C-terminalen Teile an die Oberfläche der jeweils gebundenen MMP handeln.

Genauere Aussagen zur Lage der C-terminalen Domäne eines TIMP-Moleküls ließen sich erst bei Aufklärung der Struktur eines TIMPs im Komplex mit einer vollständigen MMP (einschließlich Hämopexin-ähnlicher Domäne) gewinnen.



## VI LITERATUR

- Allan, J. A., Docherty, A. J., Barker, P. J., Huskisson, N. S., Reynolds, J. J. & Murphy, G. (1995). Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochemical Journal* **309**, 299-306.
- Ayad, S. E. & Boot-Handford, R. (1998). *The Extracellular Matrix Factsbook*. 2nd edit, Academic Press, London.
- Bachmann. (1972). Pedigrees of some mutant strains of Escherichia coli K12. *Bacteriological Reviews* **36**, 525-557.
- Banda, M. J. & Werb, Z. (1981). Mouse macrophage elastase. Purification and characterization as a metalloproteinase. *Biochemical Journal* **193**(2), 589-605.
- Banyai, L., Tordai, H. & L., P. (1996). Structure and domain-domain interactions of the gelatin binding site of human 72-kilodalton type IV collagenase (gelatinase A, matrix metalloproteinase 2). *Journal of Biological Chemistry* **271**(20), 12003-12008.
- Bertaux, B., Hornebeck, W., Eisen, A. Z. & Dubertret, L. (1991). Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *Journal of Investigative Dermatology* **97**(4), 679-685.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. & Engler, J. A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **4**(2), 197-250.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1522.
- Bodden, M. K., Harber, G. J., Birkedal-Hansen, B., Windsor, L. J., Caterina, N. C., Engler, J. A. & Birkedal-Hansen, H. (1994). Functional domains of human TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases). *Journal of Biological Chemistry* **269**(29), 18943-18952.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F.-X. & Stöcker, W. (1993). Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Letters* **331**(1-2), 134-40.
- Bode, W., Reinemer, P., Huber, R., Kleine, T., Schnierer, S. & Tschesche, H. (1994). The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. *EMBO Journal* **13**(6), 1263-9.
- Browner, M. F., Smith, W. W. & Castelhana, A. L. (1995). Matrilysin-Inhibitor Complexes - Common Themes Among Metalloproteases. *Biochemistry* **34**(20), 6602-6610.
- Brünger, A. T. (1992a). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**(6359), 472-475.
- Brünger, A. T. (1992b). *X-PLOR Version 3.1. A System for Crystallography and NMR*, Yale University Press, New Haven, CT.
- Brünger, A. T. (1993). Assessment of Phase Accuracy by Cross Validation: the Free R Value. Methods and Applications. *Acta Crystallographica Section D* **49**, 24-36.

- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography and NMR systems (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D* **54**, 905-921.
- Butler, G. S., Butler, M. J., Atkinson, S. J., Will, H., Tamura, T., Vanwestrum, S. S., Crabbe, T., Clements, J., Dortho, M. P. & Murphy, G. (1998). The Timp-2 Membrane Type 1 Metalloproteinase "Receptor" Regulates the Concentration and Efficient Activation of Progelatinase A - A Kinetic Study. *Journal of Biological Chemistry* **273**(2), 871-880.
- Carter Jr., C. W. & Carter, C. W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *Journal of Biological Chemistry* **254**, 12219-12223.
- Cawston, T. E. (1996). Metalloproteinase Inhibitors and the Prevention of Connective Tissue Breakdown. *Pharmacology and Therapeutics* **70**(3), 163-182.
- CCP4. (1994). The CCP4 Suite: Collaborative Computational Project, Number 4. *Acta Crystallographica Section D* **50**, 760-763.
- Chandler, S., Cossins, J., Lury, J. & Wells, G. (1996). Macrophage Metalloelastase Degrades Matrix and Myelin Proteins and Processes a Tumour Necrosis Factor-Alpha Fusion Protein. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. **228**(2), 421-429.
- Cheung, H.-S., Wang, F.-L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F. & Cushman, D. W. (1980). Binding of Peptide Substrates and Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme. Importance of the COOH-Terminal Dipeptide Sequence. *Journal of Biological Chemistry* **255**(2), 401-407.
- Conlin, C. A. & Miller, C. G. (1995). Dipeptidyl Carboxypeptidase and Oligopeptidase A from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Methods in Enzymology* **248**, 567-579.
- Cornelius, L. A., Nehring, L. C., Harding, E., Bolanowski, M., Welgus, H. G., Kobayashi, D. K., Pierce, R. A., Steven, D. & Shapiro, S. D. (1998). Matrix metalloproteinases generate angiostatin: Effects on neovascularization. *Journal of Immunology*. **161**(12), 6845-6852.
- Curci, J. A., Liao, S. X., Huffman, M. D., Shapiro, S. D. & Thompson, R. W. (1998). Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *Journal of Clinical Investigation*. **102**(11), 1900-1910.
- Dean, D. D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P., Howell, D. S. & Woessner, J. F. (1989). Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *Journal of Clinical Investigation* **84**(2), 678-685.
- Desrochers, P. E., Jeffrey, J. J. & Weiss, S. J. (1991). Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) expresses serpinase activity. *Journal of Clinical Investigation* **87**(6), 2258-2265.
- Deutch, C. E. & Soffer, R. L. (1978). *Escherichia coli* mutants defective in dipeptidyl carboxypeptidase. *Biochemistry* **75**(12), 5998-6001.
- Dong, Z., Kumar, R., Yang, X. & Fidler, I. J. (1997). Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* **88**(6), 801-10.
- Edman, P. & Henschen, A. (1975). *Sequence determination. Protein Sequence determination.*, 2nd Edition, Springer Verlag, Heidelberg.

- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate Bond and Angle Parameters for X-ray Protein-Structure Refinement. *Acta Crystallographica Section A* **47**, 392-400.
- Engh, R. A., Huber, R., Bode, W. & Schulze, A. J. (1995). Divining the serpin inhibition mechanism: a suicide substrate 'springe'? *Trends in Biotechnology* **13**(12), 503-510.
- English, W. R., Holtz, B., Vogt, G., Knäuper, V. & Murphy, G. (2001). Characterisation of the role of the MT-Loop'; an eight amino acid insertion specific to progelatinase A (MMP2) activating membrane-type matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* [epub ahead of print].
- Esnouf, R. M. (1997). An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *Journal of Molecular Graphics* **15**, 132-134.
- Ewald, P. P. (1921). Das "reziproke Gitter" in der Strukturtheorie. *Z. Kristallogr.* **56**, 491-500.
- Faber, H. R., Groom, C. R., Baker, H. M., Morgan, W. T., Smith, A. & Baker, E. N. (1995). 1.8 Å crystal structure of the C-terminal domain of rabbit serum haemopexin. *Structure* **3**(6), 557-559.
- Fernandez-Catalan, C., Bode, W., Huber, R., Turk, D., Calvete, J. J., Lichte, A., Tschesche, H. & Maskos, K. (1998). Crystal-Structure of the Complex formed by the Membrane Type-1-Matrix-Metalloproteinase with the Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2, the soluble Progelatinase-A Receptor. *EMBO Journal* **17**, 5238-5248.
- Fosang, A. J., Last, K., Knäuper, V., Murphy, G. & Neame, P. J. (1996). Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Letters* **380**(1-2), 17-20.
- Freije, J. M., Diez-Itza, I., Balbin, M., Sanchez, L. M., Blasco, R., Tolivia, J. & Lopez-Otin, C. (1994). Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *Journal of Biological Chemistry* **269**(24), 16766-16773.
- Friedrich, W., Knipping, P. & Laue, M. (1912). *Sitzungsberichte der mathematisch-physikalischen Klasse der Königlichen Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München*.
- Frishman, D. & Argos, P. (1995). Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* **23**(4), 566-79.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Analytical Biochemistry* **182**(2), 319-326.
- Gomis-Rüth, F. X., Gohlke, U., Betz, M., Knäuper, V., Murphy, G., López-Otín, C. & Bode, W. (1996). The helping hand of Collagenase-3 (MMP-13): 2.7 Å crystal structure of its C-terminal Haemopexin-like domain. *Journal of Molecular Biology* **264**, 556-566.
- Gomis-Rüth, F.-X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. & Bode, W. (1997). Mechanism of Inhibition of the Human Matrix Metalloproteinase Stromelysin-1 By Timp-1. *Nature* **389**(6646), 77-81.
- Grams, F., Crimmin, M., Hinnes, L., Huxley, P., Pieper, M., Tschesche, H. & Bode, W. (1995a). Structure Determination and Analysis of Human Neutrophil Collagenase Complexed With a Hydroxamate Inhibitor. *Biochemistry* **34**(43), 14012-14020.
- Grams, F., Reinemer, P., Powers, J. C., Kleine, T., Pieper, M., Tschesche, H., Huber, R. & Bode, W. (1995b). X-Ray Structures of Human Neutrophil Collagenase Complexed With Peptide Hydroxamate and Peptide Thiol Inhibitors - Implications For Substrate

- Binding and Rational Drug Design. *European Journal of Biochemistry* **228**(3), 830-841.
- Gravallese, E. M., Darling, J. M., Ladd, A. L., Katz, J. N. & Glimcher, L. H. (1991). In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. *Arthritis & Rheumatism* **34**(9), 1076-1084.
- Green, D. W., Ingram, V. M. & Perutz, M. F. (1954). The structure of hemoglobinIV. Sign determination by isomorphous replacement method. *Proc. Roy. Soc. Sect. A* **225**, 287-307.
- Greene, J., Wang, M., Liu, Y. E., Raymond, L. A., Rosen, C. & Shi, Y. E. (1996). Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Journal of Biological Chemistry* **271**(48), 30375-30380.
- Gronski, T. J., Martin, R. L., Kobayashi, D. K., Walsh, B. C., Holman, M. C., Huber, M., Van Wart, H. E. & Shapiro, S. D. (1997). Hydrolysis of a Broad Spectrum of Extracellular Matrix Proteins by Human Macrophage Elastase. *Journal of Biological Chemistry* **272**(18), 12189-12194.
- Gross, J. & Lapiere, C. M. (1962). Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: A Tissue Culture Assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **48**(6), 1014-1022.
- Hauptmann, H. & Karle, J. (1953). *Solution of the phase problem. I. The centro-symmetric crystal.*, 3, Polycrystal Book Service, Pittsburgh.
- Hautamaki, R. D., Kobayashi, D. K., Senior, R. M. & Shapiro, S. D. (1997). Requirement for Macrophage Elastase for Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *Science* **277**(5334), 2002-2004.
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. & Iwata, K. (1992). Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Letters* **298**(1), 29-33.
- Hendrickson, W. A. (1991). Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science* **254**, 51-58.
- Henrich, B., Becker, S., Schroeder, U. & Plapp, R. (1993). *dcp* Gene of *Escherichia coli*: Cloning, Sequencing, Transcript Mapping, and Characterization of the Gene Product. *Journal of Bacteriology* **175**(22), 7290-7300.
- Hoof, R. W. W., Vriend, G., Sander, C. & Abola, E. E. (1996). Errors in Protein Structures. *Nature* **382**, 272ff.
- Hoppe, W. (1957a). Die Faltmolekülmethode: eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen. *Acta Crystallographica* **10**, 750-751.
- Hoppe, W. (1957b). Die Faltmolekülmethode und ihre Anwendung in der röntgenographischen Konstitutionsanalyse von Biflorin. *Zeitschrift für Elektrochemie* **61**, 1076-1083.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Crystallographica* **19**, 353-356.
- Hunt, S. W., Harris, E. S., Kellerman, S. A. & Shimizu, Y. (1996). T-Lymphocyte Interactions with Endothelium and Extracellular Matrix. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **7**, 59-86.

- Huntington, J. A., Read, R. J. & Carrell, R. W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* **407**, 923-926.
- Itoh, Y., Takamura, A., Ito, N., Maru, Y., Sato, H., Suenaga, N., Aoki, T. & Seiki, M. (2001). Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO Journal* **20**(17), 4782-4793.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography* **24**, 409-411.
- Jiang, W. & Bond J.S. (1992). Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Letters* **312**, 110-114.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica Section A* **47**, 110-119.
- Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strindberg, B. E., Hart, R. C. & Davies, D. R. (1960). Structure of myoglobin; a three-dimensional Fourier synthesis at 2Å resolution. *Nature* **185**, 422-427.
- Kiefersauer, R., Than, M. E., Dobbek, H., Gremer, L., Melero, M., Strobl, S., Dias, J. M., Soulimane, T. & Huber, R. (2000). A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes. *Journal of Applied Crystallography* **33**, 1223-1230.
- Kleine, T., Bartsch, S., Blaser, J., Schnierer, S., Triebel, S., Valentin, M., Gote, T. & Tschesche, H. (1993). Preparation of active recombinant TIMP-1 from *Escherichia coli* inclusion bodies and complex formation with the recombinant catalytic domain of PMNL-collagenase. *Biochemistry* **32**(51), 14125-14131.
- Knäuper, V. & Murphy, G. (1998). *Membrane-Type Matrix Metalloproteinases and Cell Surface-Associated Activation Cascades for Matrix Metalloproteinases*. Matrix Metalloproteinases (Parks, W. C. & Mecham, R. P., Eds.), Academic Press, London.
- Knäuper, V., Osthues, A., DeClerck, Y. A., Langley, K. E., Blaser, J. & Tschesche, H. (1993a). Fragmentation of Human Polymorphonuclear-Leucocyte Collagenase. *Biochemical Journal* **291**, 847-854.
- Knäuper, V., Wilhelm, S. M., Seperack, P. K., DeClerck, Y. A., Langley, K. E., Osthues, A. & Tschesche, H. (1993b). Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin. *Biochemical Journal* **295**, 581-586.
- Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Teramoto, T., Okabe, M. & Mimura, T. (1988). Isolation of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor from Tuna Muscle. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **155**(1), 332-337.
- Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **24**(5), 946-50.
- Krüger, A., Soeltl, R., Sopov, I., Kopitz, C., Arlt, M., Magdolen, V., Harbeck, N., Gansbacher, B. & Schmitt, M. (2001). Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Research* **61**(4), 1272-1274.
- Labat-Robert, J., Bihari-Varga, M. & Robert, L. (1990). Extracellular Matrix. *FEBS Letters* **268**, 386-393.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lamzin, V. S. & Wilson, K. S. (1997). *Automated refinement for protein crystallography*. Macromolecular Crystallography (Carter, C. W. & Sweet, R. M., Eds.), Macromolecular Crystallography Vol 277, Academic Press, New York.
- Lark, M. W., Bayne, E. K., Flanagan, J., Harper, C. F., Hoerner, L. A., Hutchinson, N. I., Singer, I. I., Donatelli, S. A., Weidner, J. R., Williams, H. R., Mumford, R. A. & Lohmander, L. S. (1997). Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *Journal of Clinical Investigation* **100**(1), 93-106.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 283-291.
- Leonhardt, H. (1990). *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, Volume 8, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Leslie, A. G. W. (1991). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. In *CCP4 and ESF-EACMB Newsletters on Protein Crystallography* (Leslie, A. G. W., ed.), Daresbury, Warrington UK.
- Liu, Z., Zhou, X. Y., Shapiro, S. D., Shipley, J. M., Twining, S. S., Diaz, L. A., Senior, R. M. & Werb, Z. (2000). The serpin alpha 1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell* **102**(5), 647-655.
- Lovejoy, B., Welch, A., Carr, S., Luong, C., Broka, C., Hendricks, R., Campbell, J., Walker, K., Martin, R., Van Wart, H. & Browner, M. (1999). Crystal structures of MMP-1 and -13 reveal the structural basis for selectivity of collagenase inhibitors. *Nature Structural Biology* **6**(3), 217-221.
- Maskos, K. (1995). The bifunctional alpha-amylase/trypsin inhibitor from Ragi: Three-dimensional structure, inhibitory properties and oxidative folding in vivo and in vitro. Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.
- Mauch, S. (2000). Untersuchungen zur biologischen Rolle der Matrixmetalloproteinase MMP-19. Dissertation, Universität Konstanz.
- Mayer, M. & Meyer, B. (2000). Mapping the Active Site of Angiotensin-Converting Enzyme by Transferred NOE Spectroscopy. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**, 2093-2099.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *European Journal of Biochemistry* **189**, 1-23.
- McRee, D. E. (1993). *Practical Protein Crystallography*, Academic Press, New York.
- Mecham, R. P., Broekelmann, T. J., Fliszar, C. J., Shapiro, S. D., Welgus, H. G. & Senior, R. M. (1997). Elastin Degradation By Matrix Metalloproteinases - Cleavage Site Specificity and Mechanisms of Elastolysis. *Journal of Biological Chemistry*. **272**(29), 18071-18076.
- Melcher, A. H. & Chan, J. (1981). Phagocytosis and Digestion of Collagen by Gingival Fibroblasts in vivo. A Study of Serial Sections. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* **77**, 1-36.
- Merritt, E. A. (1999). Expanding the model: anisotropic displacement parameters in protein structure refinement. *Acta Crystallographica Section D* **55**, 1109-1117.
- Merritt, E. A. & Murphy, M. E. P. (1994). Raster3D version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D* **50**, 869-873.

- Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U., Isupov, M., Lindqvist, Y., Schneider, G. & Tryggvason, K. (1999). Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: Activation mechanism revealed. *Science* **284**(5420), 1667-1670.
- Morrison, C. J., Butler, G. S., Bigg, H. F., Roberts, C. R., Soloway, P. D. & Overall, C. M. (2001). Cellular activation of MMP-2 (Gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *Journal of Biological Chemistry* [epub ahead of print].
- Moses, M. A. (1997). The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* **15**(3), 180-189.
- Mosher, D. F., Sottile, J., Wu, C. & McDonald, J. A. (1992). Assembly of Extracellular Matrix. *Current Opinion in Cell Biology* **4**, 810-818.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro with a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335-350.
- Murphy, G. (2001). Persönliche Mitteilung.
- Murphy, G., Allan, J. A., Willenbrock, F., Cockett, M. I., O'Connell, J. P. & Docherty, A. J. (1992). The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *Journal of Biological Chemistry* **267**(14), 9612-9618.
- Murphy, G. & Knäuper, V. (1997). Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biology* **15**(8-9), 511-8.
- Murphy, G., Stanton, H., Cowell, S., Butler, G., Knäuper, V., Atkinson, S. & Gavrilovic, J. (1999). Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* **107**(1), 38-44.
- Murshudov, G. N., Lebedev, A., Vagin, A. A., Wilson, K. S. & Dodson, E. J. (1999). Efficient anisotropic refinement of Macromolecular structures using FFT. *Acta Crystallographica Section D* **55**, 247-255.
- Murzin, A. G. (1993). OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO Journal* **12**(3), 861-867.
- Nagase, H. (1997). Activation mechanisms of Matrix Metalloproteinases. *Biological Chemistry* **378**(3-4), 151-160.
- Nagase, H. & Woessner, J. F. (1999). Matrix Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* **274**(31), 21491-21494.
- Navaza, J. (1994). AMoRe: An automated package for molecular replacement. *Acta Crystallographica* **A50**, 157-163.
- Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M. & Okada, Y. (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *Journal of Biological Chemistry* **272**(4), 2446-2451.
- Oldberg, A., Antonsson, P., Hedbom, E. & Heinegard, D. (1990). Structure and Function of Extracellular Matrix Proteoglycans. *Biochemical Society Transactions* **18**, 789-792.
- Ondetti, M. A., Williams, N. J., Sabo, E. F., Pluscec, J., Weaver, E. R. & Kocoy, O. (1971). Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors from the Venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, Elucidation of Structure, and Synthesis. *Biochemistry* **19**(22), 4033-4039.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillations Mode. *Methods in Enzymology* **276**, 307-326.

- Overall, C. M. (1994). Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* **732**, 51-64.
- Overall, C. M. (2001). Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods in Molecular Biology* **151**, 79-120.
- Pakianathan, D. R. (1995). Extracellular Matrix Proteins and Leukocyte Function. *Journal of Leukocyte Biology* **57**, 699-702.
- Patterson, B. C. & Sang, Q. A. (1997). Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *Journal of Biological Chemistry* **272**(46), 28823-5.
- Pei, D. (1999a). Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. *Cell Research* **9**(4), 291-303.
- Pei, D., Majmudar, G. & Weiss, S. J. (1994). Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *Journal of Biological Chemistry* **267**(41), 25849-25855.
- Pei, D. Q. (1999b). Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *Journal of Biological Chemistry* **274**(13), 8925-8932.
- Pendas, A. M., Uria, J. A., Jiminez, M. G., Balbin, M., Freije, J. M. & Lopez-Otin, C. (2000). An overview of collagenase-3 expression in malignant tumors and analysis of its potential value as a target in antitumor therapies. *Clinica Chimica Acta* **291**, 137-155.
- Persson, A. V., Russo, S. F. & Wilson, B. I. (1978). A New Chromogenic Substrate for Angiotensin-Converting Enzyme. *Analytical Biochemistry* **91**, 674-683.
- Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G. & North, A. C. T. (1960). Structure of hemoglobin; a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* **185**, 416-422.
- Piez, K. A. (1997). History of extracellular matrix: a personal view. *Matrix Biology* **16**, 85-92.
- Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **23**, 283-437.
- Ratner, S. (1992). Lymphocyte Migration through Extracellular Matrix. *Invasion & Metastasis* **12**, 82-100.
- Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* **290**, 205-218.
- Reinemer, P., Grams, F., Huber, R., Kleine, T., Schnierer, S., Piper, M., Tschesche, H. & Bode, W. (1994). Structural implications for the role of the N terminus in the 'superactivation' of collagenases. A crystallographic study. *FEBS Letters* **338**(2), 227-33.
- Rosenbloom, J., Abrams, W. R. & Mecham, R. P. (1993). Extracellular Matrix 4: The Elastic Fiber. *FASEB Journal* **7**, 1208-1218.
- Rossmann, M. G. & Blow, D. M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallographica* **15**, 24-31.
- Ruoslahti, E. (1996). Brain Extracellular Matrix. *Glycobiology* **6**, 489-492.
- Saarialho-Kere, U., Kerkela, E., Jeskanen, L., Hasan, T., Pierce, R., Starcher, B., Raudasoja, R., Ranki, A., Oikarinen, A. & Vaalamo, M. (1999). Accumulation of matrilysin



- (MMP-7) and macrophage metalloelastase (MMP-12) in actinic damage. *Journal of Investigative Dermatology*. **113**(4), 664-672.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sanchez-Lopez, R., Alexander, C. M., Berhrendtsen, O., Breathnach, R. & Werb, Z. (1993). Role of Zinc-Binding- and Hemopexin Domain-Encoded Sequences in the Substrate Specificity of Collagenase and Stromelysin-2 as Revealed by Chimeric Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 7238-7247.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fidds, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M. & Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**, 687-695.
- Sato, H. & Seiki, M. (1996). Membrane-Type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) in Tumor Metastasis. *Journal of Biochemistry* **119**(2), 209-215.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. & Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* **370**(6484), 61-65.
- Schechter, I. & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **27**(2), 157-62.
- Scott, J. E. (1995). Extracellular Matrix, Supramolecular Organisation and Shape. *Journal of Anatomy* **187**, 259-269.
- Sechler, J. L., Corbett, S. A., Wenk, M. B. & Schwarzbauer, J. E. (1998). Modulation of Cell-Extracellular Matrix Interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **857**, 143-154.
- Shapiro, S. D. (2000). Animal models for chronic obstructive pulmonary disease - Age of klotho and marlboro mice. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology* **22**(1), 4-7.
- Shapiro, S. D., Kobayashi, D. K. & Ley, T. J. (1993). Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **268**(32), 23824-23829.
- Sheldrick, G. M., Schneider, T. R. (1997). SHELXL: high resolution refinement. *Methods in Enzymology* **277**, 319-343.
- Shibley, J. M., Wesselschmidt, R. L., Kobayashi, D. K., Ley, T. J. & Shapiro, S. D. (1996). Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(9), 3942-6.
- Shofuda, K., Yasumitsu, H., Nishihashi, A., Miki, K. & Miyazaki, K. (1997). Expression of three membrane-type matrix metalloproteinases (mt-mmps) in rat vascular smooth muscle cells and characterization of mt3-mmps with and without transmembrane domain. *Journal of Biological Chemistry* **272**(15), 9749-9754.
- Sires, U. I., Murphy, G., Baragi, V. M., Fliszar, C. J., Welgus, H. G. & Senior, R. M. (1994). Matrilysin is much more efficient than other matrix metalloproteinases in the proteolytic inactivation of alpha 1-antitrypsin. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **204**(2), 613-20.
- Springman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H. & van Wart, H. E. (1990). Multiple Modes of Activation of Latent Human Fibroblast Collagenase: Evidence for the Role

- of Cys73 Active-Site Zinc Complex in Latency and a Cysteine Switch Mechanism for Activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 364-368.
- Stöcker, W., Gomis-Rüth, F.-X., Bode, W. & Zwillig, R. (1993). Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. *European Journal of Biochemistry* **214**, 215-231.
- Strongin, A. Y., Marmer, B. L., Grant, G. A. & Goldberg, G. I. (1993). Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. *Journal of Biological Chemistry* **268**(19), 14033-14039.
- Takigawa, M., Nishida, Y., Suzuki, F., Kishi, J., Yamashita, K. & Hayakawa, T. (1990). Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2). *Biochemical & Biophysical Research Communications* **171**(3), 1264-1271.
- Takino, T., Sato, H., Shinagawa, A. & Seiki, M. (1995). Identification of the Second Membrane-Type Matrix Metalloproteinase (MT-MMP-2) Gene from a Human Placenta cDNA Library - MT-MMPs form a unique Membrane-Type Subclass in the MMP Family. *Journal of Biological Chemistry* **270**(39), 23013-23020.
- Thomson, J. J. (1903). *Conduction of Electricity through Gases*.
- Turk, D. (1992). Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. Dissertation, Technische Universität München.
- Udapa, E. G. & Rao, N. M. (1997). Inhibition of angiotensin converting enzyme from sheep tissues by captopril, lisinopril and enalapril. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* **34**(6), 524-528.
- Unemori, E. N., Bouhana, K. S. & Werb, Z. (1990). Vectorial Secretion of Extracellular Matrix Proteins, Matrix-degrading Proteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases by Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 445-451.
- Vaes, G., Delaisse, J. M. & Eeckhout, Y. (1992). Relative Roles of Collagenase and Lysosomal Cysteine-Proteinases in Bone Resorption. *Matrix Supplement* **1**, 383-388.
- Vallee, B. L. & Auld, D. S. (1993). Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(7), 2715-2718.
- van Wart, H. E. & Birkedal-Hansen, H. (1990). The Cysteine Switch: A Principle of Regulation of Metalloproteinase Activity with Potential Applicability to the entire Matrix Metalloproteinase Gene Family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 5578-5582.
- Vassalli, J. D., Baccino, D. & Belin, D. (1985). A Cellular Binding Site for the Mr 55000 Form of the Human Plasminogen Activator, Urokinase. *Journal of Cell Biology* **100**, 86-92.
- Vassalli, J. D. & Pepper, M. S. (1995). Tumor Biology. Membrane Proteases in Focus. *Nature* **370**(14-15).
- Walakovits, L. A., Moore, V. L., Bhardwaj, N., Gallick, G. S. & Lark, M. W. (1992). Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. *Arthritis & Rheumatism* **35**(1), 35-42.

- Watson, J. D. & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-740.
- Werb, Z. & Gordon, S. V. (1975). Elastase secretion by stimulated macrophages. Characterization and regulation. *Journal of Experimental Medicine* **142**(2), 361-377.
- Will, H., Atkinson, S. J., Butler, G. S., Smith, B. & Murphy, G. (1996). The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase a and initiates autoproteolytic activation - regulation by timp-2 and timp-3. *Journal of Biological Chemistry* **271**(29), 17119-17123.
- Williamson, R. A., Martorell, G., Carr, M. D., Murphy, G., Docherty, A. J., Freedman, R. B. & Feeney, J. (1994). Solution structure of the active domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. A new member of the OB fold protein family. *Biochemistry* **33**(39), 11745-11759.
- Woessner, J. F. (1998). The Matrix Metalloproteinase Family. In *Matrix Metalloproteinases* (Parks, W. C. & Mecham, R. P., eds.), pp. 1-14. Academic Press, London.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yoshiyama, Y., Sato, H., Seiki, M., Shinagawa, A., Takahashi, M. & Yamada, T. (1998). Expression of the Membrane-Type-3 Matrix Metalloproteinase (MT3-MMP) in Human Brain Tissues. *Acta Neuropathologica* **96**(4), 347-350.



## VII ABKÜRZUNGEN

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/w)	Gewichtsprozent
Å	Ångström ( $10^{-10}$ m)
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BA	Benzamidin
Bz	Benzyl
CB	Carbobenzoxy
cd	katalytische Domäne ( <i>catalytic domain</i> )
CV	Säulenvolumen ( <i>column volume</i> )
CCD-	<i>Charge Coupled Device-</i>
Dcp	Dipeptidyl Carboxypeptidase
DTB	4,4'-Dithiodipyridin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	<i>Extra cellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EG	Ethylenglycol
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
FM	Feuchtmasse
Gla	$\gamma$ -Carboxyglutaminsäure
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSSG	Glutathion oxidiert
GSH	Glutathion reduziert
HLE	Humane Leukozyten Elastase
IB	Inclusion Bodies
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani (Nährmedium)
LMW-	Kleinmolekül- ( <i>Low molecular weight</i> )
MMP	Matrix Metalloproteinase
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
OD	optische Dichte
PABA	p-Aminobenzamidin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglycol
r.m.s.d.	mittlere Standardabweichung ( <i>root mean square deviation</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (U/min) ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur (20°C)
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodiumdodecylsulfate</i> )
t	Zeit
T	Temperatur
TCA	Trichloressigsäure ( <i>Trichloro acetic acid</i> )
TGF- $\alpha$ (- $\beta$ )	<i>Transforming growth factor-<math>\alpha</math> (-<math>\beta</math>)</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase</i>
TM	Trockenmasse
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
Tos	Tosyl
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht