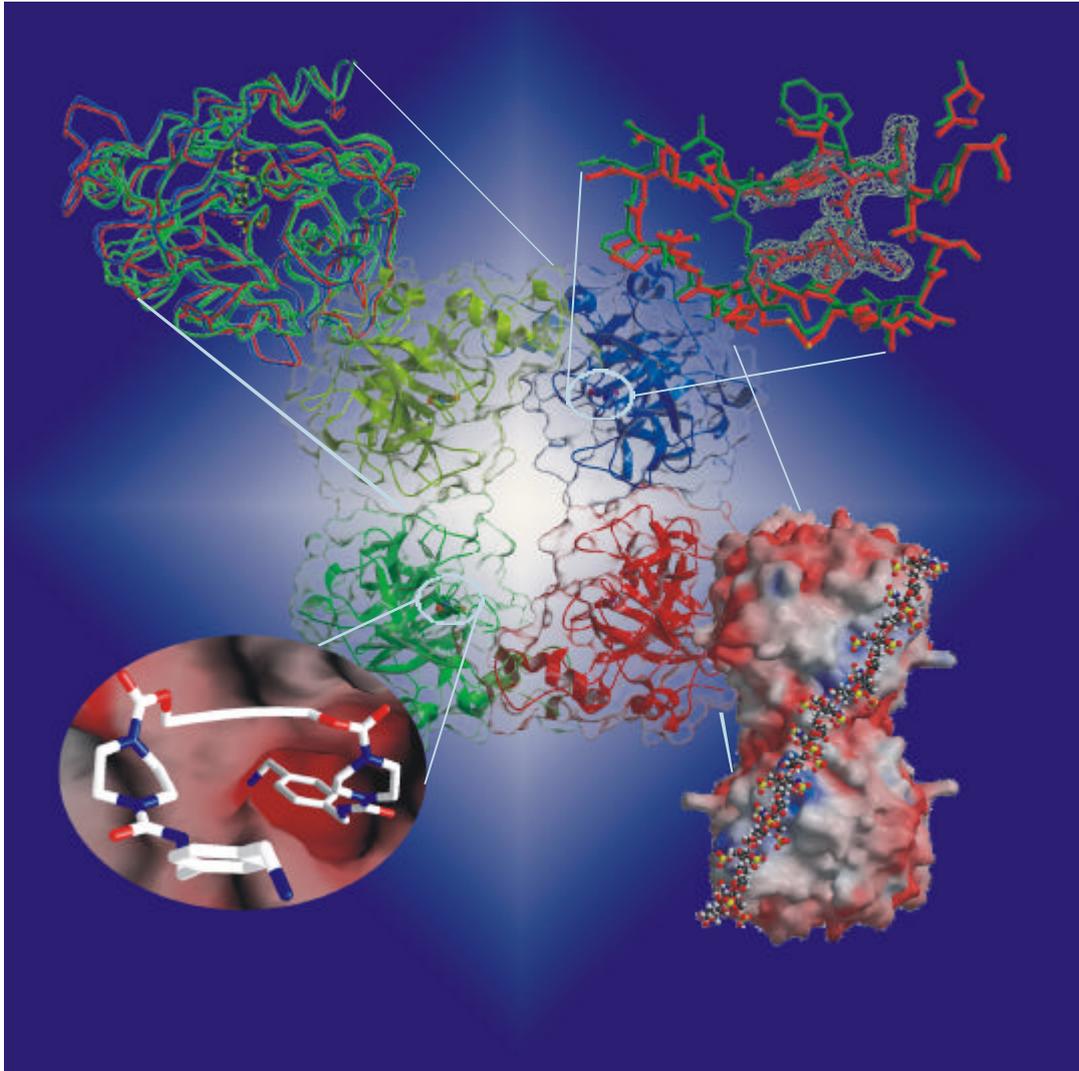


Röntgenstrukturanalyse verschiedener humaner Tryptasen, ihre funktionelle Charakterisierung und bifunktionale Inhibition



Ulf Marquardt
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung
D-82152 Martinsried

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

Röntgenstrukturanalyse verschiedener humaner Tryptasen, ihre funktionelle Charakterisierung und bifunktionale Inhibition

Ulf Marquardt

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. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation

1. apl.-Prof. Dr. Dr. h.c. Robert Huber
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher
3. apl.-Prof. Dr. Wolfram Bode,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 22.11.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 17.01.2002 angenommen.

Meinen Eltern

*Faith is a fine invention
For Gentlemen who see,
But microscopes are prudent
In an emergency.*

- Emily Dickinson -

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Strukturforschung des Max-Planck-Institutes für Biochemie in Planegg-Martinsried von September 1997 bis Oktober 2001 unter der Leitung von Herrn Direktor Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Robert Huber angefertigt.

Ihm möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine unausgesetzte Unterstützung und sein großes Interesse am Fortschritt der Arbeit danken. Seine stete Diskussionsbereitschaft, viele Anregungen und die große Freiheit bei der Arbeit haben zu einer sehr angenehmen und kreativen Arbeitsatmosphäre beigetragen, die ich nicht missen möchte.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Bode danke ich für seine Beratung bei der Verfassung von Publikationen und bei der Darstellung wissenschaftlicher Ergebnisse. Seine freundliche Unterstützung bei der Planung von Experimenten und der Initiierung von Kooperationen waren außerordentlich wertvoll bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Frank Zettl danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Aufreinigung der verschiedenen Tryptase-Isoformen. Herrn Dr. habil. Christian Sommerhoff danke ich für die Erlaubnis, in seinem Labor verschiedene Tryptase-Mutanten klonieren zu dürfen.

Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei dem gemeinsamen Tryptase-Projekt sowie für die Entwicklung der Inhibitoren BYK150640 und BYK76935 danke ich dem Projektleiter der Firma Byk-Gulden, Herrn Dr. Thomas Bär.

Herrn Dr. Norbert Schaschke und Herrn Prof. Dr. Louis Moroder danke ich für die Überlassung des Inhibitors NS222 für die Co-Kristallisation mit β -Tryptasen.

Für die Einweisung in die Operationsweise der BW6 am deutschen Elektronensynchrotron (DESY), Hamburg, danke ich Herrn Dr. Hans Bartunik und Herrn Dr. Gleb Bourenkov.

Großen Dank verdienen unsere Sekretärinnen, Frau Gina Beckmann und Frau Renate Rüller, für die Hilfe bei der Überwindung unzähliger bürokratischer Hürden, die Herren Werner Dersch, Herbert Fischer und Ottmar Paul für die Aufrechterhaltung der Funktion

vieler Geräte und die Hilfe bei technischen Sonderwünschen, sowie Frau Marianne Braun und Herr Snezan Marinkovic für die freundliche Unterstützung beim täglichen Laboralltag.

Den Mitarbeitern des Institutsrechenzentrums, insbesondere Herrn Günther Franz, möchte ich für die Bereitstellung und Wartung der elektronischen Infrastruktur danken. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Herrn Dr. Dusan Turk, Jozef Stefan Institute in Ljubljana, für die Entwicklung meines bevorzugten kristallographischen Programmes MAIN.

Bei meinen Kollegen der Abteilung Strukturforschung, insbesondere bei Dr. Gerd Bader, Dr. Hans-Georg Beisel, Dr. Andreas Bergner, Dr. Hans Brandstetter, Dr. Tim Clausen, Dr. Stephan Ehlert, Dr. Oliver Einsle, Dr. Stefan Gerhardt, Dr. Michael Groll, Stefan Henrich, Dr. Andreas Humm, Rainer Friedrich, Dr. Uwe Jacob, Daniela Jozic, Dr. Jens Kaiser, Dr. Reiner Kiefersauer, Dr. Klaus Maskos, Stefan Riedl, Marina Rubini, Dr. Kathrin Sichler, Dr. Peter Sondermann, Dr. Stefan Steinbacher, Tobias Ullrich, Dr. Markus Wahl, Drs. Sabine und Harald Wizemann und Dr. Michael Worbs bedanke ich mich für das sehr gute und kooperative Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Dr. Manuel Than für die Einführung in die rechnerische Datenauswertung und ihm und Martin Augustin für die schöne Zeit bei vielen gemeinsamen, dienstlichen und außerdienstlichen Aktivitäten.

Der Max-Planck-Gesellschaft, vertreten durch Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Robert Huber, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Sonderforschungsbereich 469 der Ludwig-Maximilians-Universität München, vertreten durch Herrn Prof. Dr. Wolfram Bode und der Firma Byk-Gulden, Konstanz, danke ich für die finanzielle Unterstützung während der Zeit meiner Dissertation.

Ein ganz spezieller Dank gilt meinen Eltern und Großeltern für ihre Unterstützung, ihre Liebe und ihr Vertrauen in schwierigen und in schönen Zeiten. Ohne sie wäre mein Lebensweg und diese Dissertation nicht möglich gewesen. Ich teile mit ihnen die Freude an dieser Arbeit.

Teile dieser Arbeit sind bzw. werden veröffentlicht :

U. Marquardt, F. Zettl, T. Bär, X. Martin, N. Schaschke, R. Huber, L. Moroder, C.P.Sommerhoff und W. Bode (2001) Crystal structures of inhibitors complexed to human β -tryptases allow to predict their binding mode from kinetic data

Manuskript in Vorbereitung

U. Marquardt, F. Zettl, R. Huber, W. Bode und C.P.Sommerhoff (2001) Human α -tryptase, an inactive serine proteinase that can be activated *via* an induced-fit mechanism

Manuskript submitted to EMBO Journal

U. Marquardt, F. Zettl, R. Huber, C.P.Sommerhoff und W. Bode (2001) The crystal structure of human alpha-I-tryptase reveals a blocked substrate binding region/specificity pocket

Manuskript submitted to EMBO Journal

N. Schaschke, G. Matschiner, F. Zettl, U. Marquardt, A. Bergner, W. Bode C.P. Sommerhoff und L. Moroder (2001) Bivalent inhibition of human β -tryptase. *Chemistry & Biology*, **8**, 313 - 327

N. Schaschke, G. Loidl, M. Groll, G. Matschiner, F.Zettl, C.P. Sommerhoff, U. Marquardt, W. Bode, R. Huber und L. Moroder (2000) Multivalent inhibition of eukaryotic proteasome und human β -tryptase. *Proceedings 26th EPS*, 65 - 60

U. Marquardt, F. Zettl¹, R. Huber, C.P. Sommerhoff und W. Bode (2000) The crystal structure of human α I-tryptase. *Annual Report of HASYLAB of the DESY, Hamburg, Part II*

U. Marquardt, F. Zettl¹, T. Bär, N. Schaschke, R Huber, L. Moroder, C.P. Sommerhoff und W. Bode (2000) Human β -Tryptase – novel bifunctional inhibitors. *Annual Report of HASYLAB of the DESY, Hamburg, Part I*

U. Marquardt, F. Zettl¹, T. Bär, R. Huber, C.P. Sommerhoff und W. Bode (2000) Crystal structure of human β III-tryptase with a novel bifunctional inhibitor. *Annual Report of HASYLAB of the DESY, Hamburg, Part II*

Kongreßberichte:

2nd General Meeting of the International Proteolysis Society associated with the International Conference on Protease Inhibitors (ICPI),

Freising, Deutschland

U. Marquardt, F. Zettl, R. Huber, C. P. Sommerhoff und W. Bode (2001) Human α I-tryptase is a serine proteinase with a dysfunctional active site

VIIth International Symposium on Proteinase Inhibitors und Biological Control

Portoroz, Slowenien

U. Marquardt, F. Zettl, R. Huber, C. P. Sommerhoff und W. Bode (2001) The crystal structure of human α I-tryptase, an inactivated proteinase

9. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kristallographie

Bayreuth, Deutschland

U. Marquardt, F. Zettl, R. Huber, C. P. Sommerhoff und W. Bode (2001) Humane α -Tryptase, die Struktur erklärt ihre Inaktivität

19th Winter School: Proteinases und their Inhibitors – Recent Developments

Tiers, Italien

U. Marquardt, F. Zettl, R. Huber, C. P. Sommerhoff und W. Bode (2001) The crystal structure of human α I-tryptase

18th Winter School: Proteinases und their Inhibitors – Recent Developments

Tiers, Italien

U. Marquardt, F. Zettl, T. Bär, R. Huber, C. P. Sommerhoff und W. Bode (2000) The crystal structure of human α Ia-tryptase: tetramer assembly und inhibitor binding

16th Winter School: Proteinases und their Inhibitors – Recent Developments

Tiers, Italien

U. Marquardt, R. Huber und W. Bode (1998) Proteinases of the Complement System

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vii
Zusammenfassung	viii
1 EINLEITUNG.....	1
2 GRUNDLAGEN DER RÖNTGENSTRUKTURANALYSE VON PROTEINEN ...	16
2.1 Einkristalle von Proteinen.....	20
2.2 Erzeugung von Röntgenstrahlung	26
2.3 Symmetrie, Einheitszelle und Raumgruppen	27
2.4 Beugung von Röntgenstrahlung am Einkristall	29
2.5 Datensammlung und Datenauswertung	33
2.6 Das Phasenproblem.....	36
2.6.1 Der Isomorphe Ersatz.....	36
2.6.2 Multiple Anomale Dispersion	40
2.6.3 Molekularer Ersatz	42
2.7 Elektronendichtemodifikation und Modellentwicklung	44
2.8 Verfeinerung des molekularen Modells.....	46
3 KRISTALLSTRUKTUREN DER TRYPTASE ISOFORMEN b IA UND b III IM KOMPLEX MIT DEN BIFUNKTIONALEN INHIBITOREN BYK150640, BYK76935 UND NS222	48
3.1 Vorbemerkungen.....	48
3.2 Materialien und Methoden.....	51
3.2.1 Klonierung und Expression.....	51
3.2.2 Selektion von niedrig glykolysierter Tryptase	54
3.2.3 Inhibition	55
3.2.4 Heparinbindung	55
3.2.5 Einengung der Tryptase-Fractionen.....	55
3.2.6 Kristallisation	56
3.2.7 Datensammlung.....	57
3.2.8 Phasierung	59
3.2.9 Modellbau und Verfeinerung	60

3.3	Ergebnisse	62
3.3.1	Proteinreinigung	62
3.3.2	Kristallisation	63
3.3.3	Datensammlung- und Auswertung.....	64
3.3.4	Kristallaufbau und Einheitszelle.....	67
3.3.5	Der β -Tryptase-Tetramer.....	70
3.3.6	Proteinsequenzanalyse der β -Tryptase-Isoformen	73
3.3.7	Struktur der β -Tryptase-Monomere	76
3.3.8	Sechs Oberflächen-“loops” als Grundlage für die Tetramer-Formation.....	79
3.3.9	Vergleich der Kristallstrukturen von β Ia- und β III-Tryptase	81
3.3.10	Inhibitoren für die β -Tryptasen	82
3.3.11	Struktur der β Ia-Tryptase im Komplex mit dem Inhibitor BYK76935	90
3.3.12	Struktur der β III-Tryptase im Komplex mit dem Inhibitor BYK150640.....	92
3.3.13	Struktur der β III-Tryptase im Komplex mit dem Inhibitor NS222	93
3.4	Diskussion.....	95
4	HUMANE αI-TRYPTASE – KRISTALLSTRUKTUR UND FUNKTIONALE CHARAKTERISIERUNG	101
4.1	Vorbemerkungen.....	101
4.2	Materialien und Methoden.....	104
4.2.1	Klonierung, Expression und Selektion niedrig glykolysierter Tryptase	104
4.2.2	Konzentration.....	104
4.2.3	Kristallisation	105
4.2.4	Datensammlung	105
4.2.5	Integration und Phasierung.....	106
4.2.6	Modellbau und Verfeinerung	107
4.2.7	HPLC-Experimente	108
4.2.8	Zymographische Studien.....	109
4.2.9	Massenspektroskopische Experimente	109
4.2.10	Kinetische Experimente.....	110
4.2.11	Modellierungs-Experimente	111
4.3	Ergebnisse	111
4.3.1	Präparation der α I-Tryptase	111
4.3.2	Heparinbindung	112
4.3.3	Kristallisation	112
4.3.4	Datensammlung, Auswertung und Modellqualität	114
4.3.5	Kristallaufbau und Einheitszelle.....	115
4.3.6	Proteinsequenzanalyse der α I-Tryptase, Vergleich zu anderen Tryptasen.....	118
4.3.7	Struktur der α I-Tryptase-Tetramere	119
4.3.8	Der α I-Tryptase-Monomer	123
4.3.9	Das „aktive“ Zentrum.....	128
4.3.10	α -Tryptase, eine aktive Proteinase?	132
4.3.11	Kinetische Untersuchungen an der α I-Tryptase.....	138
4.3.12	Aktivierungsmechanismus der α -Tryptase	139
4.3.13	Inhibition durch Zn^{2+} -Bindung.....	143

4.4	Diskussion.....	145
5	WEITERGEHENDE EXPERIMENTE UND AUSBLICK.....	152
	LITERATURVERZEICHNIS.....	157

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Konstruktion einer zusammengesetzten Lupe um 1646	1
Abb. 2: Beteiligte Zelltypen am Immunsystem.....	6
Abb. 3: Mastzellen und Basophile.....	7
Abb. 4: Prozentuale Verteilung der Asthmaerkrankungen nach Alter und Geschlecht... 	8
Abb. 5: Cortison®	9
Abb. 6: Nicht-virale Proteinase-Familien.....	11
Abb. 7: Reaktionsmechanismus Trypsin-artiger Serinproteinasen.....	12
Abb. 8: Aktivierung von Tryptasen nach ihrer Expression	15
Abb. 9: Mikroskopie und Kristallographie	17
Abb. 10: Anzahl bei der RCSB hinterlegten Proteinstrukturen.....	19
Abb. 11: Kristallwachstum aus einer übersättigten Lösung	21
Abb. 12: Präzipitatbildung im Wettbewerb zum Kristallwachstum.....	22
Abb. 13: Erfolgreich als Präzipitanz verwendete Alkohole und Salze	23
Abb. 14: Eingestellte pH-Werte für die Kristallisation	24
Abb. 15: Die Bragg'sche Gleichung	29
Abb. 16: Die Ewald-Kugel zur Konstruktion des gestreuten Röntgenstrahls	31
Abb. 17: Konstruktion der Proteinphasen beim multiplen Isomorphen Ersatz.....	38
Abb. 18: Identifizierung des Phasenwinkels α durch anomale Dispersion.....	40
Abb. 19: Vektor-Konstrukt zur Expression der Tryptase-Isoformen.....	51
Abb. 20: Expression der Tryptase-Isoformen.....	53
Abb. 21: Elutionsprofil der Kationenaustauschersäule	53
Abb. 22: SDS-Gel zur Selektion niedrig glykolysierter Tryptase-Tetramere.....	54
Abb. 23: Aufgereinigte Tryptase-Isoformen und resultierender \mathbf{b}-Tryptase-Kristall.....	63
Abb. 24: Diffraktionsbilder im Vergleich	66

Abb. 25: Kristallaufbau der b II-Tryptase-Kristalle	68
Abb. 26: Stereoabbildung des Kristallaufbaus der b III- und b Ia-Tryptase-Kristalle.....	69
Abb. 27: Der b -Tryptase-Tetramer	71
Abb. 28: Oberflächenladung der b III-Tryptase.....	72
Abb. 29: Strukturbasierter Sequenzvergleich Trypsin-artiger Proteinase.....	74
Abb. 30: Dendogramm verschiedener Tryptasen.....	75
Abb. 31: Struktureller Vergleich von b -Tryptasen mit Referenzproteinase.....	77
Abb. 32: Stereoabbildung der Interfaces im b -Tryptase Tetramer.....	80
Abb. 33: Schematische Darstellung zur Inhibition von b -Tryptasen.....	82
Abb. 34: Kinetisches Modell zur bifunktionalen Bindung	84
Abb. 35: Drei bifunktionale Inhibitoren	87
Abb. 36: Die Plazierung von BYK76935 im b Ia-Tryptase-Tetramer.....	90
Abb. 37: BYK76935 komplexiert mit b III-Tryptase.....	91
Abb. 38: Die Plazierung von BYK150640 im b III-Tryptase-Tetramer.....	92
Abb. 39: BYK150640 komplexiert mit b III-Tryptase.....	93
Abb. 40: Die Plazierung von NS222 im b III-Tryptase-Tetramer	94
Abb. 41: Einige Vertreter der „self-compartmentalizing proteases“.....	96
Abb. 42: Acht Aminosäuren können zwei benachbarte aktive Zentren verbrücken.....	99
Abb. 43: Typischer a I-Tryptase-Kristall	112
Abb. 44: Blick auf die Einheitszelle der a I-Tryptase-Kristalle.....	116
Abb. 45: Der a I-Tryptase-Monomer	118
Abb. 46: Der a I-Tryptase-Tetramer	120
Abb. 47: Die Heparin-Bindungsstelle der a -Tryptasen.....	121
Abb. 48: Der a I-Tryptase-Tetramer	123
Abb. 49: Das A-D Interface der a I-Tryptase.....	125

Abb. 50: Das A-B Interface der αI-Tryptase	127
Abb. 51: Substratbindung in β-Tryptasen	129
Abb. 52: Definition des 214-220-„loops“ in der Elektronendichtekarte	130
Abb. 53: Das 214-220-Segment blockiert die S1-Spezifitätstasche	131
Abb. 54: HPLC-Elutionsprofile	133
Abb. 55: Zymogramm	134
Abb. 56: Identifikation der Schnittstelle im BSA	136
Abb. 57: Massenspektrum nach der αI-Tryptase Behandlung von BSA	137
Abb. 58: Proteolytische Aktivität der αI-Tryptase	138
Abb. 59: Michaelis-Menten-Plot	139
Abb. 60: Strukturelle Basis der αI-Tryptase-Aktivierung	140
Abb. 61: N-Gly-Pro-Lys-C und N-Gly-Pro-Arg-C im Vergleich	142
Abb. 62: αI-Tryptase-Aktivität wird durch Zn^{2+} gehemmt	143
Abb. 63: Strukturelle Basis für die Inhibition von αI-Tryptase durch Zn^{2+}	144
Abb. 64: Bereits klonierte αI-Tryptase-Mutanten	153
Abb. 65: Fortschritte bei der Kristallisation von βIII-Tryptase-Monomeren	156

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Punkt- und Raumgruppen in der Proteinkristallographie	28
Tab. 1: Statistische Analyse der Datenauswertung	65
Tab. 3: Kinetische Kennzahlen der einzelnen Inhibitoren.....	89
Tab. 4: Statistik der Datenauswertung der αI-Tryptase-Kristalle	114

Zusammenfassung

Allergierkrankungen gewinnen in der heutigen Gesellschaft zunehmend an Bedeutung. Sie beruhen auf einer Überreaktion des körpereigenen Immunsystems, die ihren Ausdruck in verschiedenen Krankheitsbildern, wie beispielsweise Heuschnupfen oder Asthma, findet. Wesentlich beteiligt an einer allergischen Reaktion sind Mastzellen, die überall dort zu finden sind, wo sich der Körper im direkten Kontakt zur Außenwelt befindet. Nach deren Aktivierung entlassen sie den Inhalt ihrer Mastzell-Granula, der hauptsächlich aus Tryptasen besteht, in die unmittelbare Zell-Umgebung. Viele Studien lassen einen engen Zusammenhang von Tryptase-Aktivität und Asthma-Erkrankung vermuten – ein Umstand, der eine genaue strukturelle Untersuchung von Tryptasen erfordert.

Humane Mastzell-Tryptasen repräsentieren eine Unterfamilie der Trypsin-artigen Serinproteinasen. Mehrere Tryptase-Isoformen sind auf genomischer Basis identifiziert worden, unter ihnen die α -Tryptasen α I und α II und die β -Tryptasen β Ia, β Ib, β II und β III. Während die β -Tryptasen als vollständig aktive Serinproteinasen mit einer Trypsin-artigen Spezifität charakterisiert worden sind, konnte für α -Tryptasen bisher kein Substrat identifiziert werden. α -Tryptasen werden daher als inaktiv angesehen.

Im Rahmen dieser Arbeit sind Vertreter dieser beiden Tryptase-Familien strukturell und biochemisch untersucht worden.

β -Tryptasen bilden die vorherrschende Tryptase-Art in den Mastzell-Granula. Ihre wesentliche Rolle in diversen allergischen Erkrankungen macht deren selektive Inhibition zu einem wichtigen pharmakologischen Ziel. Hier werden die Kristallstrukturen der bisher ungelösten β -Tryptase-Isoformen β Ia und β III im Komplex mit den drei bifunktionalen Inhibitoren NS222, BYK76935 und BYK150640 vorgestellt. Hierbei konnte der bisher lediglich postulierte, durch Heparin-Bindung stabilisierte, rahmenartige Aufbau des β -Tryptase-Tetramers, bei dem die aktiven Zentren der vier beteiligten Monomere in die zentrale Pore zeigen, bewiesen werden. Dieses Ergebnis erklärt die Resistenz der β -Tryptase gegenüber allen endogenen Protein-Inhibitoren. Zugleich eröffnete die genaue Kenntnis der relativen Lage der aktiven Zentren die Möglichkeit, spezielle bivalente Tryptase-Inhibitoren zu entwickeln, um so deren Selektivität gegenüber anderen, Trypsin-artigen Serinproteinasen zu erhöhen. Erstmals konnte die wahrhaft bifunktionale Inhibitor-Bindung an zwei benachbarte aktive Zentren des β -Tryptase-Tetramers jeweils für NS222 und BYK150640

strukturell nachgewiesen werden. Für BYK76935 konnte ein unerwartet neuer bifunktionaler Bindungsmodus gezeigt werden. Die Kristallstrukturen der drei Inhibitoren im Komplex mit den Tryptase Isoformen liefern wertvolle Erkenntnisse für die weitere Optimierung der vorhandenen Leitstrukturen und eröffnen zusätzlich neue Perspektiven für das Design einer neuen Klasse von Tryptase-Inhibitoren. So könnten sie zusätzlich etwa für das Design von Verbindungen genutzt werden, die jeweils das aktive Zentrum und die Tryptase-charakteristische A-D „loop“-Region miteinander verbinden, was das erforderliche Molekulargewicht eines Inhibitors erheblich verringern würde. Ferner ist es gelungen, durch den Vergleich der strukturell ermittelten Bindungsmodi der einzelnen Inhibitoren mit ihren kinetischen Kennzahlen Erfahrungswerte festzulegen, die es erlauben, auch ohne Kenntnis der Kristallstruktur, wahrhaft die aktiven Zentren verbrückende Inhibitoren zu erkennen und weiterzuentwickeln.

Als Mitglied der α -Tryptasen, der vorwiegenden Tryptase-Isoform in Basophilen, ist die Struktur der α I-Tryptase gelöst worden. Sie besitzt eine ähnliche Tetramerarchitektur wie die β -Tryptasen. Interessanterweise, und im Gegensatz zu β -Tryptasen, zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, daß das α I-Tryptase-Tetramer auch ohne die Bindung von Heparin stabil ist, obwohl eine entsprechende Heparin-Bindungsstelle vorhanden ist. Strukturell liegt diese erhöhte Tetramer-Stabilität in relativ kleinen Variationen im A-B-Interface begründet. Besonders auffällig ist das aktive Zentrum der α I-Tryptase, das in einer bisher in Serinproteinasen noch nie beobachteten inaktiven Konformation vorliegt. In starkem Kontrast zu anderen Trypsin-artigen Serinproteinasen verläuft das Ser214-Gly219-Segment, das normalerweise für die antiparallele Substratbindung verantwortlich ist, zick-zack-artig quer über die Substratbindungs-Region und blockiert hierbei sämtliche Bindungstaschen für die Substrat-Reste P1 bis P4. Eine Proteinase mit einem derart deformierten „aktiven“ Zentrum ist zweifelsfrei inaktiv. Diese bisher unbeobachtete Konformation scheint im Wesentlichen durch einen einzigen Aminosäureaustausch Gly(β)216Asp(α) bedingt zu sein. Asparaginsäure 216 formt eine Wasserstoffbrückenbindung zu Serin 195 und umgeht so die elektrostatische Abstoßung durch Asparaginsäure 189 und die Carbonylgruppe des Glycins 219 am Boden der S1-Tasche, die bei einer normalen Serinproteinasen- Konformation auftreten würde.

Können α -Tryptasen aber dennoch aktiviert werden? In dieser Arbeit wird gezeigt, daß α -Tryptasen sehr wohl eine proteolytische Aktivität besitzen. Diese muß einhergehen mit einer Umordnung des inaktiven „aktiven“ Zentrums der α -Tryptasen in die typischerweise in Serinproteinasen beobachtete Konformation. Modellierungs-Experimente zeigen, daß das

ungünstige Zusammentreffen der sauren Gruppen am Boden der S1-Tasche hierbei durch die Einlagerung eines basischen P1-Restes neutralisiert wird. Mit Casein und BSA wurden erstmalig zwei, wenn auch vermutlich nicht native, Protein-Substrate der α -Tryptase identifiziert. Von den hierbei generierten Proteinfragmenten wurde die Substratspezifität der α -Tryptasen abgeleitet. Kinetische Untersuchungen mit den peptidischen Substraten N-Tosyl-Gly-Pro-Lys-pNA und N-Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA erlaubten es, diese Tryptase-Isoform als eine sehr langsame Proteinase zu charakterisieren. Es wird daher ein Mechanismus postuliert, nach dem die Substrateinwirkung, möglicherweise zusätzlich durch Interaktion mit einer Exosite, die Umlagerung der inaktiven Form der α I-Tryptase in eine proteolytisch aktive Form bewirkt. Ähnliche, aber im Detail ganz anders funktionierende „induced-fit“-Mechanismen zur Regulation proteolytischer Aktivität werden unter anderem auch für die Trypsin-artigen Serinproteinasen Gerinnungsfaktor IXa und den Komplementfaktor D diskutiert.

Um den Einfluß verschiedener Aminosäuren, durch die sich α - und β -Tryptasen unterscheiden, auf deren proteolytische Aktivität zu charakterisieren, sind eine Reihe von Mutanten hergestellt worden.

Zur Vereinfachung der sehr schwierigen Co-Kristallisation von β -Tryptasen mit Inhibitoren ist das aktive Zentrum der β -Tryptase in einen α -Tryptase-Rahmen hineinkloniert worden. Da α -Tryptasen erheblich leichter zu kristallisieren sind, erhoffen wir uns, daß dieses beschriebene Konstrukt die strukturelle Untersuchung von β -Tryptase-Inhibitor-Komplexen erheblich vereinfacht.

Zerfallen β -Tryptase-Tetramere zu Monomeren, so zeigen diese keinerlei proteolytische Aktivität, obwohl es sich bei den Monomeren ebenfalls um vollständig gereifte Proteinase handelt. Die strukturellen Grundlagen dieser Inaktivierung sind von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der Tetramerformation und der β -Tryptase-Regulation. Aus diesem Grunde wurden β III-Tryptase-Monomere kristallisiert, um sie anschließend strukturell zu untersuchen.

1 Einleitung

Seit der Fachausdruck „Biochemie“ erstmalig von E. F. Hoppe-Seyler 1877 verwendet wurde (Hoppe-Seyler, 1877), hat sich diese Wissenschaftssparte von einer Nebendisziplin zu einem vielbeachteten und wirtschaftlich wichtigen Hauptarbeitsgebiet der Naturwissenschaften entwickelt.

Die biochemische Arbeit im zwanzigsten Jahrhundert war zunächst dominiert von bakteriologischer Forschung, bevor die Suche nach Vitaminen und ihrer Funktion das Feld bereicherte. In der Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts kam die Enzymologie hinzu, und etwa zehn Jahre später richtete sich das Interesse ebenfalls auf die Gen-Forschung und schließlich auf die Neurobiologie.

Während die genaue Beobachtung der Natur als Voraussetzung für deren Erforschung früher in der Biologie noch weitgehend mit bloßem Auge erfolgen konnte, so revolutionierte die Entwicklung der Mikroskopie im 17. Jahrhundert das biologische Weltbild. Abb. 1 zeigt den schematischen Aufbau einer der ersten optischen Vergrößerungsapparaturen (Kircher, 1646).

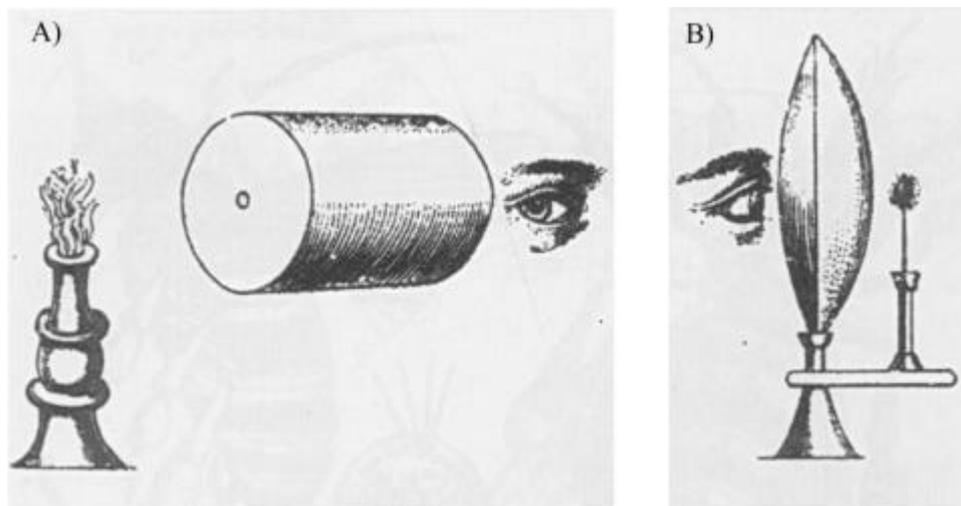


Abb. 1: Konstruktion einer zusammengesetzten Lupe um 1646

Zwei der ersten dokumentierten optischen Vergrößerungsapparate nach Andreas Kircher: *Ars magna lucis et umbrae* 1646

Die fortschreitende Entwicklung der Biochemie machte es erforderlich, dreidimensionale Informationen auch über so kleine biologische Bausteine zu erhalten, daß sie mit sichtbarem Licht nicht mehr visualisierbar waren. Viele spektroskopische Methoden ermöglichen in der Regel nur, Informationen über einzelne Parameter, wie zum Beispiel Bindungslängen- oder Bindungswinkel, zu erhalten. Für die genaue Strukturanalyse von Makromolekülen kommen heutzutage im Wesentlichen drei Methoden, die Kernresonanzspektroskopie, die Elektronenmikroskopie und die Röntgenstrukturanalyse in Frage.

Die Kernresonanzspektroskopie ermöglicht die Strukturbestimmung in wäßriger Lösung. Eine Kristallisation ist daher nicht erforderlich. Allerdings ist die Methode nur bei Molekülen bis zu einer Größe von etwa 30 kDa erfolgversprechend einsetzbar. Die Elektronenmikroskopie unterliegt in Bezug auf die Größe des zu untersuchenden Moleküls keiner Limitierung. Allerdings ist die so erzielbare Auflösung der Röntgenstrukturanalyse oft unterlegen. Diese liefert Daten bis zu atomarer Auflösung, kann bei Makromolekülen bis zu mindestens 2 MDa sinnvoll eingesetzt werden und deckt so einen Großteil der biologisch relevanten Systeme ab. Die Röntgenstrukturanalyse hat sich daher in den letzten 30 Jahren als Standardmethode zur strukturellen Untersuchung von Proteinen und Proteinkomplexen durchgesetzt. Dies ermöglichte zum einen den enormen Fortschritt auf den Gebieten der Rechentechnik und der Molekularbiologie, der einerseits das Bereitstellen großer Mengen an sauberen Proteinen vereinfachte und andererseits die erforderliche Rechenzeit erheblich verringerte. Zum anderen bildete die nun erhältliche detaillierte Information über den strukturellen Aufbau der Proteine die Grundlage beispielsweise für die Entwicklung von Medikamenten („structure based drug design“) oder von Pflanzenschutzmitteln.

Ohne die Wichtigkeit anderer makromolekularer Bestandteile der Zelle einschränken zu wollen, so nehmen Proteine heute einen zentralen Teil der biochemischen Forschung ein. Sie bestehen hauptsächlich aus den 20 proteogenen α -L-Aminosäuren, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Sowohl die sequentielle Abfolge der Aminosäuren als auch die drei-dimensionale Struktur dieser Makromoleküle bestimmen die faszinierende Anzahl ihrer Funktionen. So können Proteine als Enzyme biochemische Reaktionen katalysieren oder als Inhibitoren diese regulieren, haben Speicherungs- und Transportfunktionen und sind involviert in Kontraktionsmechanismen. Als Hormone oder als Regulatorproteine beeinflussen sie den Stoffwechsel, begleiten so den Organismus durch sein Wachstum und reagieren auf Umwelteinflüsse. Sie spielen als Antikörper eine Rolle im

Selbstverteidigungssystem der Lebewesen und können als Toxine eine giftige Wirkung entfalten. Sogar ein Frostschutzprotein bei in der Antarktis lebenden Fischen wurde entdeckt. Schließlich spielen Proteine auch als Strukturproteine eine sehr beachtete Rolle.

Die Arbeit Robert Kochs begründete die Lehre von der Spezifität pathogener Mikroorganismen für die Ätiologie der Infektionskrankheiten und führte zur Formulierung der Koch'schen Postulate durch seinen Schüler Friedrich Loeffler (Loeffler, 1884). Sie besagen, daß der Nachweis eines Mikroorganismus als Krankheitserreger erfordert es, daß dieser Erreger im erkrankten Gewebe auffindbar und aus ihm isolierbar sein muß. Mit diesem isolierten Erreger sollte dann die Krankheit im gesunden Gewebe induzierbar sein. Aufgrund dieser Theorie gelang es, durch die Verabreichung eines stark verdünnten Glycerinextraktes einer Tuberkulose-Kultur, Meerschweinchen gegen diese Krankheit zu immunisieren (Koch, 1891). Diese Erkenntnisse erlaubten den Einstieg in die Suche nach Impfstoffen gegen verschiedene Krankheiten und stellten so die Basis für das neu aufkommende Forschungsgebiet der Immunologie dar. Um den Jahrhundertwechsel injizierten Paul Portier und Charles Richet ein Antigen in einen geimpften Hund. Überraschenderweise zeigte dieser kurz darauf schwere Atemnot und war unfähig, sich zu bewegen. Es folgten Durchfall und Blutauswurf bevor der Hund verschied (Portier and Richet, 1902). Die anfängliche Interpretation dieser Symptome als ein Immunitätsverlust wurde schließlich widerlegt und im Gegenteil als überzogene Immunantwort charakterisiert.

Während es damals als überraschend galt, daß ein Verteidigungssystem eines Lebewesens bei einer Überfunktion den eigenen Organismus schwer schädigen kann, so ist heute bekannt, daß zuviel einer „guten Sache“ sehr negative Konsequenzen haben kann. Alle Vorgänge in einem Organismus sind streng reguliert. Gerät ein solches ausbalanciertes System aus dem Gleichgewicht, so kann es zur Entstehung von Krankheiten kommen. Funktioniert das Immunsystem in einem zu geringen Maße, resultieren oft Immunschwächekrankheiten. Im Falle einer Überfunktion kann es zu Hypersensitivitäten kommen, für die Clemens von Pirquet schließlich den Begriff „Allergie“ prägte (Buisseret, 1982).

Im modernen Zeitalter, wo das gesellschaftliche Leben in einer vergleichsweise sehr sterilen Umwelt stattfindet, andererseits jedoch Umwelteinflüsse verstärkt auf die Menschheit wirken, ist es zu einem sprunghaften Anstieg der allergischen Erkrankungen gekommen. Die wohl am weitesten verbreitete Allergie ist der Heuschnupfen („allergische Rhinitis“), unter der ein Großteil der Bevölkerung leidet. Allergien gegen Lebensmittel sind genauso bekannt

wie Allergien gegen Tiere oder Insektenstiche. Weiterhin häufig treten Neurodermitis, die Hausstaubmilben-Allergie und die Sonnenallergie auf. Bei sogenannten Pseudoallergien findet keine Antigen-Antikörper-Reaktion statt. Hier wirken die allergieauslösenden Substanzen wie natürlich vorkommende Amine (Histamin, Histidin, Tyramin, Tartrazin, Salizylate, Glutamat, etc.), direkt auf die Mastzellen in der Haut. Die wohl gefährlichste Allergieform ist der anaphylaktische Schock. Durch direkt in die Blutbahn gelangende Allergene kann es hier zu tödlichem Kreislaufversagen kommen.

Drastische Anstiege gab es in der letzten Zeit bei allergischen asthmatischen Erkrankungen zu verzeichnen. Etwa 5 bis 10% aller Kinder leiden unter dieser Krankheit, wobei jedoch etwa ein Drittel nach der Pubertät diese Beschwerden verliert. Allerdings erkranken 5 bis 10% der Erwachsenen neu an Asthma. Ein typisches Kennzeichen ist die Verengung der Bronchien und eine mit rasselnden und pfeifenden Geräuschen schwer gehende Atmung. Der Patient droht, in Panik zu geraten und zu ersticken.

Abb. 2 zeigt einen Ausschnitt des Immunsystems, das bei einer Überfunktion für die Auslösung dieser Allergien verantwortlich ist. In Teilbild A werden nach Erkennung eines Antigens (hier Allergen) dementsprechende IgE-Antikörper gebildet, die anschließend an die IgE-Rezeptoren auf der Mastzelloberfläche bis zu deren Sättigung binden. Wird ein Allergen nun, wie in Teilbild B gezeigt, von zwei benachbarten IgE-Antikörpern erkannt, so wird eine vielschrittige, biochemische und ultrastrukturelle Kaskade (Galli *et al.*, 1984) in der Mastzelle ausgelöst, die letztendlich zum Transport von zellulären Granula an die Zell-Oberfläche führt. Dort entlassen sie ihren aus Histaminen, Proteinasen und anderen Mediatoren bestehenden Inhalt in das umgebende Zellmedium. Diese Substanzen sind es, die, wie später noch genauer vorgestellt wird, auf vielfältige Art und Weise die allergischen Reaktionen, die von Hautrötungen bis zu Atemnotanfällen reichen, hervorrufen. Teilbild C zeigt, wie diese ausgestoßenen Moleküle den Austritt von Eosinophilen und Basophilen aus der Blutbahn fördern können und wie so auch diese Zelltypen an der Antwort des Immunsystems auf das Eindringen von Allergenen teilhaben können.

Von allen unterschiedlichen Zell-Typen, die an einer allergischen Reaktion beteiligt sein können, sind daher Mastzellen und Basophile wohl die zwei wichtigsten. Obwohl auch die in Abb.3 teilweise nicht abgebildeten B-Zellen, T-Zellen und Antigen-verarbeitende Zellen ebenfalls an der allergischen Antwort beteiligt sind, so bedeutet doch die Ausschüttung des Inhaltes der Granula der Mastzellen und Basophilen den entscheidenden Schritt zur allergischen Reaktionen. Beide Zelltypen, zuerst von P. Ehrlich im Jahre 1878, bzw. 1879

(Ehrlich, 1878) (Ehrlich, 1879) entdeckt, entstehen im Knochenmark. Während Basophile dort auch zur reifen Form heranwachsen, geschieht dies bei Mastzellen schon im Bindegewebe (Juhlin, 1963) (Galli *et al.*, 1983). Reife Basophile haben eine Lebensdauer von Tagen und zirkulieren häufig in der Blutbahn.

Mastzellen hingegen sind gleichmäßig über das gesamte Bindegewebe verteilt und treten konzentriert in der Nähe von Nerven, an den Oberflächen des Atmungs- und des gastrointestinalen Systems sowie auf der Haut auf. So sind sie überall dort vertreten, wo der Organismus mit der Umwelt in Kontakt kommt und besitzen eine Lebensdauer von mehreren Wochen (Galli *et al.*, 1984) (Selye, 1965) (Metcalf *et al.*, 1981).

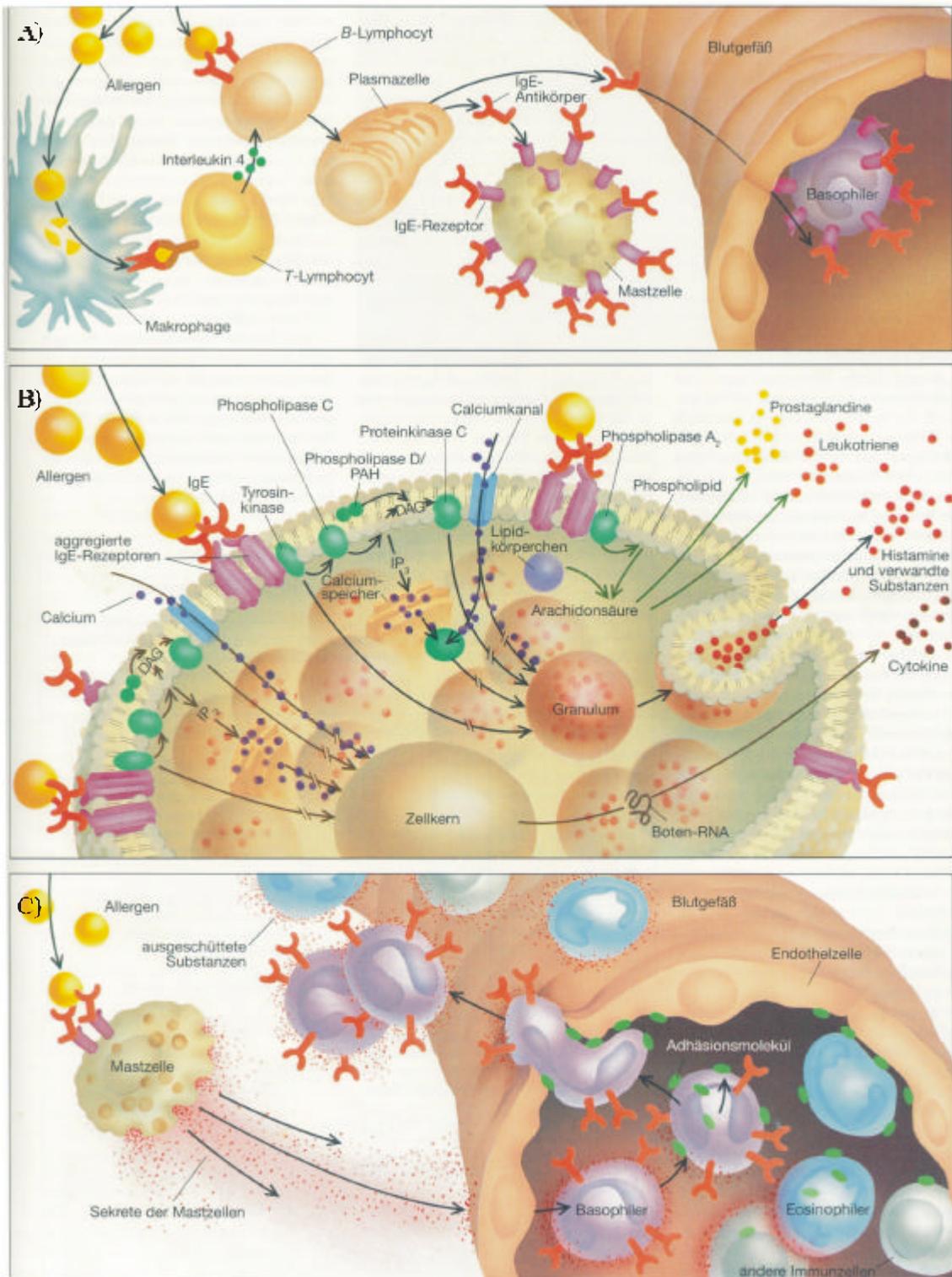


Abb. 2: Beteiligte Zelltypen am Immunsystem

Teilbild A) zeigt die Sensibilisierung einer Mastzelle auf ein spezifisches Antigen, Teilbild B) die Vorgänge innerhalb der Mastzelle nach deren Aktivierung und Teilbild C) die sogenannte „late phase“ der Immunantwort. Die Abbildung wurde erstellt in Anlehnung an die Arbeit von L.M.Lichtenstein (Lichtenstein, 1988).

Ein Vergleich von Basophilen und Mastzellen hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften zeigt, daß Mastzellen mit einem Durchmesser von 6-12 μm etwa doppelt so groß sind wie Basophile (Galli *et al.*, 1984) (Dvorak *et al.*, 1983) und daß sie viele kleine Granula verglichen zu den wenigen, aber großen Granula der Basophilen enthalten (Kawanami *et al.*, 1979) (Dvorak *et al.*, 1980a). Abb. 3 zeigt sowohl Mastzellen (A,B) als auch Basophile (C,D) jeweils vor und zehn Minuten nach ihrer Aktivierung durch ein entsprechendes Antigen.

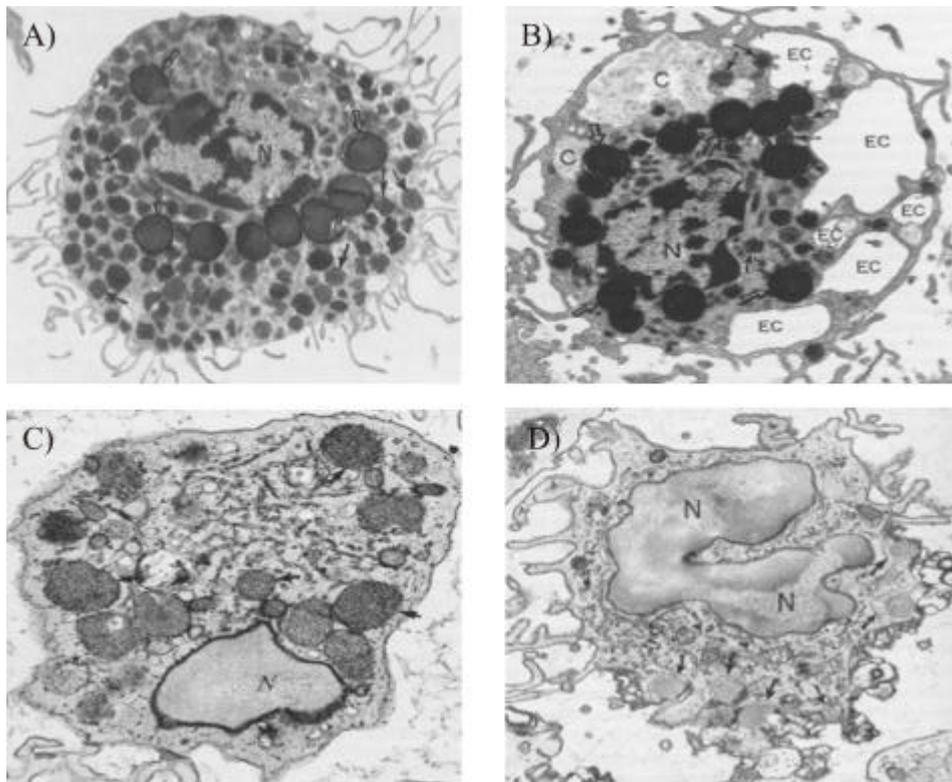


Abb. 3: Mastzellen und Basophile

Gezeigt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mastzellen und Basophilen (Galli and Lichtenstein, 1988) jeweils vor und nach ihrer Aktivierung bei 10000facher Vergrößerung. Die Pfeile deuten auf Granula, C steht für einen Degranulations-Kanal, EC für einen entleerten Degranulations-Kanal und N für den Nukleus.

Auf ultrastrukturellem Niveau verursacht die Aktivierung sensibilisierter Mastzellen und Basophiler durch das entsprechende Antigen die Fusion der die cytoplasmatischen Granula umhüllenden Membranen. Daraus resultiert die Freisetzung des Granula-Inhaltes über viele enge Verbindungen zwischen den einzelnen Granula und der Zelloberfläche

(Dvorak *et al.*, 1980b). Im Rahmen der anaphylaktischen Degranulation dieser Zelltypen fusionieren die Membranen der Granula ebenfalls mit der Plasma-Membran. Nach etwa 30 Minuten (Galli and Lichtenstein, 1988) sind die Granula, deren Inhalt im umgebenden Zellmedium die allergische Reaktion verursacht, vollständig entleert.

Abb. 4 zeigt eine statistische Erhebung der registrierten Asthmatiker in den USA im Jahre 1996. Aus dieser Statistik ist klar ersichtlich, daß Asthma alle Altersschichten der Bevölkerung erfaßt. Warum mehrheitlich Frauen an allergischem Asthma erkranken, ist nicht bekannt. Während in den USA im Jahre 1986 noch etwa 8 Millionen Asthmatiker statistisch erfaßt waren (Benatar, 1986), dokumentiert die hohe absolute Anzahl von annähernd 15 Millionen Asthmatikern im Jahre 1996 (Survey, 1996) allein in den Vereinigten Staaten den starken Anstieg dieser Erkrankungen. Dies läßt die Medikamentierung von allergischem Asthma zu einem klinisch wichtigen, attraktiven Markt werden.

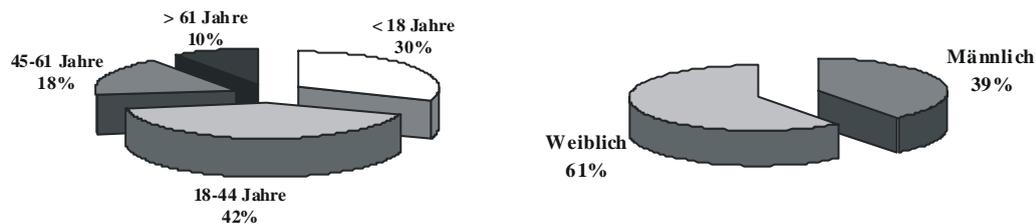


Abb. 4: Prozentuale Verteilung der Asthmaerkrankungen nach Alter und Geschlecht

Die 14.596.000 beim National Center for Health Statistics im Jahre 1996 in den USA bekannten Asthmatiker wurden statistisch nach Alter und Geschlecht untersucht.

Von den vielen, sich gegenwärtig auf dem Markt befindlichen Medikamenten zur Behandlung von Asthma ist die mit Abstand erfolgreichste Präparatgruppe die von P.S. Hensch entdeckten Glucocorticosteroide mit ihrem bekanntesten Vertreter, dem Cortison® (Hensch *et al.*, 1949) (Abb. 5).

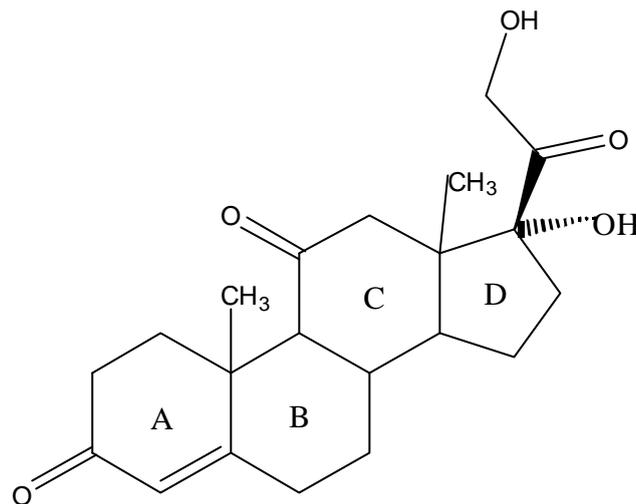


Abb. 5: Cortison®

Dargestellt ist die chemische Strukturformel des wohl bekanntesten Glucocorticosteroids, dem Cortison®.

Cortison® wirkt durch seine entzündungshemmende Wirkung sowie durch seine Eigenschaft, die Sekretion von Mediatoren der allergischen Antwort aus den Basophilen (Smith, 1980), nicht aber aus Mastzellen (Schleimer *et al.*, 1983) zu inhibieren. Weiterhin verhindert die Einnahme von Cortison® die Freisetzung von Komponenten (PAF (platelet activating factor) und Abbauprodukte der arachidonischen Säure), die direkt die Kontraktion der Atemwege verursachen, und trägt so zur Wiederherstellung der Atmungsfreiheit bei (Adcock and Garland, 1982) (Chung *et al.*, 1986).

Cortison® wäre daher ideal für die Medikamentierung von Asthma und anderen allergischen Erkrankungen, wenn mit der Einnahme von Glucocorticosteroiden nicht eine Vielzahl schwerer Nebenwirkungen einhergehen könnte. Diese reichen von Osteoporose über gastrointestinale, dermatologische, neurologische, muskuloskeletale, endokrine, metabolische und kardiovaskuläre Krankheiten bis hin zu Hypersensibilitäten, Brechreiz und Gewichtszunahme.

Ein ähnlich effektiver Weg zur Bekämpfung von asthmatischen Anfällen, der aber mit geringeren Nebenwirkungen behaftet ist, wäre daher wünschenswert. Die Entwicklung einer solchen Strategie ist Gegenstand der derzeitigen Forschung. Eine entsprechende Therapierungsstrategie soll im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt werden.

Um die Auslösung allergischer Reaktion besser verstehen zu lernen, ist es notwendig, vor dem Hintergrund der zentralen Rolle der Mastzelle im menschlichen Immunsystem, den Inhalt der Granula in den Mastzellen (Welle *et al.*, 1997) (Yong, 1997) genau zu untersuchen und auf seine physiologische Wirkung hin zu prüfen. Neben dem Histamin und anderen Mediatoren der allergischen Immunantwort sind in den Granula die Heparin-gebundenen Serinproteinasen Tryptase und Chymase enthalten (Zhang and Timmerman, 1997) (Rossi and Olivieri, 1997) (Schwartz and Austen, 1980), die nach der Mastzellaktivierung freigesetzt werden.

Tryptasen (EC 3.4.21.59) wurden zunächst mit histochemischen Methoden in Mastzellen entdeckt (Schwartz *et al.*, 1981) (Hopsu and Glenner, 1963). Dieses Enzym gehört zur Familie der Proteinase und kann bis zu 25 % des Gesamtproteingehaltes der Mastzelle und bis zu 90 % des Proteingehaltes der Mastzell-Granula ausmachen.

Proteinase sind Enzyme, die bei Erfüllung gewisser Voraussetzungen in der Lage sind, die Hydrolyse von Peptidbindungen zu katalysieren. Sie können von sehr unterschiedlicher Gestalt und Form sein und werden daher in viele einzelne Familien eingeordnet. Eine solche Einteilung ist in Abbildung 6 dargestellt. Hieraus wird ersichtlich, daß Tryptasen den Trypsin-ähnlichen Serinproteinasen zuzuordnen sind. Serinproteinasen verfügen über ein aktives Zentrum, das die drei katalytischen Aminosäuren Histidin 57, Asparaginsäure 102 und Serin 195 beherbergt. Abbildung 7 illustriert die katalytische Rolle, die diese einzelnen Reste bei der Spaltung einer Aminosäurekette inne haben.

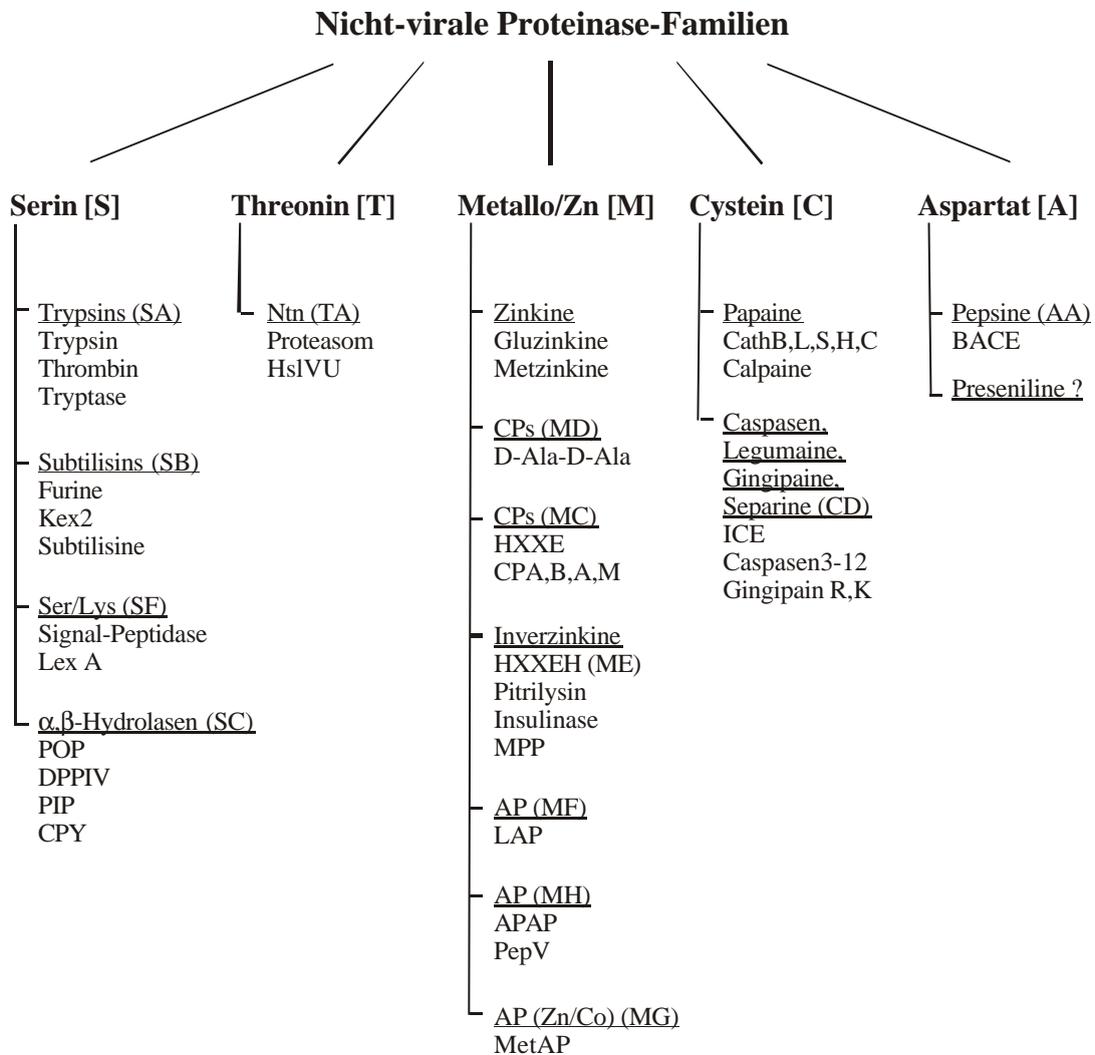


Abb. 6: Nicht-virale Proteinase-Familien

Proteinasen können in verschiedene Familien eingeteilt werden. Die Benennung erfolgt nach den wesentlichen funktionellen Resten des aktiven Zentrums

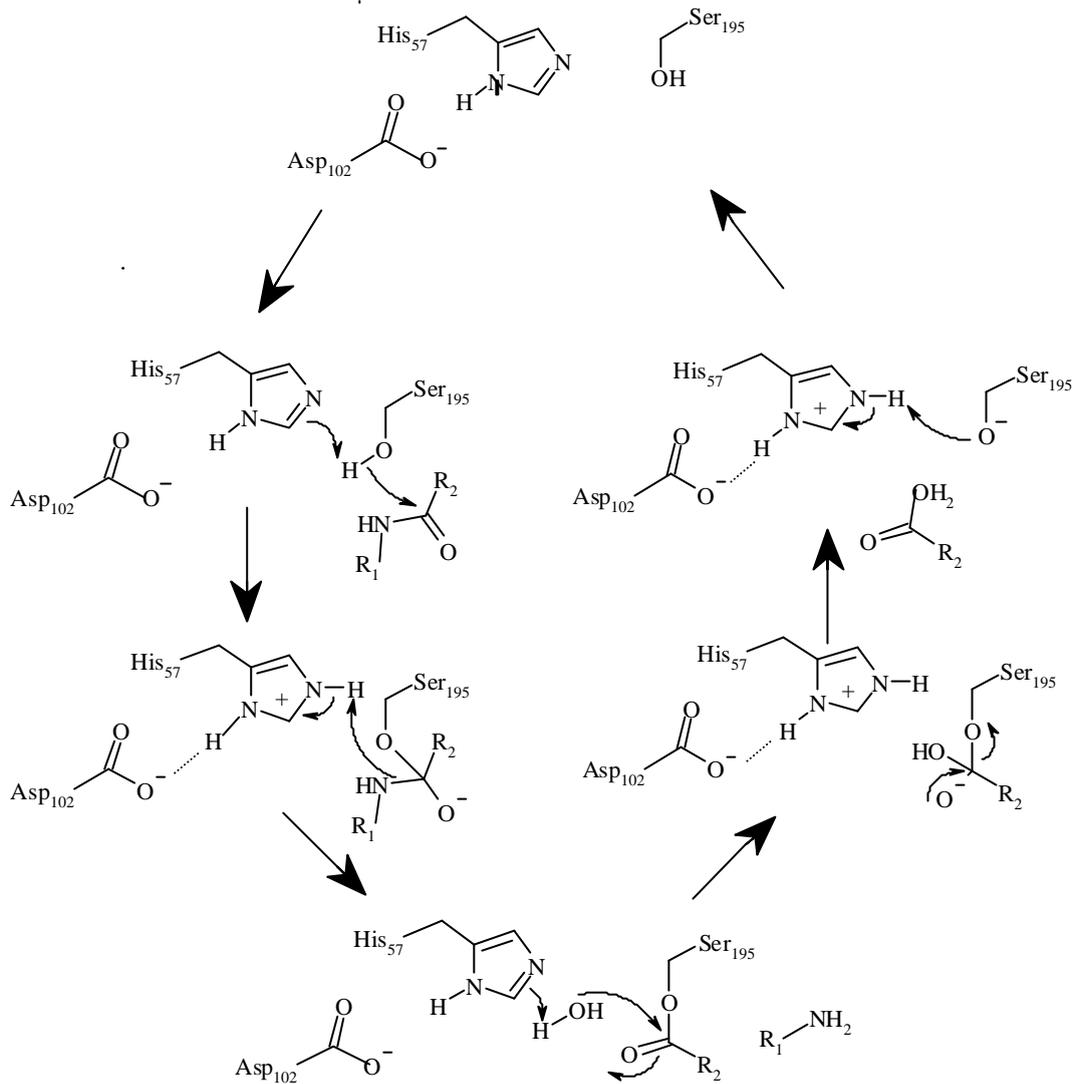


Abb. 7: Reaktionsmechanismus Trypsin-artiger Serinproteinasen

Die einzelnen katalytischen Rollen der Aminosäuren Histidin 57, Asparaginsäure 102 und Serin 195 bei der hydrolytischen Spaltung von Peptidbindungen werden im obigen Reaktionsschema verdeutlicht.

Trypsasen stellen eine Familie eng verwandter Trypsin-ähnlicher Serinproteinasen dar, die von wenigstens drei nicht-allelischen Genen, angeordnet auf Chromosom 16p13.3, ableitbar sind. Verschiedene Isoenzyme, α_1 , α_2 , $\hat{\alpha}_{1a}$, $\hat{\alpha}_{1b}$, $\hat{\alpha}_2$, $\hat{\alpha}_3$, mMPC-7-like-1, mMPC-7-like-2 und γ , sind im Menschen identifiziert worden (Smith *et al.*, 1984) (Cromlish *et al.*, 1987) (Harvima *et al.*, 1988) (Wong *et al.*, 1999) (Pallaoro *et al.*, 1999). Aber auch in anderen Säugetieren, wie in der Maus (McNeil *et al.*, 1991) (McNeil *et al.*, 1992), in der Ratte (Kido *et al.*, 1985), im Hamster (Murakumo *et al.*, 1995), im Meerschwein (McEuen *et al.*, 1996), im Hund (Schechter *et al.*, 1988), im Schaf (Pemberton *et al.*, 2000), im Schwein (Xu *et al.*, 1993), in der Kuh (Fiorucci *et al.*, 1992) oder im Affen (Sakaguchi *et al.*, 2000), finden sich

verwandte Tryptasen in den Mastzellen. Auch wenn die Beteiligung der Tryptasen an asthmatischen Erkrankungen *in vivo* noch nicht endgültig bewiesen ist, so ist doch bemerkenswert, daß nur in den Säugetieren, in denen Tryptase nachgewiesen werden kann, asthmatische Erkrankungen auftreten.

Kürzlich erbrachte Befunde, daß die Tryptase-Konzentrationen in den Atemwegen von Asthmatikern erhöht sind (Broide *et al.*, 1991) (Broide *et al.*, 1990) (Wenzel *et al.*, 1988), haben die wissenschaftliche Aufmerksamkeit auf die Rolle der Tryptasen in Allergie- und Entzündungserkrankungen so wie Rhinitis, Bindehautentzündung und Asthma gelenkt. Im Laufe dieser Untersuchungen wurde gefunden, daß Tryptasen außerdem an verschiedenen gastrointestinalen (Schwartz, 1995), dermatologischen (Clark *et al.*, 1996) und kardiovaskulären (Sommerhoff *et al.*, 2000) Krankheiten sowie an Arthritis (Buckley *et al.*, 1997) (Renoux *et al.*, 1996) beteiligt ist.

Durch *in vivo* Experimente wurde gezeigt, daß die Inhalation von Tryptase eine Verengung der Bronchien sowie eine Übersensibilisierung durch Mastzell-Aktivierung bewirkt (Molinari *et al.*, 1996). Zusätzlich verursachte die Injizierung von Tryptase in die Haut eines Meerschweines eine massive Ansammlung von Neutrophilen und Eosinophilen (He *et al.*, 1997). Weiterhin konsistent mit einer wichtigen Funktion von Tryptase in der Pathogenese von Asthma ist die Tatsache, daß eine Gabe von Tryptase-Inhibitoren an asthmakranke Schafe direkt vor einer Allergen-Einwirkung die Akkumulation von Granulozyten verringerte und die Verengung der Bronchien reduzierte (Clark *et al.*, 1996).

Eine Vielzahl von *in vitro*-Experimenten wurde bisher durchgeführt, um mögliche Tryptase-Funktionen zu finden. So sind Tryptasen an zwei wesentlichen Bestandteilen des Immunsystems, nämlich der Mastzell-Degranulation und der Eosinophil- und Neutrophil-Migration, kausal beteiligt (Jung *et al.*, 1994) (Buckley *et al.*, 1997) und führen so möglicherweise zu einer direkten Amplifikation der allergischen Immunantwort (He *et al.*, 1998). Weiterhin fördern Tryptasen die Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8) aus Epithelzellen (Cairns and Walls, 1996), führen zur Sekretion sekundärer zellulärer Mediatoren durch Aktivierung der „proteinase activated receptor“ (PAR) Familie (Dery and Bunnett, 1999) (Mirza *et al.*, 1997), stimulieren die Leukozyten-Migration in die Atemwege (Walls *et al.*, 1995) und tragen so zur „late-phase“ Immunantwort bei.

Tryptasen fördern die Ausbildung der Schuppenflechte, und ihre Fähigkeit zur Inaktivierung von „vasoactive intestinal peptide“ (VIP) (Tam and Caughey, 1990) und

„calcitonin gene-related peptide“ (CGRP) (Walls *et al.*, 1992) wurde als ein möglicher Weg, die Bronchienverengung zu verursachen, vorgeschlagen (Johnson *et al.*, 1997). Desweiteren fördert Tryptase die Zellteilungsaktivitäten der Fibroblasten (Ruoss *et al.*, 1991), Epithelzellen (Cairns and Walls, 1996) und der Bronchialzellen (Brown *et al.*, 1995), was die pathologischen Veränderungen in den Atemwegen von Asthmatikern verursachen könnte. Die Regulation potenter Neuropeptide wie Bradykinin (Kozik *et al.*, 1998) durch die Katalyse der Bradykinin-Freisetzung vom Kininogen (Schwartz, 1995) (Proud *et al.*, 1988) und die Fähigkeit, als angiogener Faktor zu agieren (Blair *et al.*, 1997), sind zwei weitere bemerkenswerte Eigenschaften der Tryptase. Vor kurzem ist neben Fibronectin und Fibrinogen (Thomas *et al.*, 1998) Prostromelysin als mögliches Substrat identifiziert worden. Das entstehende Stromelysin (Gruber *et al.*, 1989) kann anschließend Collagenase spalten (Gruber *et al.*, 1988), wodurch Tryptasen unter anderem auch an Gewebeabbau, Matrix-Abbruch und Bindegewebeentzündung (Walls, 2000) sowie in die Generation von porösen Mikrogefäßen (He and Walls, 1997) beteiligt sein könnte.

Wie bei Serinproteinasen oft beobachtet, werden auch die Tryptasen zunächst als Pro-Enzym exprimiert. Auf dem Weg vom trans-Golgi Apparat zu den Sekretions-Granula erfolgt dann ein autokatalytischer und ein von Dipeptidyl-Peptidase I katalysierter Schritt, bei dem das 15 Aminosäuren lange Propeptid von der eigentlichen Proteinasesequenz abgespalten wird (Ren *et al.*, 1998) (Sakai *et al.*, 1996). Durch eine Umlagerung im Protein entsteht eine aktivierte Serinprotease (Bode, 1979a). Bereits aktivierte Tryptase-Monomere wurden bisher als inaktiv angesehen, auch wenn in dieser Teilfrage gegenwärtig eine kontroverse Diskussion beginnt. Wie in Abbildung 8 gezeigt, ordnen sich die Tryptase-Monomere, stabilisiert durch Heparin-Bindung, zu Tetrameren an, die die beschriebenen Aktivitäten zeigen und im Falle von β -Tryptasen als aktives Tetramer in den Sekretions-Granula gelagert werden. Nach ihrer Freisetzung in das umgebende Medium bei der Mastzell-Degranulation dissoziieren die Heparin-stabilisierten Tetramere schnell und lagern sich aufgrund der geringen Proteoglykan-Konzentration im umgebenden Medium mit der Zeit zu inaktiven Monomeren um. Dies könnte einen Regulationsmechanismus für Tryptasen darstellen.

Obwohl die neun bisher identifizierten humanen Tryptase-Isoformen alle von der Sequenz her sehr ähnlich sind, ist es unwahrscheinlich, daß sie alle die gleiche biologische Funktion erfüllen. Die zwei am häufigsten vertretenen Gruppen von Tryptasen sind α -Tryptasen und β -Tryptasen. β -Tryptasen dominieren in Mastzellen, während α -Tryptasen die einzige Tryptase-Isoform in Basophilen darstellen.

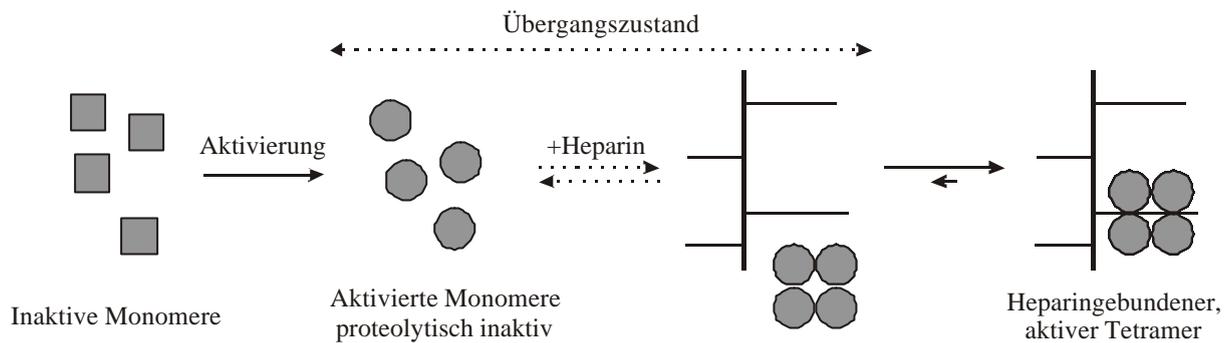


Abb. 8: Aktivierung von Tryptasen nach ihrer Expression

Inaktive pro-Tryptase wird zunächst zu pro'-Tryptase und dann zu reifer Tryptase prozessiert. Ob die aktivierten Monomere sich zunächst zu Tetrameren anordnen und dann Heparin binden, oder ob beide Prozesse in umgekehrter Reihenfolge stattfinden, ist nicht bekannt. Das heparin gebundene aktive Tetramer wird in den Granula der Mastzelle gelagert.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Struktur zwei verschiedener β -Tryptasen, β Ia-Tryptase und β III-Tryptase, vorgestellt. Als Alternative zur Cortison-Behandlung von Allergien wurden in Zusammenarbeit mit Byk-Gulden, Konstanz, neue bifunktionale Inhibitoren für die β -Tryptasen entwickelt. Hierbei ist es erstmalig gelungen, die Struktur eines Komplexes zwischen einer β -Tryptase-Isoform und einem bifunktionalen Inhibitor zu lösen. Das Jencksche Prinzip (Jencks, 1980) zur energetischen Additivität von Bindungsenergien bei bifunktionalen Molekülen konnte hierbei mit den entsprechenden Kristallstrukturen illustriert werden.

Die Struktur der in Basophilen dominanten Tryptase-Isoform α I-Tryptase wurde ebenfalls gelöst. α -Tryptase erwies sich gleichfalls als Tetramer, das allerdings auch ohne Heparin-Bindung stabil bleibt. Am auffälligsten ist ein ungeordnetes und daher inaktives Zentrum dieser Proteinase. Biochemische Arbeiten zeigen jedoch, daß das Andocken an passende Substrate eine Rückfaltung des aktiven Zentrums in seine aktive Konformation bewirkt und so produktive Substratbindung ermöglicht. Dieser Mechanismus stellt einen bisher bei Serinproteinasen nicht bekannten „induced-fit“ Mechanismus und damit eine neue Form der Regulation von Serinproteinasen dar.

2 Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

Um in der Natur vorkommende Abläufe besser verstehen zu lernen, ist es häufig notwendig, die beteiligten Organismen dreidimensional zu erfassen. Unser Augenlicht eignet sich hierzu nur begrenzt, da wir nur in der Lage sind, Objekte bis zu einer gewissen Größe optisch, ohne Hilfsmittel aufzulösen. Mit dem Fortschritt der Biologie wurde die Lichtmikroskopie entwickelt, die es ermöglichte, auch kleinere, mit dem bloßen Auge nicht mehr erkennbare Lebewesen zu untersuchen. Die wissenschaftlichen Fragestellungen verlagerten sich mit der Zeit von der Beobachtung von Kleinstlebewesen hin zum detailgenauen Verständnis ablaufender biochemischer Reaktionsprozesse. Um eine räumliche Vorstellung von den hieran beteiligten Faktoren zu erhalten, eignet sich die klassische Lichtmikroskopie nicht mehr. Zwei Punkte sind optisch voneinander nicht zu trennen, sofern die Wellenlänge der verwendeten Strahlung nicht höchstens doppelt so groß ist, wie der Abstand dieser Punkte (Abbe, 1873; Porter, 1906).

Sichtbares Licht hat Wellenlängen von etwa $4-8 \times 10^{-7}$ m und ist daher nicht anwendbar, um Atome in Molekülen mit einem typischen Bindungsabstand von 10^{-10} m aufzulösen. Die Strahlungsart mit der entsprechenden Wellenlänge ist die von Wilhelm Conrad Röntgen bei Kathodenstrahlexperimenten entdeckte und nach ihm benannte Röntgenstrahlung (Röntgen, 1895). Abbildung 9 vergleicht den Aufbau eines klassischen Lichtmikroskops mit dem experimentellen Aufbau einer Röntgenstrukturanalyse. Bei der Mikroskopie wird Licht durch das zu untersuchende Objekt gestreut. Diese Streustrahlung wird durch ein Linsensystem unter Entstehung eines vergrößerten Abbildes wieder zusammengeführt. Hierbei bleiben die Phasen der Strahlung stets erhalten. Ein diesem Aufbau entsprechendes Röntgenmikroskop ist technisch nicht realisierbar, da kurzwellige, gestreute Röntgenstrahlung durch keine bekannte Technik wieder fokussiert werden kann. Diese Limitierung kann jedoch umgangen werden, indem man sich das Phänomen der Röntgenbeugung zunutze macht. Hierbei nutzt man die Periodizität eines Einkristalls, den man Röntgenstrahlung einer genau definierten Wellenlänge unter Drehung aussetzt. Die photographisch festgehaltenen Diffraktionsbilder ermöglichen nun, die dreidimensionale Struktur eines Moleküls rechnerisch und somit indirekt zu bestimmen.

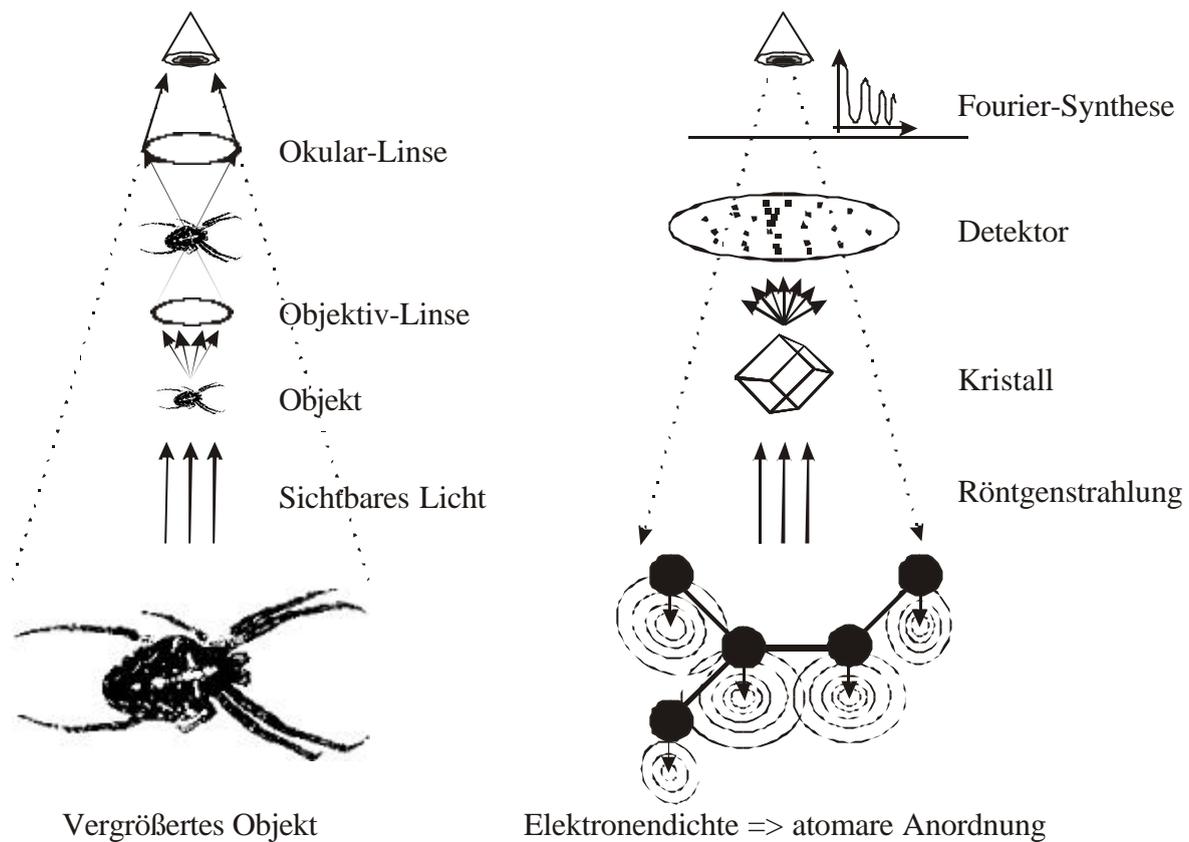


Abb. 9: Mikroskopie und Kristallographie

Während sichtbares Licht durch Linsen gebrochen und so ein vergrößertes dreidimensionales Abbild eines Objektes erstellt werden kann, so ist dies bei Röntgenstrahlung unmöglich. Die Funktion der Linsen muß daher rechnerisch durch die Fouriertransformation ersetzt werden.

Die Diffraktion von Röntgenstrahlen, zunächst gezeigt um 1912 (Friedrich *et al.*, 1912), wurde erstmals von W.L. Bragg zur Strukturbestimmung an Natrium- und Kaliumchloridkristallen genutzt (Bragg, 1913). Auf die hierfür erforderlichen rechnerischen Grundlagen, die von mehreren Forschern entwickelt wurden, soll im folgenden noch genauer eingegangen werden.

Das grundsätzliche Verständnis von dem inneren Kristallaufbau begann im frühen siebzehnten Jahrhundert mit einem Aufsatz von Johannes Kepler über den hexagonalen Aufbau einer Schneeflocke (Kepler, 1611), wo er die hexagonale Umgebung als dichteste

Packung für gleichgroße Kugeln erkannte. Die erste Kristallisation eines biologischen Makromoleküls gelang 1830, als K.H. Baumgärtner und seine Mitarbeiter erfolgreich Hämoglobin kristallisierten (Baumgärtner, 1830) (Reichert and Brown, 1909). Urease wurde als erstes Enzym im Jahre 1926 kristallisiert (Sumner, 1926).

Die Salzkristalle von W. L. Bragg konnten zu deren Strukturanalyse an der Luft der Röntgenstrahlung ausgesetzt werden. Bei Proteinkristallen führen dieselben Bedingungen zum Abdampfen des im Kristall enthaltenen Lösungsmittels, was den Zusammenbruch des Kristallgitters zur Folge hat. Mehrere Forscher erhielten deshalb nur sehr schwache Diffraktionsbilder, was sie auf die hohe Komplexität der Proteinmoleküle zurückführten. Eine Strukturaufklärung mittels Röntgenstrahlung von Proteinen wurde deshalb lange für undurchführbar gehalten. Erst das Montieren der Proteinkristalle in deren Mutterlauge in einer Glaskapillare erlaubte es, klare Diffraktionsbilder von Pepsin- und Insulin-Kristallen aufzunehmen. Dieser Durchbruch gelang J. D. Bernal und D. Crowford allerdings erst 21 Jahre nach der Strukturaufklärung von Natriumchlorid (Bernal and Crowford, 1934) (Crowford, 1935). 1954 wurde gezeigt, daß die Methode des isomorphen Ersatzes grundsätzlich auch für Proteine möglich ist (Green *et al.*, 1954), was den Weg für die Strukturaufklärungen von Myoglobin (Kendrew *et al.*, 1960) und Hämoglobin (Perutz *et al.*, 1960) ebnete. Sehr bald darauf gelang R. Huber 1968 mit dem Erythrocyruorin die erste gelöste Proteinstruktur in Deutschland (Huber *et al.*, 1968) (Huber *et al.*, 1969).

Nachdem anfangs die Ermittlung von Proteinstrukturen rechnerisch extrem aufwendig war und jahrelange Forschungsarbeit erforderte, so hat sich mit dem Fortschritt in der Computerindustrie und der damit verbundenen, erhöhten Rechenleistung die Zeiterfordernis für die Rechenschritte erheblich verringert. Gleichzeitig sind sowohl die verwendeten Methoden für die Datenanalyse (Finzel, 1993) als auch der experimentelle Aufbau (Plugrath, 1992) stets weiterentwickelt und verbessert worden. So konnte sich die Röntgenstrukturanalyse als Standardmethode für die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur biologisch interessanter Makromoleküle im Laufe der Zeit durchsetzen. Um diesen Siegeszug der Proteinkristallographie zu illustrieren, sind in Abbildung 10 die Anzahl der bei der „Research Collaboratory for Structural Bioinformatics“ (RCSB) , ehemals „Protein Data Bank“ (PDB), hinterlegten Proteinstrukturen in Abhängigkeit zur Jahreszahl aufgetragen. Am ersten Juli 2001 betrug die Gesamtzahl der zugänglichen Proteinstrukturen bereits 15697.

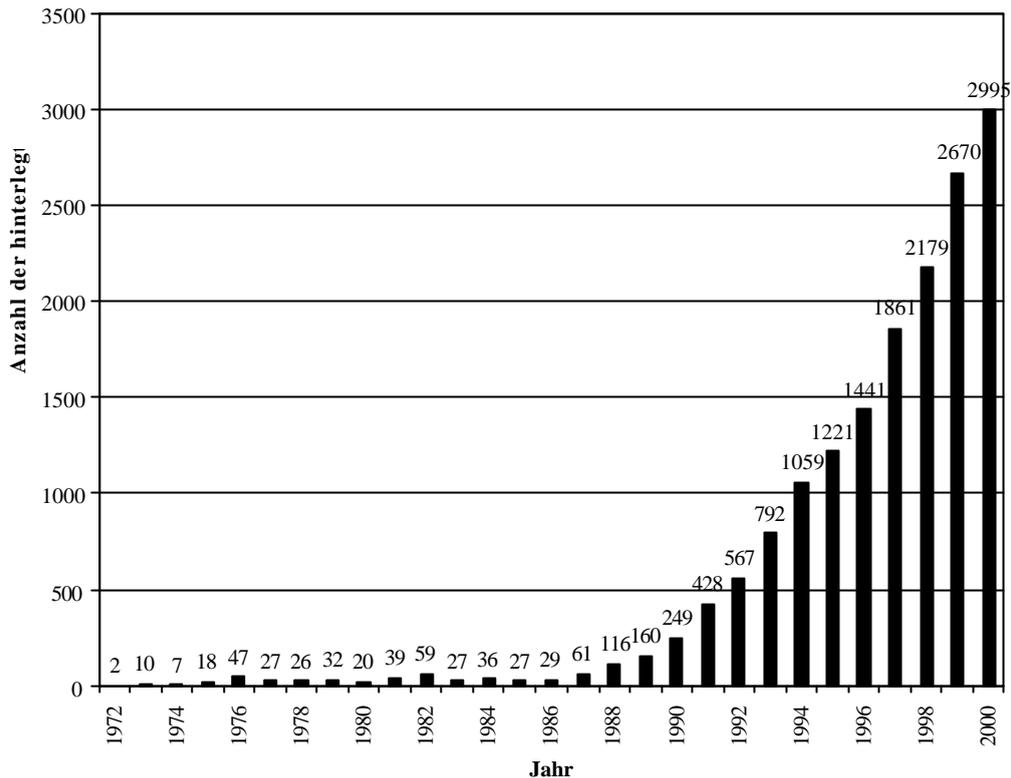


Abb. 10: Anzahl bei der RCSB hinterlegten Proteinstrukturen

Aufgetragen ist die Anzahl der bei der „Research Collaboratory for Structural Bioinformatics“ (RCSB), früher „Protein Data Bank“ (PDB), hinterlegten Proteinstrukturen als Funktion der Jahreszahl

Um ein Protein erfolgreich zu kristallisieren, ist es zunächst erforderlich, große Mengen an aufgereinigtem Material zur Verfügung zu haben. Obwohl Kristallisation prinzipiell ein Reinigungsverfahren ist, so ist doch zumindest für die Proteinkristallisation ein hoher Reinheitsgrad der Probe für den Erfolg zumeist Voraussetzung. Es schließt sich die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen an, unter denen optimale Einkristalle von ausreichender Größe für die Datenaufnahme wachsen können. Datensammlung und deren Auswertung folgen, bevor die in den Diffraktionsbildern verlorengegangene Phaseninformation rechnerisch auf verschiedenen Wegen wieder neu bestimmt wird. Anschließend wird eine Elektronendichtekarte errechnet und unter Erstellung eines Proteinmodells interpretiert. Eine rechnerische Verfeinerung dieses erstellten Modells schließt die Röntgenstrukturanalyse ab.

Eine Zusammenfassung dieser einzelnen, zur Lösung einer Proteinstruktur erforderlichen Schritte, wird im Folgenden gegeben und ist weiterhin detailliert in der Literatur beschrieben (Drenth, 1999) (McRee, 1993) (Stout and Jensen, 1989) (Rhodes, 1993) (Sherwood, 1976).

2.1 Einkristalle von Proteinen

Der große Entwicklungsfortschritt auf dem Gebiet der Röntgenstrahlquellen und -detektoren sowie auf dem Gebiet der rechnerischen Datenauswertung haben die initiale Kristallisation der zu untersuchenden Proteine oft zu einem Engpaß bei der Strukturaufklärung mittels Röntgenstrahlung werden lassen. Leider ist gerade die Kristallisation als entscheidender Schritt immer noch kaum verstanden. Zwar haben die Entwicklungen von Synchrotron-Strahlenquellen, schnellen, sensitiven Detektoren und Kryotechniken zur Verringerung von Strahlenschäden zu etwas verminderten Ansprüchen an die Kristallqualität geführt, aber die entscheidende Frage, wann und warum Proteine kristallisieren, bleibt unbeantwortet.

Gegenwärtiges Hindernis auf dem Weg zu einem besseren Verständnis des Kristallisationsprozesses ist das unklare Konzept von der Natur der Kristalle und dem Einfluß von Lösungsmittel und Protein auf das Kristallwachstum sowie die letztendliche Größe und Qualität des Kristalls. Zu der theoretisch deutlich besser verstandenen Kristallisation von Kleinmolekülen, gibt es im Wesentlichen drei Unterschiede. Zunächst beträgt der Lösungsmittelgehalt in Proteinkristallen typischerweise etwa 50 % (extreme Fälle von 30 % bzw. 90% wurden berichtet) und liegt damit weit über dem von Kleinmolekülkristallen. Dies hat zur Folge, daß Proteinkristalle sehr leicht zerbrechlich sind, sie sehr sensitiv auf Ihre Umgebung reagieren (Temperatur, Ionenstärke, pH-Wert) und Diffraktionsbilder nur bis zu Auflösungen deutlich unterhalb der theoretischen Streugrenze liefern. Weiterhin setzt die Kristallkeimbildung (Abbildung 11) bei Proteinen erst bei extrem hoher, teilweise bis zu zehnfacher Übersättigung der Kristallisationslösung ein. Drittens hat diese erforderliche Übersättigung zur Folge, daß alternativ zu Kristallkeimen sogenanntes amorphes Präzipitat gebildet werden kann und daß dieser Vorgang gegenüber dem Kristallwachstum kinetisch im Vorteil ist.

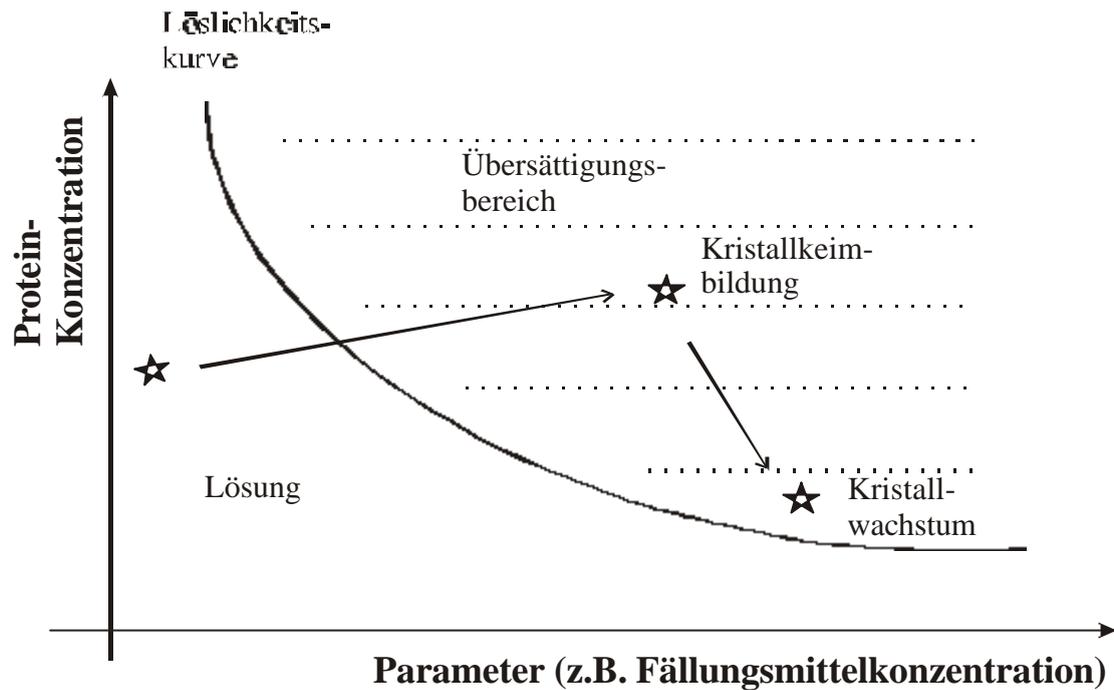


Abb. 11: Kristallwachstum aus einer übersättigten Lösung

Gezeigt ist die Löslichkeitskurve eines Proteins in Abhängigkeit von seiner Konzentration und der Fällungsmittelkonzentration. Kristallkeimbildung erfolgt bei starker Übersättigung, während das Wachstum nahe an der Löslichkeitsgrenze stattfindet.

Ein Protein kann um so leichter kristallisieren, je geringer die Übersättigung der Mutterlauge zur Kristallkeimbildung sein muß, da hierdurch der kinetische Vorteil der Präzipitatbildung verringert wird (Abbildung 12). Im Idealfall sollte sich das Kristallwachstum nach der Keimbildung bei geringerer Übersättigung fortsetzen, um so die Anzahl der entstehenden Kristallkeime möglichst gering zu halten und damit die Bildung weniger großer Kristalle zu fördern.

Die Umsetzung dieses theoretisch weitgehend anerkannten Kristallisationsprinzips in die Praxis hängt von vielen Parametern ab, die sozusagen eine mehrdimensionale Matrix verschiedener, voneinander abhängiger Parameter darstellen. Aufgrund des weitgehenden Unverständnisses des Kristallisationsvorganges bleibt dem Forscher hier nur, alle Parameter zu variieren, zu versuchen, aus den Zwischenergebnissen zu lernen und so schließlich die Matrix für die Kristallisation des jeweiligen Proteins zu optimieren (McPherson, 1991) (Michel, 1990). Oft müssen hierbei bis zu tausend einzelne Versuche durchgeführt werden.

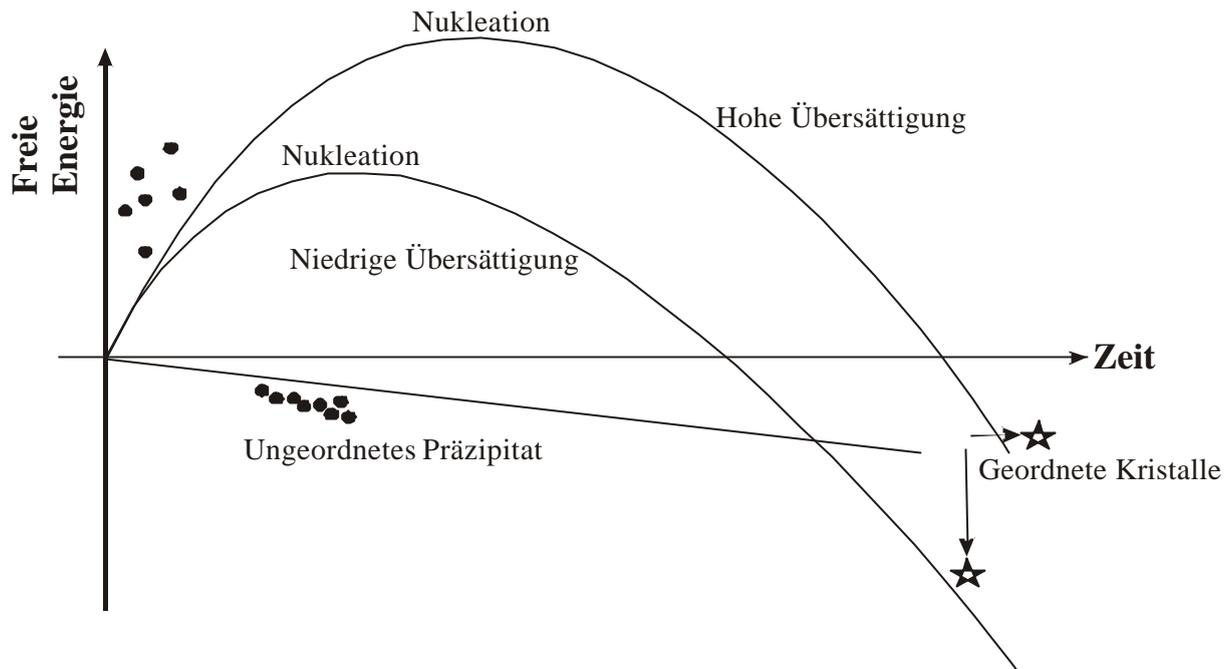


Abb. 12: Präzipitatbildung im Wettbewerb zum Kristallwachstum

Je geringer die erforderliche Übersättigung zur Kristallkeimbildung ist, desto geringer ist der kinetische Vorteil der Präzipitatbildung. Der Kristall ist die thermodynamisch günstigere Form.

Die einzelnen Parameter für die Kristallisation sind die Proteinkonzentration, die Art und Konzentration der eingesetzten Präzipitanz, die Natur und Konzentration des verwendeten Puffers, der pH-Wert, die Temperatur, sowie die Art und Konzentration eventueller Additive. Auf zwei dieser Faktoren, die Wahl der Präzipitanz und den pH-Wert soll hier etwas genauer eingegangen werden.

Verwendet werden prinzipiell zwei Klassen von Fällungsmitteln: Salze und Alkohole. Salze in höheren Konzentrationen werden verwendet, um die Proteine im klassischen Sinne auszusalzen, während verschiedene Alkohole eingesetzt werden, um das Wasser der Proteinlösung zu binden und das Protein somit zur Kristallisation zu bewegen. Die am häufigsten verwendeten Präzipitanzen beider Klassen sind in Abbildung 13 in Abhängigkeit zu ihrer Verwendungshäufigkeit dargestellt.

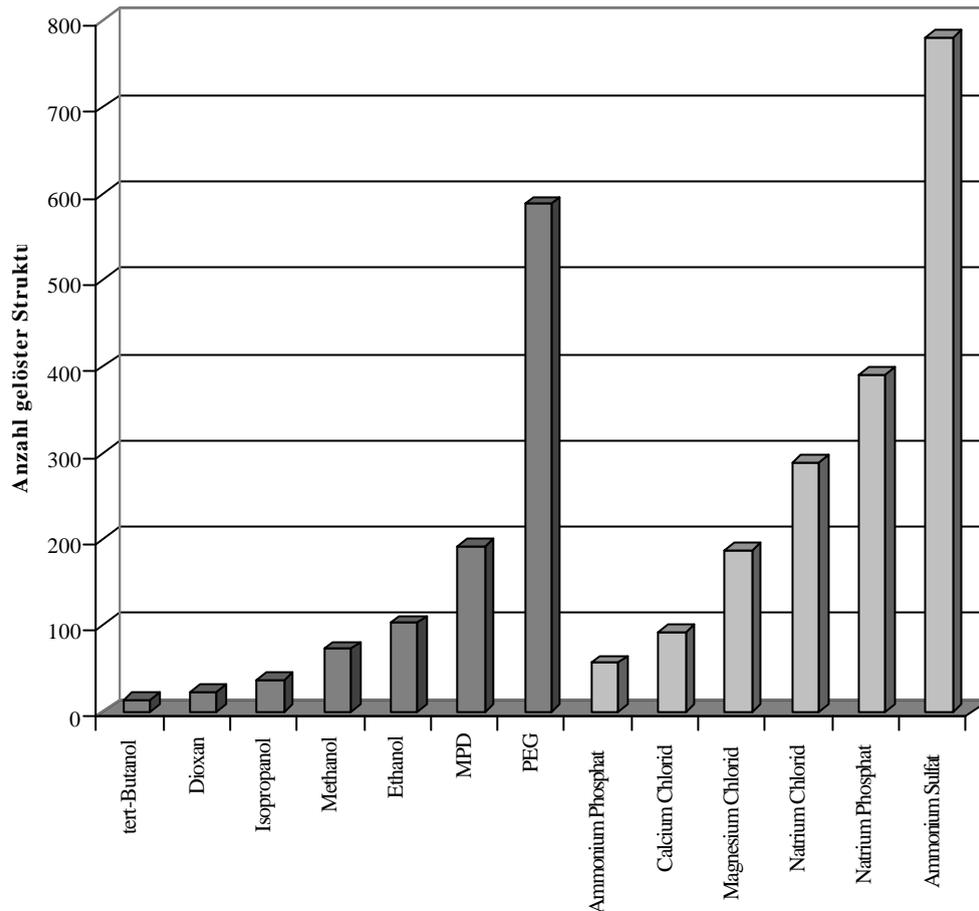


Abb. 13: Erfolgreich als Präzipitantz verwendete Alkohole und Salze

Unter Verwendung von Information bereitgestellt durch das National Institute of Standards und Technology wurden die erfolgreich verwendeten Präzipitantien analysiert.

Der pH-Wert eines Kristallisationsansatzes ist für den Erfolg von entscheidender Bedeutung. Proteinmoleküle interagieren im Kristallaufbau über Oberflächenkontakte. Die jeweilige Ladung der hierfür verantwortlichen oberflächenständigen Seitenketten ist abhängig von ihrer unmittelbaren Umgebung und damit auch vom pH-Wert der Präparation. Zudem sind Proteine nur stabil in einem bestimmten begrenzten pH-Wert-Fenster. Abbildung 14 zeigt die Anzahl erfolgreicher Kristallisationsversuche in Abhängigkeit zum eingestellten pH-Wert.

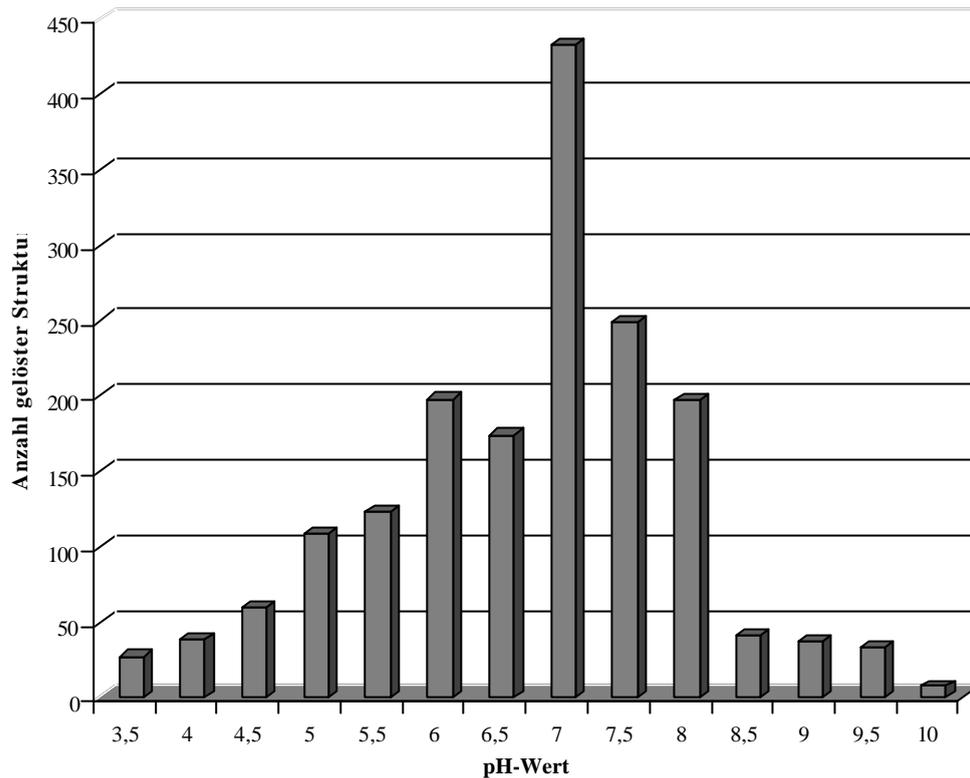


Abb. 14: Eingestellte pH-Werte für die Kristallisation

Die meist verwendeten pH-Werte für die Kristallisation wurden durch Analyse der Kristallisations-Datenbank des National Institute of Standards und Technology ermittelt.

Von den vielen verschieden experimentellen Verfahren zur Kristallisation, wie Dialyse, „Bulk“-Kristallisation oder „Free-Interface“-Diffusion, ist die Dampfdiffusions-Methode der mit Abstand am häufigsten verwendete experimentelle Aufbau. Hierbei wird eine kleiner Tropfen an Proteinlösung (oft 2 μl einer auf 10 mg/ml konzentrierten Lösung), mit einer gleichen Menge an Präzipitantlösung, die eine Präzipitanz und gegebenenfalls Additive enthält und bei einem bestimmten pH-Wert gepuffert ist, versetzt und in einem luftdicht versiegelten Reaktionsgefäß gegen etwa 500 μl reiner Präzipitantlösung in einem Reservoir äquilibriert. Hierbei diffundiert Lösungsmittel aus dem proteinhaltigen Tropfen in das Reservoir, was einen gleichmäßigen Anstieg der Protein- und der Präzipitanzkonzentration im Proteintropfen zur Folge hat. So wird hier eine Übersättigung erzielt und Kristallkeimbildung kann erfolgen (siehe Abbildung 11).

Die entstehenden Proteinkristalle haben eine Reihe besonderer Eigenschaften. Neben dem bereits erwähnten außergewöhnlich hohen Lösungsmittelgehalt zeigen Proteinkristalle verglichen mit Kleinmolekülen häufig eine relativ niedrige Symmetrie aufgrund des Wegfallens des Inversionszentrums als Symmetrieoperation. Auch wenn die intermolekularen Wechselwirkungen benachbarter Moleküle im Proteinkristall von vergleichbarer Stärke sind wie im Kleinmolekülkristall, so sind doch die Interaktionspunkte pro Dalton Molekülmasse deutlich geringer, was zu einer deutlich erniedrigten Bindungsenergie pro Einheitszelle im Proteinkristall führt. Alle diese Einflüsse resultieren in einer relativ lockeren Kristallpackung, die es ermöglicht, im Kristall chemische Reaktionen ablaufen zu lassen, wie zum Beispiel das Eindiffundieren von Inhibitoren oder die Reaktion der Kristalle mit Schwermetallverbindungen zur Phasenbestimmung.

Andererseits verursacht die Instabilität von Proteinkristallen große Schwierigkeiten beim Vorbereiten der Kristalle für die Datenaufnahme. Das Montieren der Kristalle in einer Glaskapillare zusammen mit ihrer Mutterlauge verhindert das Verdampfen von Lösungsmittel aus dem Kristall und damit den Zusammenbruch des Kristallgitters während der Röntgenstrahlungs-Exposition. Alternativ werden die Kristalle mit einer kleinen Haarschleife („cryo-loop“) aus der Mutterlauge gefischt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Datenaufnahme erfolgt dann bei 100 K im Stickstoffstrom.

Proteinkristalle sind nicht zu 100 % ideal gepackt, sondern bestehen aus kleinen ideal gepackten Blöcken, die im Gesamtverbund gegeneinander leicht verkippt sind. Diese Verkipfung bezeichnet man als Mosaikbreite. Sie kann zwischen 0.1° und mehreren Grad betragen. Interferenz der Röntgenstrahlung findet jedoch nur innerhalb dieser Blöcke mit idealer Ordnung statt. Durch die enorme Größe der Proteine verglichen mit Kleinmolekülen, erhöhen sich auch die Dimensionen der Einheitszelle. Die Streukraft eines Kristalls hängt aber direkt mit der Anzahl der sich in Röntgenstrahlrichtung im Kristall wiederholenden identischen Elemente (Einheitszellen) ab. Bei gleicher Kristallgröße ist die Streukraft eines Proteinkristalls deshalb erheblich geringer. Dies macht für eine erfolgreiche Strukturaufklärung den Einsatz leistungsfähiger Strahlungsquellen erforderlich.

2.2 Erzeugung von Röntgenstrahlung

Die beiden hauptsächlichen Ausrüstungsgegenstände für die Durchführung von Röntgenbeugungs-Experimenten sind ein Röntgenstrahlungs-Generator und ein entsprechender Detektor für die zu messende Streustrahlung. Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen mit Wellenlängen im Bereich von 10^{-7} - 10^{-11} m. Um zwei benachbarte Atome mit einem typischen Bindungsabstand von 1 \AA (10^{-10} m) auflösen zu können, ist eine Strahlung mit einer Wellenlänge von höchstens 2 \AA erforderlich.

In der täglichen Laborpraxis nutzt man zur Erzeugung einer solchen kurzwelligen Strahlung Röntgenröhren. Diese enthalten eine Kathode, die Elektronen emittiert, welche dann mit hoher Geschwindigkeit auf eine rotierende, gekühlte Kupfer-Anode treffen. Hierbei entsteht neben Wärme auch Röntgenstrahlung, die sich zum einen über einen breiten Wellenlängenbereich (Bremsstrahlung) erstreckt und zum anderen aus drei exakt definierten Wellenlängen besteht. Die minimale Röntgenstrahl-Wellenlänge des Bremsstrahlungs-Anteils errechnet sich wie folgt:

$$\lambda_{\min} = \frac{h \times c}{e \times V} = \frac{12.4}{V} \quad (1)$$

Für eine Generator- Spannung von $V = 40 \text{ kV}$ ergibt sich so für die kurzwelligste Bremsstrahlung eine Wellenlänge von $\lambda = 0.31 \text{ \AA}$. Die drei definierten Wellenlängen entstehen durch innere Elektronenübergänge im Anodenmaterial. Die auftreffenden schnellen Elektronen entfernen aufgrund ihrer hohen kinetischen Energie Elektronen aus den niedrigen Orbitalen der Anoden-Atome. Elektronen aus höheren Orbitalen fallen zurück auf die energetisch niedrigeren Orbitale. Die freiwerdende Energie wird als Röntgenstrahlung emittiert. Aus der M-Schale auf die K-Schale zurückfallende Elektronen emittieren K_{β} -Strahlung mit einer Wellenlänge von 1.39217 \AA . Die Feinstruktur der L-Schale verursacht das Auftreten von $K_{\alpha 1}$ -Strahlung (1.54051 \AA) und von halb so intensiver $K_{\alpha 2}$ -Strahlung (1.54433 \AA), die gemittelt eine Wellenlänge von 1.54178 \AA ergibt, durch den Einsatz von Monochromatoren herausgefiltert und für Röntgenbeugungs-Experimente im kristallographischen Labor genutzt wird.

Für hochaufgelöste Datensätze, Experimente für die eine exakte, frei wählbare Wellenlänge erforderlich ist, oder für Kristalle mit einer geringen Streukraft, ist ein Synchrotron eine sehr nützliche Strahlungsquelle. Hier befinden sich (meist positiv) geladene Teilchen im schnellen Flug und durch ein Magnetfeld gehalten auf einer Kreisbahn mit einem Radius von etwa 10 m bis zu einigen 100 m. Die hierbei auftretende sehr starke Bremsstrahlung wird anders als beim Röntgen-Generator nicht verworfen, sondern durch sogenannte Wiggler und Undulatoren, die einen Zick-Zack-Kurs auf einer räumlich limitierten Flugbahn verursachen, sogar noch verstärkt. Hierbei können Wellenlängen bis zu unter einem Ångström erzielt werden. Durch frei durchstimmbare Monochromatoren kann aus dieser Bremsstrahlung die gewünschte Wellenlänge gezielt ausgewählt und für Beugungsexperimente verwendet werden. Die mindestens um zwei Größenordnungen höhere Strahlungsintensität am Synchrotron erlaubt es, deutlich verbesserte Auflösungen zu erzielen. Die hierbei allerdings ebenfalls steigende Strahlungsschädigung ermöglicht fast nur Messungen am gefrorenen Kristall.

2.3 Symmetrie, Einheitszelle und Raumgruppen

Die Symmetrieklassen der Kristalle wurden bereits im Jahre 1830 durch J.F.C. Hessel mathematisch hergeleitet (Hessel, 1830). Er fand, daß es durch Ausnutzung der vier Symmetrie-Operationen, Rotation, Inversion, Spiegelung und Drehinversion möglich war, genau 32 Punktgruppen abzuleiten, die sieben verschiedene Formen von Gittersymmetrie beinhalten. Eine kristallographische Punktgruppe ist hierbei definiert als eine Gruppe von Symmetrieelementen, die nach der Operation einen Punkt (oft der Ursprung) im Kristall unbewegt lassen und ein Kristallgitter in ein davon ununterscheidbares überführen.

Im Jahre 1849 demonstrierte A. Bravais, daß es nur 14 verschiedene Wege gibt, identische Punkte im Raum so anzuordnen, daß jeder Punkt die gleiche Anzahl von Nachbarn mit gleichen Abständen in den gleichen Richtungen hat (Bravais, 1849). Diesen, von der Bravais-Zelle umgrenzten Kristallbereich, nennt man Elementarzelle. Die resultierenden Gitter werden Bravais-Gitter genannt und representieren die Kombination der sieben Kristallsysteme, triklinisch, monoklinisch, orthorhombisch, tetragonal, kubisch, trigonal und hexagonal, mit den vier Gitter-Zentrierungsformen primitiv (P), einfach flächenzentriert (C), dreifach flächenzentriert (F) und innenzentriert (I).

Um einen dreidimensionalen Raum -ausgehend von mindestens einem Molekülsymmetrisch vollständig zu füllen, gibt es unter Ausnutzung der Symmetrieeoperationen Identität, Rotation, Translation, Schraubung, Drehinversion, Gleitspiegelung, Spiegelung und Inversion exakt 230 Möglichkeiten. Diese 230 verschiedenen Kombinationen von Symmetrieeoperationen werden als kristallographische Raumgruppen bezeichnet. Die kleinste Einheit in einem Kristall, von der aus das Kristallgitter unter Anwendung der in der Raumgruppe vorgeschriebenen Symmetrie-Operationen aufgebaut werden kann, bezeichnet man als asymmetrische Einheit.

Proteine bestehen aus Aminosäuren, die ihrerseits chirale Moleküle darstellen. Für Proteinkristalle sind daher Raumgruppen, die Spiegelungen oder Inversionen als Symmetriefunktionen beinhalten, ausgeschlossen. Dies reduziert die Anzahl der möglichen Raumgruppen auf 65 chirale Raumgruppen, die im Folgenden dargestellt sind.

Kristallsystem	Punktgruppen	Raumgruppen
Triklinisch	C ₁	P1
Monoklinisch	C ₂	P2, P2 ₁ , C2
Orthorhombisch	D ₂	P222, P222 ₁ , P2 ₁ 2 ₁ 2, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ , C222, C222 ₁ , F222, I222, I2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Tetragonal	C ₄ , D ₄	P4, P4 ₁ , P4 ₂ , P4 ₃ , I4, I4 ₁ , P422, P42 ₁ 2, P4 ₁ 22, P4 ₂ 22, P4 ₁ 2 ₁ 2, P4 ₂ 2 ₁ 2, P4 ₃ 22, P4 ₃ 2 ₁ 2, I422, I4 ₁ 22
Trigonal	C ₃ , D ₃	P3, P3 ₁ , P3 ₂ , R3, P321, P312, P3 ₁ 21, P3 ₁ 12, P3 ₂ 12, P3 ₂ 21, R32
Hexagonal	C ₆ , D ₆	P6, P6 ₁ , P6 ₅ , P6 ₂ , P6 ₄ , P6 ₃ , P622, P6 ₁ 22, P6 ₅ 22, P6 ₂ 22, P6 ₄ 22, P6 ₃ 22
Kubisch	T, O	P23, F23, I23, P2 ₁ 3, I2 ₁ 3, P432, P4 ₂ 32, F432, F4 ₁ 32, I432, P4 ₃ 32, P4 ₁ 32, I4 ₁ 32

Tab. 1: Punkt- und Raumgruppen in der Proteinkristallographie

Sämtliche in der Röntgenstrukturanalyse an Proteinen auftretenden Raumgruppen und Punktgruppen sind hier kurz aufgelistet

2.4 Beugung von Röntgenstrahlung am Einkristall

Treffen Röntgenstrahlen auf ein Kristallgitter aus Proteinen, so regen sie die Elektronen im Gitter zu einer Schwingung mit der Frequenz der einfallenden Strahlung an. Diese Elektronen senden dann ihrerseits Strahlung mit dieser Frequenz aus. Solange die Energie der Strahlung nicht mit diskreten Übergängen innerhalb der Atome übereinstimmt, was für leichte Atome wie N, C oder O immer gilt, sind die auftretenden Streueffekte als Beugung an freien Elektronen behandelbar. Diese Strahlung entsteht an den Gitterebenen des Kristalls. Positive Interferenz entsteht nur in den diskreten Richtungen, wo der Gangunterschied $2d_{hkl}\sin\theta$ der entstehenden Strahlung ein Vielfaches der Wellenlänge λ darstellt, wie sich aus der Bragg'schen Gleichung, die in Abbildung 15 hergeleitet ist, ergibt. Die Wellenüberlagerung in allen anderen emittierten Richtungen summiert sich zu Null.

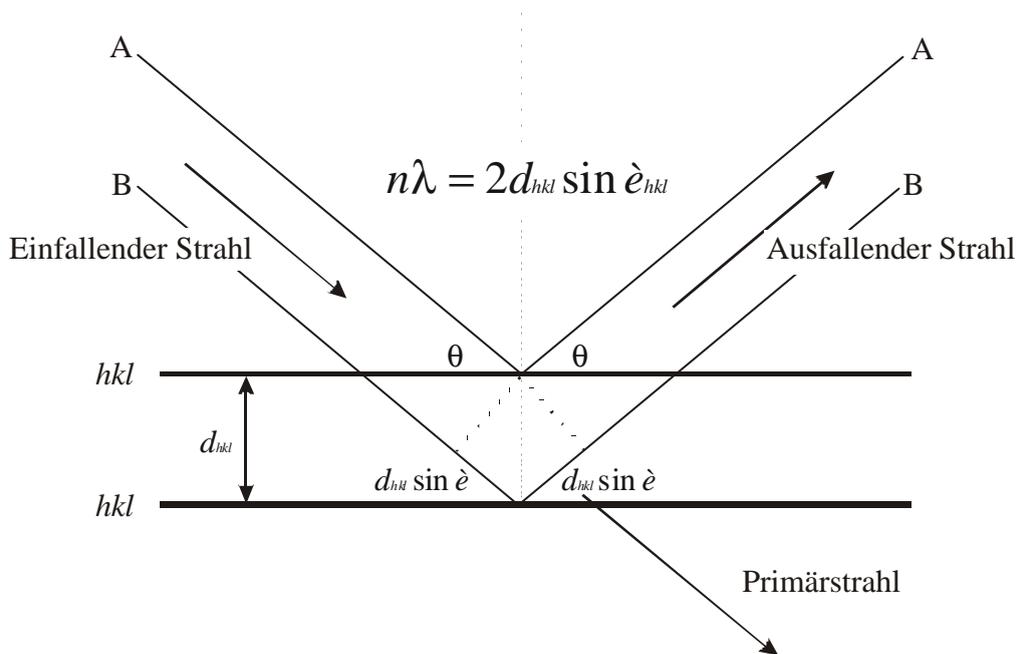


Abb. 15: Die Bragg'sche Gleichung

Gezeigt ist eine Konstruktion zur Ableitung der Bragg'schen Gleichung. Ein unter dem Glanzwinkel θ einfallender Röntgenstrahl wird an zwei parallelen Gitterebenen reflektiert. Positive Interferenz tritt nur auf, wenn der Gangunterschied $2d_{hkl}\sin\theta$ der reflektierten Wellen ein Vielfaches der Wellenlänge beträgt.

Aufgrund der vernachlässigbaren Intensität werden nur Interferenzen erster Ordnung betrachtet. Bei fixiertem Kristall und Eingangsstrahl lassen sich so die Richtungen der emittierten Strahlungen ermitteln, wobei sowohl d als auch \mathbf{q} von der Wahl der Gitterebenen abhängen.

Es sind in der Literatur noch mehrere Wege beschrieben, die Richtungen emittierter Strahlungen zu ermitteln. Das wohl gebräuchlichste Konzept ist aber das von P.P. Ewald 1913 vorgestellte und in Abbildung 16 gezeigte reziproke Gitter (Ewald, 1913). Im Normalgitter eines Kristalls kann jede Gitterebene durch einen Vektor charakterisiert werden, der normal auf der Gitterebene steht und die Länge d_{hkl} hat. Ersetzt man so einen Vektor durch einen Vektor $\mathbf{S}^\#$, der in der selben Richtung steht, aber die Länge $1/d_{hkl}$ hat, so bildet die Gesamtheit der Endpunkte dieser Vektoren das reziproke Gitter. Entsprechend läßt sich eine reziproke Zelle mit den Achsen \mathbf{a}^* , \mathbf{b}^* und \mathbf{c}^* definieren, wobei \mathbf{a}^* senkrecht auf der von \mathbf{b} und \mathbf{c} aufgespannten Ebene steht. \mathbf{S} ist somit als Addition von $h\mathbf{a}^*$, $k\mathbf{b}^*$ und $l\mathbf{c}^*$ beschreibbar.

Bei Rotation des reziproken Gitters um seinen Ursprung O entsteht positive Interferenz immer genau dann in Richtung \mathbf{MP} , wenn ein Gitterpunkt des reziproken Gitters auf der Oberfläche der Ewald-Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ liegt. Hieraus läßt sich ableiten, daß die Lage der Reflexe nur von der Einheitszelle abhängt, nicht aber von deren Inhalt.

Alle Vektoren werden im Folgenden durch **Fettdruck** von skalaren Größen unterschieden

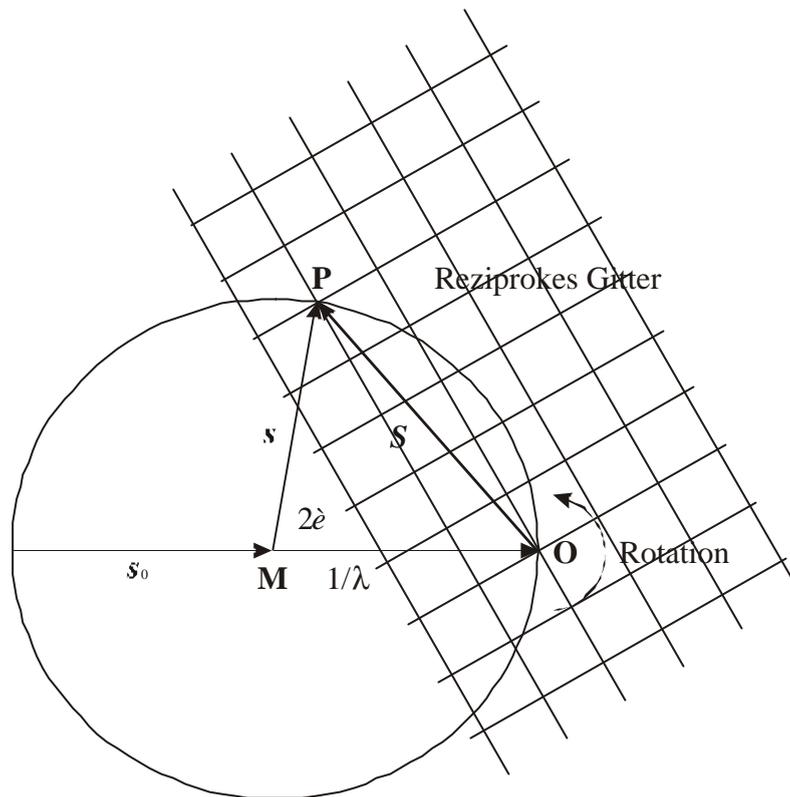


Abb. 16: Die Ewald-Kugel zur Konstruktion des gestreuten Röntgenstrahls

Die Ewald-Kugel hat den Radius $1/\lambda$ und den Mittelpunkt **M**. Das reziproke Gitter dreht sich mit dem Kristall um seinen Ursprung **O**, der auf der Kugeloberfläche liegt. Der einfallende Strahl s_0 wird im Winkel 2θ gestreut und läuft durch den ebenfalls auf der Kugeloberfläche liegenden Gitterpunkt **P**.

Neben der Position der Reflexe ist ebenfalls deren Intensität messbar. Mit anderen Worten: es kann jedem Reflex hkl ein sogenannter Strukturfaktor F_{hkl} zugeordnet werden. So erhält jeder Gitterpunkt im reziproken Gitter ein kristallographisches Gewicht; man spricht dann von einem gewichteten Gitter. Diese gewichtete Punktanordnung ist die Fouriertransformierte der Kristallstruktur, was letztendlich die Voraussetzung, dafür ist, Strukturen mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse lösen zu können.

Ein Strukturfaktor ist die Addition von N Wellen in Richtung hkl , die von N Atomen in der Elementarzelle beim Diffraktionsexperiment ausgehen. Jede dieser Wellen besitzt die Amplitude f_i (atomarer Streufaktor) und die Phase α_i die ein Ausdruck für die Lage des Atoms in der Elementarzelle ist. Ein Strukturfaktor ist daher:

$$\mathbf{F}_{hkl} = \mathbf{A}_{hkl} + i\mathbf{B}_{hkl} \quad (2)$$

wobei:

$$\mathbf{A}_{hkl} = \sum_N f_i \cos 2\delta(hx_i + ky_i + lz_i) \quad (3)$$

$$\mathbf{B}_{hkl} = \sum_N f_i \sin 2\delta(hx_i + ky_i + lz_i) \quad (4)$$

In welchem Umfang Röntgenstrahlung an Atomen gestreut wird, ist abhängig von der Zahl der Elektronen des Atoms und vom Streuwinkel. Das Ausmaß der Streuung wird durch den atomaren Streufaktor f_i ausgedrückt, der aufgrund von Vibrationen und Unordnung mit zunehmender Auflösung ($2\sin\theta/\lambda$) abnimmt. Bei wachsendem Streuwinkel erhöht sich der Gangunterschied zwischen den innerhalb eines Atoms gestreuten Röntgenstrahlen. Dies führt zu negativer Interferenz, was die niedrigeren messbaren Strahlungsintensitäten in hohen Auflösungsschalen erklärt.

Da ein Kristallgitter aber bei Temperaturen über 0 K nicht aus statischen Punkten sondern aus thermisch angeregt schwingenden Atomen besteht, läßt sich die resultierende Amplitude, zu der äquivalente Atome innerhalb eines Kristallgitters beitragen, nicht einfach durch eine arithmetische Summation der einzelnen Streufaktoren errechnen. Vielmehr kommt es durch diese Schwingen zu negativen Interferenzen, was durch einen Korrekturfaktor, den sogenannten Temperaturfaktor B , ausgedrückt wird.

$$f_{i,dynamisch} = f_{i,static} \exp\left(-B_i \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}\right) \quad (5)$$

Der Temperaturfaktor B hängt mit der mittleren quadratischen Auslenkung des Atoms wie folgt zusammen:

$$\overline{u^2} = \frac{B}{8\delta^2} \quad (6)$$

Die im Beugungsexperiment bestimmbare Beugungsamplitude ist dann gegeben als:

$$\sqrt{I} \propto |F_{hkl}| = \sqrt{A_{hkl}^2 + B_{hkl}^2} \quad (7)$$

Die Phase α des jeweiligen Reflexes ist:

$$\alpha_{hkl} = \arctan \frac{B_{hkl}}{A_{hkl}} \quad (8)$$

In umgekehrter Richtung wird die Elektronendichteverteilung in einem Kristall am Ort (x, y, z) durch folgende Fouriersummitation berechnet:

$$\tilde{n}(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}| \exp[-2\mathbf{p}(hx + ky + lz) + i\mathbf{a}_{hkl}] \quad (9)$$

Diese Elektronendichteverteilung stellt die zentrale Information dar, die der Kristallograph zum Entwurf eines Molekülmodells braucht.

2.5 Datensammlung und Datenauswertung

Das historische Medium zur Aufnahme von Diffraktionsbildern ist doppelt beschichteter, photographischer Film. Diese doppelte Beschichtung ist erforderlich, um den Bereich, in dem die Filmschwärzung linear mit der Strahlungsbelastung zunimmt, zu vergrößern. Den aufgenommenen Reflexen wurden anschließend per Hand Intensitäten zugewiesen. Naturgemäß ist diese Methode mit einem hohem Fehler behaftet und wird nicht mehr verwendet. Die zwei häufigsten Detektoren, die heute im Gebrauch sind, sind „image plates“ und CCD-Detektoren.

„Image plates“ werden ähnlich verwendet wie photographischer Film. Sie bestehen aus einer phosphorbeschichteten dünnen Platte. Röntgen-Photonen, die auf diese Platte treffen, regen Elektronen in dieser Beschichtung an und heben sie in einen metastabilen Zustand. Nach Beendigung der Belichtung erfolgt das Auslesen durch Abtasten der „image plate“ mit einem roten Laser. Hierdurch verlassen die Elektronen den angeregten Zustand und emittieren dabei blaues Licht, das mit Hilfe von PMT's („photo-multiplier tubes“) quantifiziert wird. Dieser Vorgang dauert etwa zwei bis drei Minuten und ist abhängig von der Größe der belichteten Platte. CCD-Detektoren sind hier wesentlich schneller. Ein Hauptunterschied zu „image plates“ ist, daß die Photonen einzeln und sofort nach Ihrem

Auftreffen gezählt werden. So kann ein dreidimensionales Bild eines jeden Reflexes erstellt werden. Weitere Systeme, die sich ebenfalls noch im Gebrauch befinden, sind Einzelphotonenzähler („single photon counter“), Video Systeme und proportionale Flächenzähler („multiwire proportional counter“).

Die Aufnahme eines Datensatzes erfolgt in der Regel bei konstanter Wellenlänge (häufig $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung) und unter Drehung des Kristalls in 0.2° - 2° Inkrementen, abhängig von der Mosaizität des Kristalls und den Zellkonstanten. Abhängig von der Raumgruppe und der Orientierung des Kristalls auf der Kamera müssen mindestens 30° (hexagonal) bis zu mindestens 180° (triklinisch) gemessen werden, um das reziproke Gitter hinreichend zu erfassen.

Um den nötigen Meßbereich festzulegen, muß das Kristallsystem bekannt sein. Dieses zu bestimmen, genügt ein einziges Diffraktionsbild. Wie bereits beschrieben, läßt sich aus der Lage der Reflexe das Bravais-Gitter bestimmen. Außerdem ergeben sich aus den Positionen der Reflexe die Dimensionen und Winkel der Elementarzelle. Nun erfolgt die Aufnahme eines kompletten Datensatzes. Aufgrund der Bekanntheit von Zellkonstanten, Orientierung und des Gittertyps, können nun die Reflexe im reziproken Raum vorhergesagt und unter Berücksichtigung von Polarisations (p)-, Absorptions (A)- und Lorentz (L)- Korrekturen integriert werden. Hierbei hängen die gemessenen Intensitäten nach Gleichung 10 von mehreren Faktoren ab. So sind sie proportional zu der Intensität der einfallenden Röntgenstrahlung I_0 und dem Kristallvolumen V_x sowie antiproportional zur Winkelgeschwindigkeit \boldsymbol{w} und zum Quadrat des Elementarzellvolumens (V). Die verwendete Wellenlänge \boldsymbol{l} wird vom Experimentator bestimmt.

$$I_{hkl} \propto I_0 \frac{\boldsymbol{l}^3 V_x \times L \times p \times A}{\boldsymbol{w} V^2} |F_{hkl}|^2 \quad (10)$$

Die einzelnen Bilder müssen nun aufeinander skaliert werden. Durch den Intensitätenvergleich symmetrieverwandter Reflexe auf den verschiedenen Einzelbildern werden hierzu Skalierungsfaktoren für jedes Bild berechnet, mit denen die gemessenen Intensitäten dieser Bilder vor der Datenreduktion (Blessing, 1987) multipliziert werden. Ein Maß für die Qualität eines Datensatzes ist der sogenannte R -Faktor, hier $R_{\text{symm},I}$.

$$R_{sym,I} = \frac{\sum_{hkl} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |I_{hkl} - I_{hkl}(j)|}{\sum_{hkl} I_{hkl}} \quad (11)$$

Der Term $I_{hkl} - I_{hkl}(j)$ beschreibt hierbei die Differenz zwischen dem Mittelwert der Intensitäten aller aufgrund von Symmetriegründen als gleich angenommenen Reflexe und der Intensität eines Reflexes hkl . Ist der Gittertyp falsch bestimmt, so werden Reflexe als gleich angenommen, die nicht gleich sind und der $R_{sym,I}$ -Faktor steigt dramatisch. So können auch Raumgruppen voneinander unterschieden werden, die zum gleichen Bravais-Gitter gehören. Systematische Auslöschungen erlauben es, kristallographische Schraubenachsen richtig zu identifizieren und so Raumgruppen wie $P222$, $P222_1$, $P2_12_12$ und $P2_12_12_1$ voneinander zu unterscheiden. Bei Raumgruppen, die enantiomorphe Paare bezüglich der Anordnung der Moleküle in der Zelle bilden (z.B. $P4_122$ und $P4_322$), kann die korrekte Raumgruppe erst während der Phasierung durch MIR, MAD oder Pattersonsuche endgültig bestimmt werden. Schließlich werden die Strukturfaktoramplituden aus den gemessenen Intensitäten durch Ziehen der Wurzel nach Gleichung 7 errechnet. In Analogie zu $R_{sym,I}$ ergibt sich der aus den Strukturfaktoramplituden errechnete $R_{sym,F}$ zu:

$$R_{sym,F} = \frac{\sum_{hkl} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |F_{hkl} - F_{hkl}(j)|}{\sum_{hkl} F_{hkl}} \quad (12)$$

Um eine möglichst schnelle Datenaufnahme zu gewährleisten, etwa zum Untersuchen von Übergangszuständen, ist die Laue Technik entwickelt worden. Hierzu exponiert man den Kristall einer ganzen Bandbreite von unterschiedlichen Wellenlängen („white X-rays“) auf einmal und deckt so mit nur einer einzigen Aufnahme einen Großteil des reziproken Gitters ab. Hierbei kann der Kristall um 360° um eine Achse („rotation method“) oder nur über einen kleinen Winkel („oszillation method“) gedreht werden. Allerdings ist diese Methode bei großem Drehwinkel durch stark überlappende Reflexe und bei kleinem Drehwinkel durch die erhebliche Unvollständigkeit der resultierenden Datensätze sehr limitiert.

2.6 Das Phasenproblem

Das wohl berühmteste Problem auf dem Feld der Röntgenstrukturanalyse ist das Phasenproblem. Es rührt von der Unmöglichkeit in Analogie zur Lichtmikroskopie her, gestreute kurzwellige Röntgenstrahlung durch Linsen wieder zu fokussieren. Dieser Schritt muß rechnerisch bewältigt werden. Durch die Messung der Intensitäten der Reflexe geht die Information über die Phasen der auftreffenden Strahlung verloren. Leider ist die Konstruktion eines phasensensitiven Detektors technisch noch nicht realisierbar. Ein für die Errechnung einer Elektronendichteverteilung und damit für die Lösung einer Struktur erforderlicher Strukturfaktor besteht jedoch aus Strukturfaktoramplitude und Phaseninformation. Da nun die Hälfte der erforderlichen Daten nicht zur Verfügung steht, ist die Lösung einer Kristallstruktur kein mathematisches Routineproblem. Einige experimentelle Methoden, diese zu den Strukturfaktoramplituden zugehörigen Phasen zu bestimmen, sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

2.6.1 Der Isomorphe Ersatz

Isomorphe Kristalle sind (annähernd) gleich in der Kristallform, in den Einheitszell-Dimensionen und der Struktur der chemischen und biologischen Bestandteile. Oft sind nur einzelne Atome ausgetauscht. Der hohe Wassergehalt von Proteinkristallen erlaubt es, Schwermetallverbindungen in die Lösungsmittelkanäle einzudiffundieren, um so zu einem „nativen“ Kristall einen hierzu isomorphen „derivatisierten“ Kristall zu erstellen. Das Einbringen von Substraten, Inhibitoren, oder modifizierten Aminosäuren sind weitere Möglichkeiten, Kristalle zu derivatisieren. Kürzlich ist es sogar gelungen, mit Hilfe von Röntgenstrahlung einer gewissen Wellenlänge die Disulfidbrücken im Proteinkristall zu zerstören und anhand der resultierenden veränderten Atompositionen die Daten zu phasieren (Bourenkov, 2001).

Diese derivatisierten, isomorphen Kristalle weisen an einer oder an mehreren exakt definierten Positionen im Protein oder Proteinkomplex, verglichen mit den nicht-derivatisierten Kristallen, eine unterschiedliche Elektronendichte auf. Diese Eigenschaft wird für die Phasierung wie folgt genutzt:

Der Strukturfaktor F_{hkl} hängt von den Positionen und der Streukraft der in der Elementarzelle enthaltenen Atome ab. Wenn etwa das Hinzufügen eines Schwermetalls die Proteinstruktur nicht durchbricht, so ergibt sich für die Strukturfaktoren von nativem Kristall $F_{P,hkl}$ und Derivat $F_{PH,hkl}$ folgende Beziehung:

$$F_{PH,hkl} = F_{H,hkl} + F_{P,hkl} \Leftrightarrow F_{H,hkl} = F_{PH,hkl} - F_{P,hkl} \quad (13)$$

Jeder dieser Strukturfaktoren besitzt eine Phase und eine Amplitude, wobei nur die Amplituden bei Datensatzaufnahme gemessen werden. Wenn es nun gelingt, die Lage des/der Schweratome(s) in der Elementarzelle zu bestimmen, kann der Strukturfaktor $F_{H,hkl}$ für das Schwermetall, der nun Phaseninformation enthält, errechnet werden.

Die Ermittlung der Schweratomlagen erfolgt mit der sogenannten Pattersonmethode (siehe auch Kapitel 2.6.3). Die Patterson-Funktion beschreibt die Gesamtheit aller Vektoren zwischen den Atomen einer Kristallstruktur. Hierzu benutzt sie die Quadrate der Ausdrücke für die Strukturfaktoramplituden. Das hat zur Folge, daß der die Phaseninformation enthaltende Imaginärteil entfällt. Wenn zwei Atome in der Struktur um den Vektor (u,v,w) voneinander entfernt sind, so erscheint dieser Vektor (u,v,w) in der Patterson-Funktion. Die Höhe der Peaks in der Patterson-Funktion ist annähernd proportional zum Produkt der Atomzahlen der Atome, die den Beginn und das Ende des entsprechenden Vektors festlegen. Häufig verwendet man nach Gleichung 13 eine sogenannte geschärfte Differenz - Patterson-Funktion als Fouriersummutation mit den Koeffizienten $(|F_{PH,hkl}| - |F_{P,hkl}|)^2$ und dem Phasenwinkel null.

Schweratom-Schweratom-Abstände werden daher die Patterson-Funktion dominieren, und so kann die relative Lage der Schweratome zueinander, unter Beachtung der Raumgruppe die Koordinaten x,y,z für die Schweratome und damit die Phaseninformation für den Strukturfaktor $F_{H,hkl}$ für diese Teilstruktur ermittelt werden. Bekannt sind nun $F_{H,hkl}$, $|F_{PH,hkl}|$ und $|F_{P,hkl}|$, und so ist es möglich, nach Abbildung 17 den Phasenwinkel α zu bestimmen.

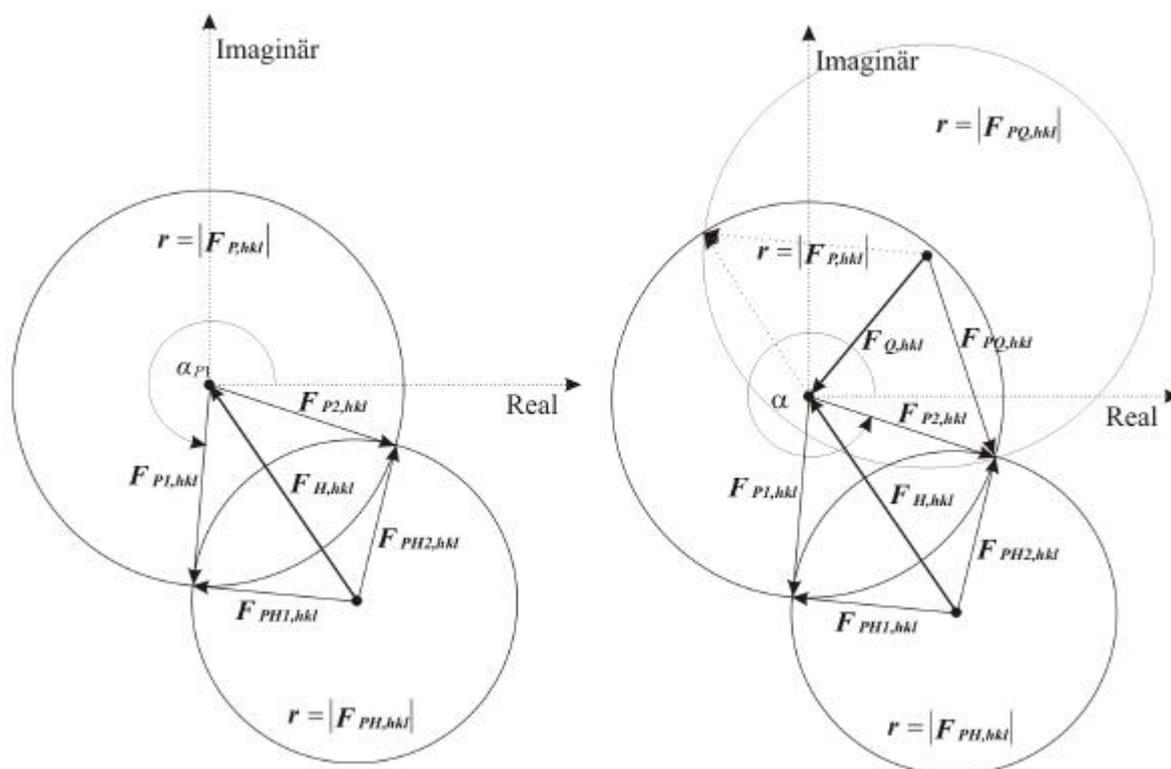


Abb. 17: Konstruktion der Proteinphasen beim multiplen Isomorphen Ersatz

Der Strukturfaktor $F_{H,hkl}$ des bekannten Schweratomteilmodells wird als Vektor dargestellt. Um den Startpunkt des Vektors wird ein Kreis mit dem Radius $|F_{P,hkl}|$ und um den Endpunkt ein Kreis mit dem Radius $|F_{PH,hkl}|$ gezogen. Die Schnittpunkte der Kreise ergeben jeweils zwei mögliche Phasenwinkel α_{P1} und α_{P2} für jede gemessene Strukturfaktoramplitude (links). Erst ein zweites Derivat ($F_{Q,hkl}$ und $F_{PQ,hkl}$) ermöglicht eine eindeutige Identifizierung des Phasenwinkels α .

Mit nur einem Derivat PH bleiben für jeden gemessenen Reflex zwei mögliche Phasenwinkel. Erst mit einem zweiten Derivat PQ, wobei beide Schwermetalle an unterschiedlichen Orten binden müssen, ist der Phasenwinkel α eindeutig bestimmbar. Allerdings kann hier aufgrund der Zentrosymmetrie der Patterson-Funktion zwischen den Koordinaten x,y,z und $-x,-y,-z$ nicht unterschieden werden. Die folgende Berechnung der Proteinphasen erfolgt mit beiden möglichen Koordinaten, wobei die richtige Variante die korrekte Elektronendichtekarte liefert, während die falsche das jeweilige Spiegelbild produziert (beispielsweise linksgängige statt rechtsgängige α -Helices).

Sind die Proteinphasen berechnet, so können weitere Schweratomlagen in sogenannten Differenz-Fourier Elektronendichtekarten lokalisiert werden. Beruhend auf der Fourier-Summation mit den Koeffizienten $|F_{PH,hkl}|/|F_{P,hkl}|$ und den Protein-Phasenwinkeln α_P

korrespondieren Peaks in der Elektronendichtekarte mit Schweratomlagen. Neben einem erhöhten Kontrast im Vergleich zu Patterson Analysen liefert diese Vorgehensweise Koordinaten des gleichen Ursprunges für das neue Derivat, wie für die initiale Phasierung verwendet.

Wenn mehrere Schwermetalle immer an die gleiche Stelle im Protein binden, so läßt dies keine Entscheidung in Bezug auf den richtigen Phasenwinkel zu. Etwa in einem solchen Fall macht man sich das Phänomen des anomalen Streuens zunutze. Normalerweise ist die resultierende Streustrahlung genau um 180° phasenversetzt zur anregenden Röntgenstrahlung. Hat der einfallende Röntgenstrahl aber eine Energie, die in etwa einer Absorptionskante im Schwermetall entspricht, so ist dies Prinzip außer Kraft gesetzt. Die Phasenverschiebung ist jetzt von 180° verschieden und das Friedel'sche Gesetz ($F_{hkl}=F_{-h-k-l}$) ist außer Kraft gesetzt. Vielmehr entspricht die Differenz zwischen den Friedel-Paaren dem anomalen Streubeitrag der Schweratome. Das entscheidende beim Strukturfaktor $F_{A,hkl}$ des anomalen Streuers ist, daß er aus einem realen und einem komplexen Teil besteht, wie in Abbildung 18 gezeigt. So kann mit Hilfe des anomalen Streuers auch der Phasenwinkel α bestimmt werden. Zwar ist der anomale Streubeitrag vom Betrag her klein, er ist aber mit wenig Fehlern behaftet, da er im selben Kristall wie das eigentliche Derivat gemessen wird und daher Fehlerquellen, wie Nicht-Isomorphie, auszuschließen sind.

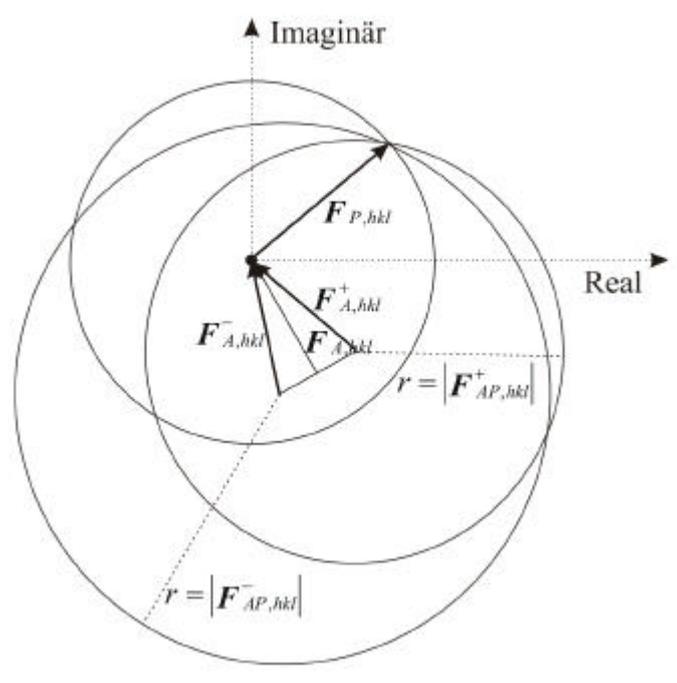


Abb. 18: Identifizierung des Phasenwinkels α durch anomale Dispersion

Der Strukturfaktor $F_{A,hkl}$ des anomalen Schweratom-Teilmodelles besteht aus einem realen und einem imaginären Teil. Somit läßt sich auch über die Anomalität eines Derivates der korrekte Phasenwinkel eindeutig bestimmen.

2.6.2 Multiple Anomale Dispersion

Multiple Anomale Dispersion (MAD) ist eine relativ neue Methode zu Phasierung und kann prinzipiell als Spezialfall des MIR betrachtet werden. Da es jedoch für die experimentelle Durchführung von MAD-Experimenten zwingend erforderlich ist, daß eine Röntgenstrahlquelle mit frei wählbarer Wellenlänge zur Verfügung steht, ist man auf Meßzeit an einem Synchrotron angewiesen. Weiterhin essentiell für MAD-Messungen ist das Vorhandensein eines anomalen Streuers im Kristall. Im Idealfall enthält das zu untersuchende Protein bereits Schwermetalle als Co-Faktor (beispielsweise Eisen in Häm-Gruppen). Andernfalls kann man versuchen, Schwermetallsalzverbindungen einzudiffundieren. Eine weitere elegante Methode wurde 1997 von S. Doublet entwickelt (Doublet, 1997). Hier wird Seleno-Methionin während der Expression anstelle von natürlichem Methionin biologisch eingebaut.

Der atomare Formfaktor eines anomal streuenden Atoms, f_{anom} , setzt sich nach Gleichung 14 aus einem wellenlängenunabhängigen (f_0) und einem wellenlängenabhängigen ($f(\mathbf{I})$) Teil zusammen.

$$f_{anom} = f_0 + f(\ddot{e}) = f_0 + f'(\ddot{e}) + i f''(\ddot{e}) \quad (14)$$

Datensätze werden nun bei drei verschiedenen Wellenlängen aufgenommen. Gemessen wird bei einer Wellenlänge λ_1 , dem sogenannten „edge“ – Datensatz, bei dem der reale Anteil des anomalen Streubeitrags $f'(\mathbf{I})$ minimal ist ($f'(\mathbf{I}) < 0$). Der imaginäre Teil des anomalen Streubeitrages wird an genau der Wellenlänge λ_2 gemessen, deren Energie exakt einem elektronischen Übergang im Schwermetall entspricht. Hier ist der sogenannte Bijvoet-Unterschied zwischen den Friedel-Paaren F_{hkl} und F_{-h-k-l} (siehe Kapitel 2.6.1) maximal. Messungen bei einer dritten Wellenlänge λ_3 , weit entfernt von der Absorptionskante des anomalen Streuers, wo deshalb die Beiträge $f'(\mathbf{I})$ und f'' nahezu null sind, erlauben es, die Änderung des realen Streubeitrages abhängig von der eingestrahnten Wellenlänge, die sogenannte dispersive Differenz, zu maximieren.

Sowohl die dispersive Differenz ($f'(\mathbf{I})$) als auch die anomale Differenz ($if''(\mathbf{I})$) sind proportional zu den Strukturfaktoramplituden des Schweratom-Teilmodells und orthogonal zueinander. Somit lassen sich mit Hilfe dieser Differenzen das Schweratom-Teilmodell lösen und aufgrund ihrer Orthogonalität auch die Phasen eindeutig bestimmen.

Alle erforderlichen Messungen können am selben Kristall aufgenommen werden, was Fehlerquellen wie Nicht-Isomorphie ausschließt. Zusätzlich sind die für die Phasierung genutzten Beiträge $f'(\mathbf{I})$ und $if''(\mathbf{I})$ fast nur abhängig von den inneren Elektronen der anomalen Streuer und relativ zur Auflösung praktisch konstant. Obwohl die Beträge der gemessenen Differenzen in der Größenordnung des Meßfehlers für Strukturfaktoramplituden liegen, sind so trotzdem oft sehr gute Phasen erzielbar.

2.6.3 Molekularer Ersatz

Alle bisher vorgestellten Wege, das Phasenproblem zu lösen, setzen mindestens die Aufnahme zweier Datensätze voraus. Ist jedoch die Struktur eines eng verwandten Proteins bekannt, so kann man versuchen, dieses als erstes Modell heranzuziehen und so die Phaseninformation der gelösten, verwandten Struktur mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden zu kombinieren. Diese Methode bezeichnet man als „Molekularen Ersatz“. Erfahrungsgemäß darf hierbei die Standardabweichung der C^α -Atom-Positionen nicht mehr als etwa 1 Å betragen und die Sequenzidentität sollte 20-30 % übersteigen. Oft werden diese Bedingungen von strukturell zu untersuchenden Enzym-Substrat oder Enzym-Inhibitor Komplexen und verwandten Proteinen aus anderen Organismen erfüllt. Die exponentiell ansteigende Zahl der gelösten Strukturen (siehe Abbildung 10) erhöht die Chancen, ein geeignetes Modell für den molekularen Ersatz zu finden, ständig.

Das zu behandelnde Problem ist also, eine bekannte Struktur aus seinem Kristallgitter in den Kristallaufbau des unbekanntes Proteins zu transferieren. Die Lösungsstrategie hierzu wurde von mehreren Forschern entwickelt (Hoppe, 1957) (Rossmann and Blow, 1962) (Huber, 1965). Eine korrekte Platzierung des Proteinmodells in der Elementarzelle erfordert eine richtige Orientierung und eine präzise Position. Diese Bewegung involviert also eine Rotations- und eine Translationsbewegung jeweils um drei Freiheitsgrade in der Elementarzelle. Eine dementsprechende sechsdimensionale Suche nach Übereinstimmung ist vom erforderlichen Rechenaufwand nicht praktikabel.

Wie bereits im Kapitel 2.6.1 beschrieben, beinhaltet die Patterson-Funktion (Patterson, 1934) die Gesamtheit aller Vektoren der einzelnen Atome - bezogen auf einen Ursprung - zueinander. Daher liegen alle Vektoren, die von Abständen von Atomen desselben Moleküls herrühren, relativ nah beieinander in Ursprungnähe. Man bezeichnet sie als „self-Patterson-vectors“. Die Vektoren, die von Atomabständen mit einem Nachbarmolekül ableitbar sind, werden „cross-Patterson-vectors“ genannt. Die self-Patterson-vectors enthalten die Information, die nötig ist, um das Proteinmodell im Raum richtig zu orientieren, während die „cross-Patterson-vectors“ die Information für die Positionierung in der Elementarzelle enthalten.

Die Formeln 15 und 16 geben ausgehend von einem Atom an Position $\mathbf{r}=(x,y,z)$, einem zweiten Atom an Position $\mathbf{r}+\mathbf{u}$ und einem den Abstand zwischen ihnen angehenden Vektor $\mathbf{u}=(u,v,w)$ zwei verschiedene Schreibweisen der Pattersonfunktion $P(\mathbf{u})$ wieder. Diese kann

als Selbstfaltung der Elektronendichteverteilung $\mathbf{r}(\mathbf{r})$ in der Elementarzelle verstanden werden.

$$P(u) = \int_r \tilde{n}(r) \tilde{n}(r+u) dr \quad (15)$$

$$P(u) = P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \cos 2\mathbf{p}(hu + kv + lw) \quad (16)$$

Wie in Formel 16 ersichtlich, ist die Patterson-Funktion eine Fourier-Summation mit den Intensitäten als Koeffizienten, da $|F_{hkl}|^2 \propto I_{hkl}$, und allen Phasenwinkeln α gleich null. Mit Hilfe der Patterson-Funktion ist es nun möglich, zunächst eine Rotations- und anschließend eine Translationssuche durchzuführen, mit anderen Worten, eine Suche im sechsdimensionalen Raum durch zwei Suchen im dreidimensionalen Raum zu ersetzen und so Rechenaufwand zu sparen.

Das Prinzip der Rotationssuche beruht darauf, das Suchmodell in kleinen Inkrementen in allen drei Raumrichtungen zu drehen. Hierbei werden zu jedem Schritt entsprechende Strukturfaktoren F_{calc} und eine zugehörige Patterson-Dichte errechnet, die mit der experimentell bestimmten Patterson-Dichte verglichen wird. Der Grad der Übereinstimmung wird anhand eines Korrelationskoeffizienten $C(P_{obs}, P_{calc})$ quantifiziert.

$$C(P_{obs}, P_{calc}) = \int_u P(|F_{obs}|^2, u) \times P(|F_{calc}|^2, u) du \quad (17)$$

Ist die Orientierung des Modells in guter Übereinstimmung mit der wahren Orientierung des Moleküls im Kristall, so ergibt sich ein deutlich vom Rauschen abgehobenes Signal in der in Gleichung 17 gezeigten Funktion.

Ist so die korrekte Orientierung des Moleküls gefunden, wird in der sich anschließenden Translationssuche das nun richtig orientierte Modell wiederum inkrementweise durch den dreidimensionalen Raum in der Einheitszelle geschoben. Ähnlich wie bei der Rotationssuche wird auch hier wieder für jeden Schritt die Übereinstimmung der Pattersondichten geprüft und mit Hilfe des Korrelationsfaktors bewertet.

Parallel zur Einschätzung der Richtigkeit von Lage und Orientierung des Modells in der Elementarzelle über den Korrelationsfaktor, kann dies bei der Translationssuche auch über den kristallographischen R -Faktor (Gleichung 18) geschehen

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{obs,hkl}| - k |F_{calc,hkl}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{obs,hkl}|} \quad (18)$$

Eine klar identifizierte Strukturlösung über den molekularen Ersatz wird sich im Korrelationsfaktor deutlich positiv und im R -Faktor deutlich negativ von der zweitbesten Lösung unterscheiden.

Abschließend sei bemerkt, daß die Zerlegung des sechsdimensionalen Suchvorgangs in zwei dreidimensionale Suchen zu einer Verringerung des Kontrastes bei der Patterson Rotationssuche führt. Ab und zu ist es möglich, durch Symmetrieüberlegungen einige Dimensionen von der Suche auszuschließen, so daß letztendlich eine rechnerisch durchführbare $6-n$ – dimensionale Suche zu bewältigen bleibt. In Grenzfällen kann eine so modifizierte Suche zum Erfolg führen, wo die normale Pattersonsuche kein verwertbares Ergebnis liefert.

2.7 Elektronendichtemodifikation und Modellentwicklung

Unter Zuhilfenahme der berechneten Phasen \mathbf{a}_{exp} und der gemessenen Strukturfaktoramplituden $|F_{obs}|$ kann eine erste Elektronendichtekarte errechnet werden. Diese ist häufig nur von geringer Qualität. Da aber eine möglichst gute Elektronendichte ihre Interpretation durch ein Proteinmodell vereinfacht und andererseits ein gutes Modell eine bessere Elektronendichte bewirkt, kann man durch Einbringen von zusätzlichen Informationen die Qualität der Elektronendichtekarte steigern. Aus dem verbesserten Modell lassen sich genauere Phasenwinkel \mathbf{a}_{mod} berechnen, die zusammen mit den gemessenen $|F_{obs}|$ die Ermittlung einer verbesserten Elektronendichtekarte ermöglichen. Dieser beschriebene Zyklus wird bis zur Konvergenz wiederholt.

Verschiedene Methoden werden neben der reinen Weiterentwicklung des Proteinmodells eingesetzt, um die experimentelle Elektronendichte zu verbessern.

Zunächst ist die Elementarzelle aufgeteilt in Bereiche, die von Protein besetzt sind und andererseits Bereiche, die von Wasser aufgefüllt sind. Diese Bereiche können nach einem Algorithmus von B.C. Wang bestimmt werden (Wang, 1985). Die Elektronendichte wird in diesen wäßrigen Bereichen auf einen konstanten, physikalisch sinnvollen Wert gesetzt („solvent flattening“). Nach Matthews kann hierfür der relative Solvensgehalt der Elementarzelle bestimmt werden (Matthews, 1968).

Liegt das zu untersuchende Protein als Multimer vor, von denen mehrere Monomere aufgrund von nicht-kristallographischer Symmetrie die asymmetrische Einheit bilden, so kann man hier die Elektronendichten zwischen gleichen Monomeren mitteln (Kleywegt and Read, 1997). Dieses Verfahren relativiert aufgetretene Fehler bei der Phasenbestimmung.

Es ist bekannt, daß die relative Anzahl der Gitterpunkte in der Elektronendichtekarte die einen bestimmten Wert aufweisen, nur von der Auflösung des Datensatzes, nicht aber vom Protein selbst abhängen (Zhang and Main, 1990). Durch sogenanntes „histogram matching“ kann das experimentelle Elektronendichtehistogramm an das optimale Histogramm angepaßt und so eine Verbesserung der Elektronendichte erzielt werden.

Weitere Methoden sind die Skeletonisierung (Baker *et al.*, 1993), die Anwendung der Sayre'schen Gleichung (Sayre, 1974) (Zhang and Main, 1990) und das sogenannte „solvent flipping“ (Bricogne, 1974).

Der effektivste Weg, die experimentelle Dichte zu verbessern, ist die Entwicklung eines Proteinmodells. Leistungsfähige Computer sind in der Lage, die errechnete Elektronendichte dreidimensional darzustellen. Zunächst wird versucht, in dieser leeren Elektronendichtekarte Sekundärstrukturelemente wie α -Helices oder β -Faltblätter zu erkennen und als poly-Alanin-Kette in das Modell einzubauen. Berechnet man die Elektronendichtekarte mit den sich ergebenden Phasenwinkeln \mathbf{a}_{mod} neu, so wird sie sich qualitativ verbessern. Ist das initiale Modell noch sehr unvollständig, so kann man durch Phasenkombination mit den experimentell bestimmten Phasen eine verbesserte Elektronendichtekarte erzielen. Man versucht nun, in dieser Elektronendichtekarte entsprechende Konnektivitäten zwischen den Sekundärstrukturelementen zu erkennen und wiederum als Poly-Alanin Kette zu modellieren. Nach einigen Interpretations-Zyklen sollte es möglich sein, die Proteinkette vollständig zu verfolgen. Es folgt der Einbau der Seitenketten, deren Erkennung die sich stetig verbessernde Qualität der Elektronendichtekarte ermöglicht.

Bei einer experimentellen Elektronendichtekarte, die durch molekularen Ersatz erhalten wurde, beginnt man nicht mit einer leeren Dichte, sondern mit dem Modell, das zur Phasierung verwendet wurde. Man entfernt nun die Bereiche aus diesem Modell, die sich von dem kristallisierten Protein unterscheiden. Nach einer Neuberechnung der Elektronendichte beginnt man, die veränderten Bereiche im Molekül - wie oben beschrieben - neu zu modellieren.

Beim gesamten Vorgang des Modellbaus ist es entscheidend, daß mit jedem Zyklus eine Verbesserung der neu resultierenden Elektronendichtekarte einhergeht. Interpretiert man diese falsch, so führt dies zu einer Verschlechterung der Phasenwinkel, und dies verhindert einen erfolgreichen Fortschritt der Arbeit. Es sei daher angeraten, mit dem Modellbau sehr konservativ voranzuschreiten und nur eindeutig identifizierbare Objekte in das Protein-Modell neu aufzunehmen.

Kürzlich wurden auch automatisierte Varianten des Modellbaus entwickelt. Kurz erwähnt seien hierzu die Skeletonisierung der Elektronendichtekarte zur Erleichterung der Auffindung von Sekundärstrukturelementen (Swanson, 1994), die automatische Erkennung der optimalen Seitenkettengeometrie (Jones *et al.*, 1991) und das bis zur Konvergenz zyklische Durchlaufen von Modellbau und Verfeinerungsschritten (Lamzin and Wilson, 1997). Für das letztgenannte Verfahren sind allerdings noch Daten gemessen bis zu etwa 2 Å Auflösung erforderlich. Allerdings gibt es hier in letzter Zeit erheblichen Entwicklungsfortschritt, so daß möglicherweise in Kürze auch Elektronendichtekarten, ermittelt bei geringerer Auflösung, elektronisch interpretiert werden können.

2.8 Verfeinerung des molekularen Modells

Nach der ersten Elektronendichtekarteninterpretation, sowie nach jedem Zyklus der Modellweiterentwicklung, wird das vorläufige Model gegen die bestimmten Strukturfaktoramplituden $|F_{obs}|$ verfeinert, um diese in bessere Übereinstimmung mit den berechneten Strukturfaktoramplituden $|F_{calc}|$ zu bringen. Da aber die Anzahl der experimentell bestimmten $|F_{obs}|$ die Anzahl der zu bestimmenden Parameter nicht deutlich genug übersteigt, müssen zusätzliche Faktoren in diese Verfeinerungsrechnung mit eingehen. Die von R. Engh und R. Huber 1991 entwickelten Standard-Parameter für Bindungswinkel und

Bindungslängen (Engh and Huber, 1991) werden daher als zusätzliche Komponente in die Kraftfeldberechnung zur Modell-Verfeinerung mit aufgenommen.

Durchgeführt wird nun ein sogenanntes „positional refinement“, wo die Lage der einzelnen Atome an die Orte maximaler Elektronendichte angepaßt wird. Hierbei wird sowohl das Kraftfeld, verursacht durch Elektronendichtgradienten, als auch ein zusätzliches Kraftfeld, beruhend auf den Engh & Huber – Parametern, berücksichtigt. Ein zweiter Verfeinerungsschritt beruht auf dem Grad der thermisch bedingten Delokalisation vom Mittelwert der Atomposition. Dieses sogenannte „B-factor-refinement“ wird eingegrenzt durch die Bedingung, daß in der Struktur benachbarte Atome eine ähnliche Dynamik aufweisen müssen. Um einer Verfeinerung gegebenenfalls zu ermöglichen, ein lokales energetisches Minimum zu überwinden, oder, mit anderen Worten, den Konvergenzradius der Verfeinerung zu erhöhen, gibt es das Mittel des „simulated annealing“ (Brünger *et al.*, 1990). Hierbei wird das vorläufige Modell unter Beachtung geometrischer und kristallographischer Grenzen mittels molekulardynamischer Rechnungen bis auf 3000-5000 K erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, so daß die Atome zunehmend geringer um ihre Gleichgewichtsposition schwingen.

Um die Qualität eines Modells zu beurteilen, gibt es neben dem *R*-Factor (*R*) aus Gleichung 18 auch noch den sogenannten freien *R*-Faktor (*R_{free}*) (Brünger, 1992). Dieser wird aus 5 % der gemessenen Reflexe berechnet, die nicht in die Verfeinerungsrechnungen mit einbezogen werden. In einem richtigen Modell sollte bei guter Datenqualität nach der Verfeinerung der Zahlenwert des *R*-Faktors das Zehnfache des Zahlenwertes der Auflösung nicht übersteigen und der *R_{free}* –Wert nicht mehr als 5 % über dem *R*-Faktor liegen. Zusätzlich sollte die Standardabweichung der Bindungslängen im Modell von den Idealbindungslängen nicht größer sein als 0.010 Å.

3 Kristallstrukturen der Tryptase Isoformen **Ia und **II** im Komplex mit den bifunktionalen Inhibitoren BYK150640, BYK76935 und NS222**

3.1 Vorbemerkungen

Mastzellen sind, wie vorstehend in Abbildung 3 gezeigt, der Zelltyp, der wesentlich die initiale Immunantwort bestreitet. Der Inhalt der Mastzell-Granula ist hauptsächlich verantwortlich für die direkt erfolgende allergische Reaktion (siehe auch Kapitel 1). Tryptasen stellen bis zu 90 % des Proteinanteils dieser Granula dar. Wie anhand von Häufigkeitsuntersuchungen auf der mRNA-Ebene gezeigt wurde, sind β -Tryptasen die Tryptase-Isoform, die vornehmlich in Mastzellen exprimiert wird (Xia *et al.*, 1995). Hierbei übersteigt das Expressionsniveau der β -Tryptasen das der α -Tryptasen um das Doppelte.

Serinproteinasen, wie etwa diejenigen, die die Blutkoagulationskaskade oder das Komplementsystem darstellen, sind durch eine genaue Balance von Zymogen-Aktivierung und Inhibition durch Serpine („serine proteinase inhibitors“) streng reguliert (Travis and Salvesen, 1983). Serinproteinasen, wie Neutrophil-Elastase, CathepsinG oder „prostate specific antigen“, die direkt als reife Proteinase sekretiert werden, werden ebenfalls schnell durch in der Lunge oder im Serum enthaltene Serpine inhibiert (Travis, 1986) (Lilja, 1997). Umso erstaunlicher ist es daher, daß bis heute keine endogenen Inhibitoren gefunden worden sind, die in der Lage wären, humane β -Tryptasen zu regulieren.

Aufgrund der von unserer Gruppe gelösten Kristallstruktur der humanen β II-Tryptase waren wir in der Lage, für diesen Umstand eine Erklärung vorzuschlagen (Pereira *et al.*, 1998). Basierend auf der aus der Kristallstrukturanalyse resultierenden Elektronendichtekarte war es möglich, ein flaches, quadratisches Tetramer mit einer intrinsischen pseudo-222-Symmetrie als aktive Tryptase-Konformation zu postulieren. Die aktiven Zentren der vier Tryptase Monomere zeigen hierbei in das Innere einer zentralen Pore. Die räumlichen

Ausmaße dieser zentralen Pore sind so gering, daß es den meisten proteinogenen Inhibitoren unmöglich ist, zum aktiven Zentrum vorzudringen.

Der Regulation der humanen β -Tryptase scheint daher, wie in Abbildung 6 gezeigt, eher dem Gleichgewicht zwischen dem inaktiven Monomer und dem Glykosaminoglykan-stabilisierten Tetramer zu obliegen. Verschiedene Einflüsse wie pH-Wert, Ionenstärke und Glykosaminoglykan-Konzentration beeinflussen hierbei die Gleichgewichtslage (Alter *et al.*, 1987; Lindstedt *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 1998; Schwartz and Bradford, 1986). Die initiale Regulation der Tryptase direkt nach ihrer Expression und Heparin-abhängiger Tetramerisierung erfolgt durch Kompartimentalisierung. Hierbei werden die aktiven, Heparin-stabilisierten β -Tryptase-Tetramere zunächst in den Granula der Mastzelle gelagert und so an ihrer proteolytischen Aktivität gehindert. Erst ihre Freisetzung - folgend auf die Aktivierung der Mastzelle - erlaubt β -Tryptase-Aktivität im umgebenden Medium. Allerdings beschränkt die geringe Proteoglykan-Konzentration die Lebensdauer des β -Tryptase-Tetramers an seinem Wirkort und ist somit Teil des Tryptase-Regulations-Mechanismus. Mit dieser Vorstellung konsistent ist die Beobachtung, daß Glykosaminoglykan-Antagonisten, wie Neutrophil-Laktoterrin, Myeloperoxidase und Antithrombin III in der Lage sind, die β -Tryptase-Aktivität *in vitro* zu reduzieren (Rice *et al.*, 1998) (Alter *et al.*, 1990) (Elrod *et al.*, 1997) (Cregar *et al.*, 1999).

Die enorme klinische Relevanz, die Tryptase für verschiedenste Krankheiten, allen voran Asthma, hat, macht die Inhibition von β -Tryptasen als Alternative zur Cortisonbehandlung zu einer attraktiven und sehr stark konkurrierend bearbeiteten pharmazeutischen Aufgabenstellung. Viele Gruppen haben bisher versucht, effektive Tryptase-Inhibitoren zu entwickeln (Sturzebecher *et al.*, 1992) (Caughey *et al.*, 1993) (Ono *et al.*, 1999) (Burgess *et al.*, 1999) (Wright *et al.*, 1999) (Schwartz, 1990) (Clark *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1996) (Blair *et al.*, 1997) (Combrink *et al.*, 1998; Erba *et al.*, 2001) (Schaschke *et al.*, 2001). Die meisten der bisher synthetisierten Verbindungen eignen sich sehr gut, um β -Tryptasen im Rahmen von *in vitro*-Studien selektiv zu inhibieren. Ein als Anti-Allergie-Präparat einsetzbares Molekül konnte bisher allerdings noch nicht erfolgreich entwickelt werden.

Für das Design von potenten β -Tryptase-Inhibitoren ist es von entscheidender Bedeutung, daß diese die Bindung zu Tryptasen der Bindung zu anderen, ähnlichen Trypsin-artigen Serinproteinasen um mehrere Größenordnungen bevorzugen. Eine wichtige Rolle

hierbei spielen die Kopfgruppen der jeweiligen Inhibitoren und ihre Paßgenauigkeit für das aktive Zentrum der Tryptase-Monomere. Außer dem Proteasom (Groll *et al.*, 1997) ist Tryptase die einzige oligomerische Proteinase in Eukaryonten mit einer bekannten und gut definierten Geometrie der aktiven Zentren zueinander. Das besondere Arrangement der vier aktiven Zentren im β -Tryptase-Tetramer bietet die einzigartige Gelegenheit, bifunktionale Inhibitoren zu entwickeln, die die Lücke zwischen den aktiven Zentren überbrücken. Das Prinzip der Multifunktionalität wurde zunächst in der Chelat-Chemie etabliert (Page and Jencks, 1971) (Spike and Parry, 1953) und später in der Natur als ein generelles Prinzip entdeckt, um Selektivität und Bindungsaffinität in molekularen Erkennungsprozessen zu erhöhen (Crothers and Metzger, 1972) (Mammen *et al.*, 1998). Da sich Trypsasen und andere Trypsin-artige Serinproteinasen in Bezug auf die Architektur der Substratbindungsstellen stark ähneln, ist es ein entscheidender Vorteil, den speziellen Aufbau des β -Tryptase-Tetramers für das Design von multifunktionalen Inhibitoren zu nutzen. Hierbei erhöht sich nach den von Mammen und Jencks postulierten Grundsätzen die inhibitorische Potenz eines n-funktionalen Inhibitors um n Größenordnungen (Mammen *et al.*, 1998) (Jencks, 1981). Eine Bifunktionalität eines etwaigen β -Tryptase-Inhibitors würde sich also entscheidend positiv auswirken. Allerdings ist der tatsächliche Beweis der wirklich bivalenten Bindung eines entsprechend entworfenen Inhibitors bisher in keinem Fall erbracht worden.

In diesem Kapitel sollen die Kristallstrukturen von zwei bisher ungelösten β -Tryptase-Isoformen, der β Ia-Tryptase und der β III-Tryptase vorgestellt werden. Beide Isoformen werden in Mastzellen in großen Mengen exprimiert. Die Kristallstrukturen erlaubten es, die nativ relevante β -Tryptase-Tetramer-Architektur eindeutig zu bestimmen. Die in der Welt der Serinproteinasen einzigartigen Eigenschaften der β -Tryptase-Struktur werden vorgestellt. Gemeinsamkeiten und Unterschiede der einzelnen β -Tryptase-Isoformen werden verglichen und diskutiert.

Diese Isoformen wurden als Komplex mit drei verschiedenen, bifunktionalen Inhibitoren kristallisiert. Die entsprechenden Kristallstrukturen stellen die ersten gelösten Kristallstrukturen von bivalent inhibierten Trypsasen dar und dienen ferner dazu, die molekulare Komposition dieser Inhibitoren als Leitstrukturen zu etablieren und weiter zu optimieren.

3.2 Materialien und Methoden

3.2.1 Klonierung und Expression

Hier geschildert ist das von F. Zettl entwickelte Protokoll zur Tryptase-Aufreinigung (unpubliziert). Zur Expression der Tryptase-Isoformen β Ia-Tryptase und β III-Tryptase im Hefestamm *pichia pastoris* wurde die jeweils entsprechende cDNA in den Expressionsvektor pPICZA α kloniert. Das Klonierungsschema ist in Abbildung 19 dargestellt.

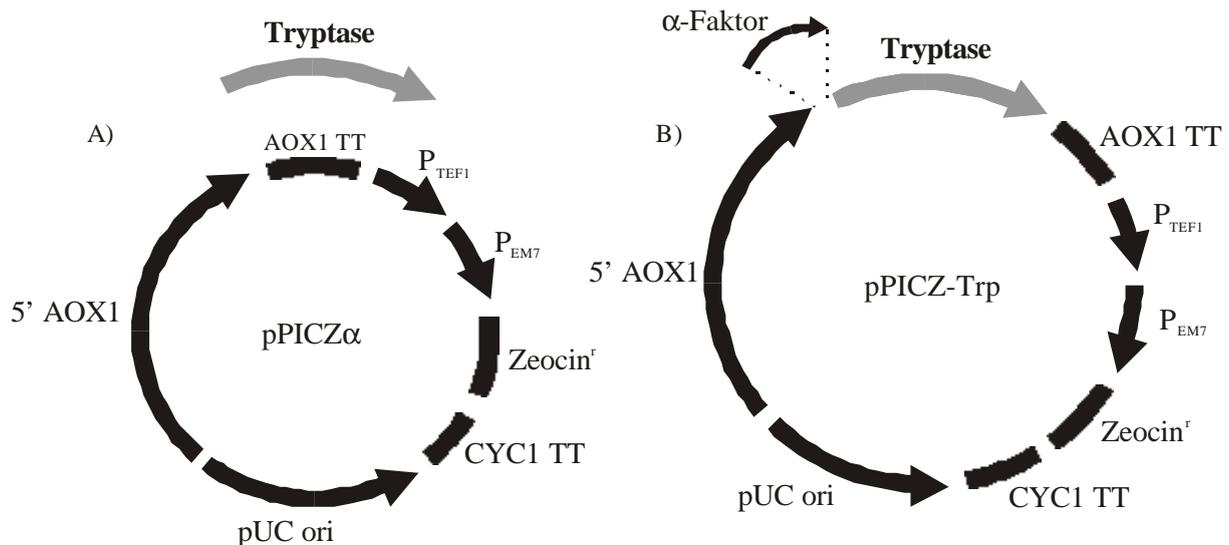


Abb. 19: Vektor-Konstrukt zur Expression der Tryptase-Isoformen

Die Tryptase cDNA wurde in einen pPICZ α -Vektor kloniert (Teilbild A). Das fertige Konstrukt ist in Teilbild B gezeigt. Das α -Faktor „leader-peptide“ ermöglicht die Sekretion des exprimierten Proteins. Die Zeocin-Resistenz dient zu Selektionszwecken.

pPICZA α ist ein Hefe-Expressionsvektor von einer mit 3.6 kbp relativ geringen Größe, der speziell für die starke Über-Expression und anschließende Sekretion von Proteinen entwickelt wurde. Die Über-Expression der klonierten Tryptase-Isoform wird durch den dem Gen vorgeschalteten 942 bp langen AOX1-Promotor ermöglicht, dessen Aktivität durch Methanol-Zugabe induzierbar ist. Die Präsenz des α -Faktor-Propeptids, das als „leader-

peptide“ zusammen mit der Tryptase exprimiert wird, erlaubt den Transport des klonierten Proteins aus dem Cytosol, und wird dann, nach erfolgter Sekretion, abgespalten.

Der Ligationsansatz wurde in *E. Coli* DH5 α -Zellen elektrotransformiert und auf Zeocin enthaltenden LB-Agar-Platten ausgestrichen. Zeocin ist ein Mitglied der Bleomycin/Phleomycin-Familie, das aus *Streptomyces* isoliert wird. Es handelt sich hierbei um ein Breitband-Antibiotikum mit einer hohen Toxizität gegen Bakterien, Pilze und Säugetierzellen. Diese Wirkung ist durch die Eigenschaft des Zeocins bedingt, DNA-Stränge zu spalten. Eine Zeocin-Resistenz entsteht in den erfolgreich klonierten Konstrukten durch die Expression des *Sh ble* Gen-Produktes (*Streptoalloteichus hindustanus* Bleomycin Gen), eines 13.7 kDa Proteins, das Zeocin komplexiert und so dessen toxische Wirkung unterbindet.

Der erfolgreich klonierte Vektor wurde in *pichia pastoris*-Zellen elektrotransformiert, die dann auf Zeocin enthaltenden „Yeast Extract Peptone Dextrose“ (YPD)-Agarplatten (1% Hefe-Extrakt, 2% Peptone, 2% Dextrose, 2% Agar, Zeocin) ausgestrichen wurden. Die Tryptase-Expression erfolgte im Fermenter nach dem in Abbildung 20 gezeigten Fermentationsschema. Von den YPD-Platten wurde eine Hefe-Kolonie ausgewählt und in BMGY-Medium (1% Hefe-Extrakt, 2% Peptone, 100 mM Kalium-Phosphat, pH 6, 1.34% „Yeast Nitrogen Base“, 1% Glycerin) und später in BMGH-Medium zu einer Hefe-Kultur herangezogen. Mit dieser erfolgte die Inokulation eines Basalsalzmediums in einem Fermenter. Die Amplifikation dieser Kultur bis zu Zelldichten von etwa 80 g/l wurde durch Glycerin-Fütterung erreicht und schließlich die Tryptase-Expression durch Methanol-Fütterung induziert.

Nach Beendigung der Expression wurden die Hefezellen abzentrifugiert, das Volumen des Fermentationsmediums mit Hilfe der Ultrafiltration eingeengt und anschließend über eine Kationenaustausch-Chromatographiesäule gegeben. Durch Anlegen eines Natriumchloridgradienten eluierten die an das Säulenmaterial gebundenen Tryptase-Tetramere langsam. Der Fortschritt dieses Vorganges wurde mit Hilfe von Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 280 nm beobachtet. Ein typisches resultierendes Elutionsprofil ist in Abbildung 21 dargestellt.

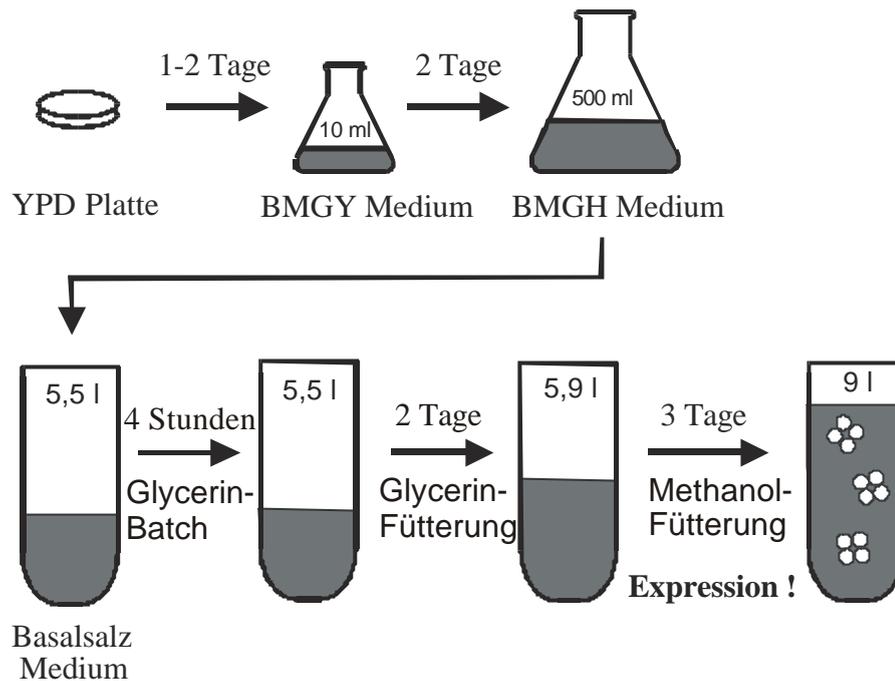


Abb. 20: Expression der Tryptase-Isoformen

Dargestellt ist ein Schema, nach dem die Tryptasen exprimiert wurden. Nach dem Anziehen einer Hefe-Kleinkultur wurde das Volumen des Mediums schrittweise auf 9l erhöht. Die Tryptase-Expression wurde durch Methanol-Fütterung induziert.

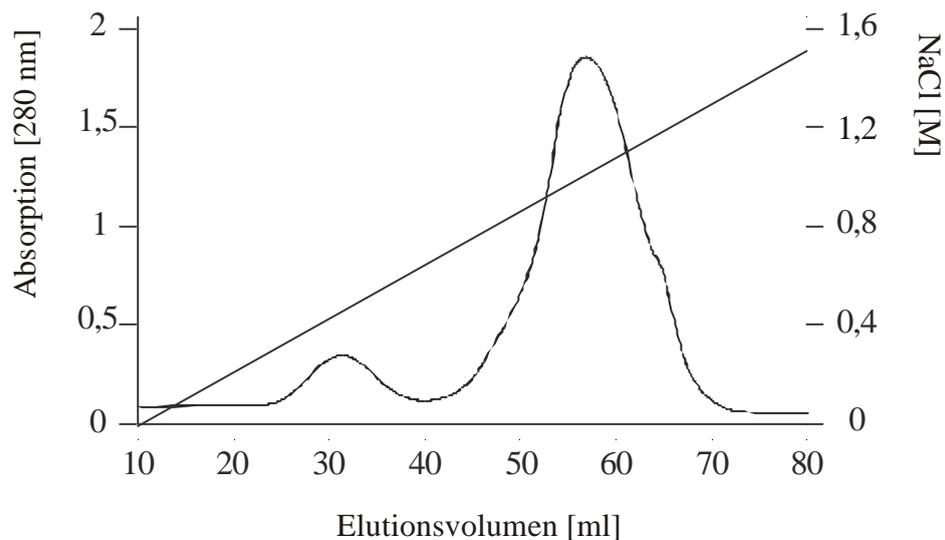


Abb. 21: Elutionsprofil der Kationenaustauschersäule

Durch Anlegen eines steilen NaCl-Gradienten wurden die an das Säulenmaterial gebundenen Tryptasen in zwei „peaks“ (hauptsächlich Monomere und Tetramere) eluiert.

3.2.2 Selektion von niedrig glykolysierter Tryptase

Homogenität des zu kristallisierenden Materials ist für den Erfolg der Kristallisation von erheblicher Bedeutung. Bei den exprimierten Tryptase-Isoformen handelt es sich in allen Fällen um Glykoproteine mit jeweils zwei oder drei Glykolysierungsorten pro Tryptase-Monomer. Der Vorgang der Glykolysierung in der Zelle findet jedoch nur selten vollständig statt, so daß mit hoher Wahrscheinlichkeit immer einige Glykolysierungsorte unbesetzt bleiben. Zuckerreste auf der Moleküloberfläche stellen hydrophile Zentren dar. Eine ungleichmäßige Besetzung dieser Zucker-Bindungsstellen beeinträchtigt die Kristallisationsaussichten schwerwiegend. Daher wurde für die Kristallisation lediglich Material verwendet, das möglichst gering glykolysiert war, um so eine möglichst hohe Homogenität der Probe zu erzielen. Abbildung 22 zeigt ein SDS-Gel nach Laemmli (Laemmli, 1970), auf dem die einzelnen, Tryptase enthaltenden Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie aufgetragen sind. Die stark verschwommenen Banden im hochmolekularen Bereich signalisieren starke Glykolysierung. Daher wurden die mit F1 zusammengefaßten Fraktionen für Kristallisationsexperimente verworfen und lediglich der mit F2 bezeichnete Anteil der Tryptasepräparationen weiter verwendet.

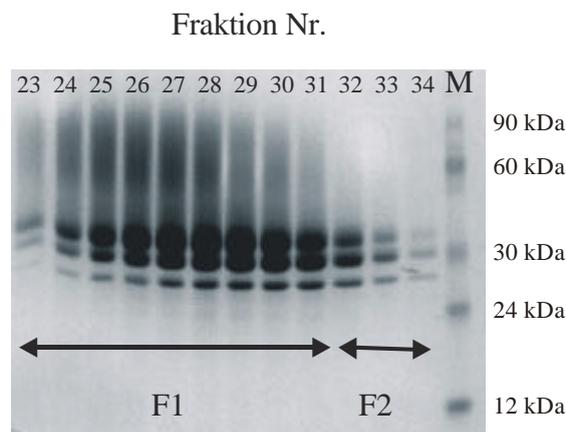


Abb. 22: SDS-Gel zur Selektion niedrig glykolysierter Tryptase-Tetramere

Das Gel zeigt die von der Kationenaustauschersäule eluierten Fraktionen 23-34 die auf einem reduzierenden SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden. M bezeichnet einen mit aufgetragenen Molekulargewichtsmarker. Die Tryptase-Banden migrieren auf dem Gel bei etwa 30 kDa. Die mit F2 bezeichneten Fraktionen wurden als niedrig glykolysiert vereinigt und für die Kristallisation verwendet. Mit F1 bezeichnete Fraktionen wurden für die Kristallisation verworfen.

3.2.3 Inhibition

Ein Zusatz von Proteinase-Inhibitoren zum Schutz des exprimierten Proteins vor dessen proteolytischem Abbau während der Präparation war nicht erforderlich.

Für die Co-Kristallisation bifunktionaler Inhibitoren mit β -Tryptasen wurden die β -Tryptasen mit den jeweiligen Inhibitoren in Hinblick auf die verbleibende Restaktivität der Proteinasen genau titriert. So sollte eine zu hohe Konzentration der Inhibitoren vermieden werden, da dies möglicherweise einen anderen als den bifunktionalen Bindungsmodus fördern könnte.

3.2.4 Heparinbindung

β -Tryptase-Tetramere benötigen für ihre Stabilität die Bindung von Proteoglykanen, wie zum Beispiel Heparin, an ihre molekulare Oberfläche. Da für die erfolgreiche Stabilisierung dieser Tetramere mindestens zwölfgliedrige Heparinketten erforderlich (Humphries *et al.*, 1999), diese aber äußerst schwierig homogen zu synthetisieren sind, ist versucht worden, die Verwendung von Heparin bei der Kristallisation zu umgehen. Dies gelang durch den Einsatz von Hochsalzbedingungen, die zwischen den einzelnen Monomeren existierende, hydrophobe Wechselwirkungen stärken und daher das β -Tryptase-Tetramer auch ohne Bindung zu Proteoglykanen stabil bleibt. Die von der Kationenauschersäule eluierten, niedrig glykolysierten Tryptase-Fractionen wurden daher mit Natriumchlorid auf einen Salzgehalt von 1.5 M eingestellt.

3.2.5 Einengung der Tryptase-Fractionen

Die Protein-Konzentration der β -Tryptase-Präparationen wurde in Zentrifeps durch Ultrafiltration gegen eine Membran mit einer Porengröße, die dem Umfang eines globulären Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa entsprach, erhöht. So ist es möglich, einseitig der Membran das Protein aufzukonzentrieren, während reiner Puffer durch die Membran hindurchtreten und dann verworfen werden kann. Auch durch den Zerfall von

Tetrameren eventuell entstandene Monomere können so von der Präparation abgetrennt werden. Der Vorgang der Ultrafiltration wurde durch den Einsatz einer Zentrifuge und Zentrifugation bei etwa 1000facher Gravitationskraft beschleunigt. Hierbei wurde die Probe fortlaufend auf Niederschlagbildung optisch kontrolliert und der ansteigende Proteingehalt der Präparation durch Proteinkonzentrationsbestimmungen nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Eine für die Kristallisation ausreichende Proteinkonzentration von 6.6 mg/ml konnte so mühelos erreicht werden, ohne daß Teile der Probe aufgrund der erhöhten Konzentration präzipitierten. Um eventuelle Schwebstoffe zu eliminieren, wurde die zu kristallisierende Präparation in einem abschließenden Schritt durch eine Membran mit einer Porengröße von 0.22 µm filtriert.

3.2.6 Kristallisation

Die frisch präparierte Proteinlösung konnte für Kristallisationsansätze lediglich erfolgreich über ein Zeitfenster von etwa drei Wochen eingesetzt werden. Vermutlich ist die Haltbarkeit des β -Tryptase-Tetramere in Lösung bei 4 °C und den beschriebenen Hochsalzbedingungen auf diesen kurzen Zeitraum begrenzt.

Für die Kristallisationsansätze wurden 1.5 µl der Proteinlösung mit 1.5 µl einer entsprechenden Präzipitanzlösung auf der Kristallisationsplattform einer ChrysChem-Platte (Charles Supper Co., USA) vorgelegt und nach der Methode des „sitzenden Tropfens“ gegen 500 µl der Präzipitanzlösung bei Raumtemperatur äquilibriert. Ideale Kristallisationsbedingungen wurden hierbei mit Hilfe der „Hampton-screens“ (Hampton Research, USA) und der „house-factorials“ (unpubliziert) ermittelt. Sowohl die „Hampton-screens“ als auch die in der Arbeitsgruppe Proteinkristallographie, R. Huber, Martinsried, entwickelten „house-factorials“ stellen eine Ansammlung verschiedener Präzipitanzen - kombiniert mit unterschiedlichen Puffern und Additiven - dar, die es oft ermöglichen, ein Protein hinsichtlich dessen Kristallisationseigenschaften zu charakterisieren. So war es schließlich möglich, Kristallisationsbedingungen zu ermitteln, unter denen kleine, stark verwachsene Kristallnadeln im Laufe von drei Tagen bei Raumtemperatur wuchsen. Ausgehend von dieser Bedingung konnte dann durch Versuchsreihen mit fein abgestimmten Variationen von pH-Wert, Präzipitanzkonzentration und Präzipitanzart das Kristallisationsverhalten optimiert werden. So entstanden mit einer Präzipitanzlösung, bestehend aus 28 % Polyethylenglykol (PEG)

4000, 0.08 M Magnesiumacetat in einem 50 mM MES Puffer, pH 6.6 im Laufe einer Woche kleine, annähernd würfelförmige Kristalle. Durch Überschichtung des Pufferreservoirs mit 50 µl Mineralöl (Sigma Chemicals) gelang es, die Kristallisationszeit auf etwa 10 Tage zu verlängern und dabei die Größe der resultierenden Kristalle positiv zu beeinflussen. So wuchsen nun annähernd kubische Kristalle mit einer Kantenlänge von etwa 0.01 mm. Mittels des Barthaars eines Kaninchens wurden einzelne dieser entstandenen Mikrokristalle aus dem Kristallisationsansatz gefischt und in einen frischen Kristallisationsansatz transferiert („macro-seeding“). Auf diese Weise sollte die erneute Kristallisation nun nur von einem einzigen Kristallisationskeim ausgehen, und so statt vieler kleiner, nur ein einziger großer Kristall entstehen. Im Laufe einer weiteren Woche wuchsen die so transferierten Mikrokristalle als Quader weiter bis zu einer für röntgenographische Untersuchungen hinreichenden Größe von etwa 110 µm x 110 µm x 80 µm heran. Bemerkenswert ist die kurze Haltbarkeit dieser Kristalle. Bereits etwa eine Woche nach Beendigung ihres Wachstums beginnen sich die Seitenflächen der Kristalle konkav zu verformen. Dieses Verhalten geht einher mit einer drastischen Verminderung ihrer Streuleistung.

3.2.7 Datensammlung

Die Ernte der gewachsenen Kristalle gestaltete sich aufgrund ihrer hohen inhärenten Instabilität und der Tatsache, daß sie häufig mit dem Boden der Kristallisationsschale verwachsen waren, als sehr schwierig. Mittels einer Skalpellspitze konnte der Boden dieser Kristallisationsschalen leicht deformiert und die Kristalle so gelöst werden, ohne sie zu zerbrechen. Ein einzelner Kristall wurde anschließend aus seiner Mutterlauge gefischt und in einer vorher silikonisierten Quarzkapillare (Mark-Röhrchen für röntgenographische Aufnahmen, W. Müller, Berlin) montiert. Leider konnten bei einer Rotationsaufnahme bei Raumtemperatur nur sehr wenige auswertbare Reflexe aufgenommen werden. Die hohe Intensität der Röntgenstrahlung verursachte offenbar binnen sehr kurzer Zeit eine erhebliche Kristallschädigung, die ihren Ausdruck in einer drastischen Reduzierung der Streuleistung fand. Diese Kristallschädigung wird zum großen Teil durch das Auftreten freier Radikale verursacht, die durch die Röntgenstrahlung generiert werden, sich durch den Kristall bewegen und dabei das Kristallgitter zerstören.

Durch die Verwendung von bei -180°C tiefgekühlter Kristalle für röntgenographische Untersuchungen kann die Kristallschädigung durch Röntgenstrahlung erheblich vermindert werden. Hierfür ist es erforderlich, daß das im Kristall enthaltene Wasser während des Friervorganges keine Mikrokristalle bildet, die den Proteinkristall zerstören würden, sondern im glasartigen Zustand gefriert. Durch das kurzfristige Eintauchen der Kristalle in sogenannte Kryoprotektantien, wie zum Beispiel verschiedene Zucker oder Alkohole, wird eine Eisbildung verhindert. Leider überstanden die β -Tryptase-Kristalle diesen Vorgang bei kaum einer verwendeten Kryoprotektanz. Durch langwierige Optimierungsvorgänge wurde das folgende Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe selbst diese sehr fragilen β -Tryptase-Kristalle für den Einfriervorgang vorbereitet werden können: Zu dem ein Volumen von $3\ \mu\text{l}$ umfassenden Kristallisationsansatz wurden über einen Zeitraum von einer Stunde genau alle 20 Minuten $0.1\ \mu\text{l}$ optisch reines L,L-2,3-Butandiol hinzugegeben, so daß letztendlich eine L-2,3-Butandiol-Konzentration von 10 % im Kristall vorlag. Nach einer Stunde wurde der so vorbereitete Kristall mit einer Haarschleife aus dem Kristallisationsansatz gefischt und schnell in flüssigen Stickstoff getaucht. So präparierte Kristalle waren in flüssigem Stickstoff problemlos über einen längeren Zeitraum lagerfähig.

Initiale, röntgenographische Untersuchungen wurden mit einem Kupfer-Drehanodengenerator (Rigaku RU 300, Hong-Kong), versehen mit einem Graphit Monochromator, vorgenommen. Die emittierte $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung wurde für die Rotationsaufnahmen um einen Drehwinkel von 1° verwendet und die auftretenden Reflexe mit einem 300 mm „image plate“ Detektor (Marresearch, Hamburg) aufgezeichnet. Während der gesamten Datenaufnahme wurde der Kristall unter Verwendung eines „cryostream cryosystems“ (Oxford Cryosystems, Oxford, U.K.) durch Bedampfen mit einem Stickstoffstrom bei einer Temperatur von 100 K gehalten. Die so aufgenommenen Datensätze waren für sämtliche Tryptase-Inhibitor-Komplexe im günstigsten Fall bis zu etwa $3.5\ \text{\AA}$ (β III-Tryptase + BYK150670) und im schlechtesten Fall nur bis zu etwa $7\ \text{\AA}$ (β III-Tryptase + NS222) aufgelöst und bestanden zudem aus oft stark verwischten Reflexen (zur Strukturformel der Inhibitoren siehe Abbildung 35). So ließen sie bestenfalls die Bestimmung der Raumgruppe und der Einheitszelldimensionen zu. Die Position der Inhibitoren war jedoch aus den resultierenden qualitativ schlechten Elektronendichtekarten nicht zu ermitteln.

Um die Qualität der Elektronendichtekarten zu erhöhen, war es erforderlich, die Auflösung der Datensätze zu verbessern. Die deutlich erhöhte Intensität der

Röntgenstrahlung am deutschen Elektronen-Synchrotron in Hamburg ist hierzu gut geeignet. Daher wurden sämtliche Ko-Kristalle an der „wiggler-beamline“ BW6, die an den DORIS-Ring gekoppelt ist, neu vermessen. Erheblich verbesserte Auflösungen von 2.4 Å für β Ia-Tryptase + BYK76935, von 2.3 Å für β III-Tryptase + BYK150640 und von 3.5 Å für β III-Tryptase + NS222 konnten auf diese Weise erzielt werden. Sämtliche Datensätze wurden in Abhängigkeit zur Kristallmosaizität und zur Raumgruppe über einen Gesamtmeßbereich von 180 ° in Winkelinkrementen von 0.8 ° pro Bild aufgenommen. Das Phänomen der bei dem am Drehanoden Generator aufgenommenen Datensatz auftretenden Verzerrung der Reflexe konnte durch die Datenaufnahme am Synchrotron eingeschränkt, jedoch nicht behoben werden.

3.2.8 Phasierung

Die Reflexe aller drei Datensätze wurden mit kristallographischen Rechenprogrammen ausgewertet. Unter Benutzung von MOSFLM, Version 6.1 (Leslie, 1991) wurden die Einheitszelldimensionen ermittelt und verfeinert, die Raumgruppe bestimmt und sämtliche Reflexe hinsichtlich ihrer Glaubwürdigkeit analysiert und integriert. Mit den Programmen SCALA und TRUNCATE der CCP4 suite (Collaborative Computational Project, 1994) wurden anschließend die integrierten Reflexe der einzelnen Bilder aufeinander skaliert und zu einem sämtliche Strukturfaktoramplituden F_{obs} beinhaltenden Datensatz zusammengefaßt.

Die Ermittlung der für die Strukturlösung erforderlichen Phasen erfolgte nach der Methode des Molekularen Ersatzes. Rechnerisch wurde dies mit dem Programm AMORE (Navaza *et al.*, 1998) unter ausschließlicher Verwendung der im Auflösungsbereich von 10 Å bis 4 Å befindlichen Reflexe bewerkstelligt. Die Phasenbestimmung nach der Methode des molekularen Ersatzes erfolgte zunächst nur für die β Ia-Tryptase + BYK76935 Co-Kristalle. Als Suchmodell wurde jeweils die Struktur des β II-Tryptase-Monomers (Pereira *et al.*, 1998) und die postulierte Struktur des β II-Tryptase Tetramers eingesetzt. Beide Suchmodelle führten zu der gleichen besten Lösung, die sich durch einen R-Faktor von 54.9 % und einen Korrelationsfaktor c von 0.39 auszeichnete und die sich deutlich von der zweitbesten Lösung ($c = 0.44$, $R = 40,1$ %) abhob.

Die Inspektion der Anordnung der Monomere in der Einheitszelle mit dem kristallographischen Programm MAIN (Turk, 1992) ergab eine Gesamtheit von zwölf

Monomeren pro Einheitszelle, die zu drei Tetrameren zusammengelagert sind. Bei den postulierten Atompositionen gab es keinerlei Überlappungen, und die Raumerfüllung war für Proteine nicht auffällig. Der Wassergehalt der Einheitszelle ist mit 46 % beziffert, was einem Matthews Koeffizienten (Matthews, 1968) von 2.24 entspricht. Beide Werte sind durchaus typisch für Proteinkristalle.

Die erhaltene Lösung der Struktur des β Ia-Tryptase + BYK76935-Komplexes wurde daher für richtig befunden. Da sowohl die Rotationssuche als auch die Translationssuche nicht stufenlos erfolgten, wurde die genaue Positionierung des erhaltenen initialen Modells rechnerisch durch einen „rigid body refinement“-Schritt und einen „simulated annealing“-Schritt abschließend korrigiert und verfeinert. Beide Modell-Verfeinerungsschritte wurden mit dem kristallographischen Programmpaket CNS (Brünger *et al.*, 1998) ausgeführt.

Aufgrund der hohen Kristallisomorphie zwischen allen drei Ko-Kristallen wurde das erhaltene initiale Modell für alle drei Komplexe verwendet. Die Phaseninformation aus diesem Modell in Verbindung mit der jeweils entsprechenden Gesamtheit der Strukturfaktoramplituden F_{obs} wurde zur Berechnung einer initialen Elektronendichtekarte in allen drei Fällen herangezogen

3.2.9 Modellbau und Verfeinerung

In einem ersten Schritt wurden automatisch mit Hilfe einer Programmfunktion von MAIN sämtliche sich außerhalb der berechneten Elektronendichte befindlichen Teile des initialen Modells in ihrer Besetzungszahl auf Null gesetzt. Ebenso wurde mit allen sich vom Modell unterscheidenden Aminosäuren verfahren. Die Besetzungszahl gibt an, zu wieviel Prozent die im Modell dargestellte Konformation real auch wirklich vertreten ist. Bei einer Besetzungszahl Null besitzt ein Rest zwar immer noch eine räumliche Ausdehnung, aber keinerlei kristallographische Wertigkeit mehr. So beeinflusst ein eventuell fehlerhaft positionierter Rest die Neuberechnung der Elektronendichte nicht, und das Auftreten eines „model bias“ wird verhindert. Ein dementsprechend modifiziertes Proteinmodell wurde dann in allen drei Fällen zur Berechnung einer aktualisierten Elektronendichtekarte herangezogen. Diese wies überall dort, wo sich die Proteinsequenzen des β II-Tryptase-Modells von der jeweils verwendeten Tryptase-Isoform unterscheiden, eine positive $F_{obs}-F_{calc}$ -Differenz-Elektronendichtekarte auf, die sowohl in ihrer Intensität als auch in ihrer räumlichen

Ausdehnung der veränderten Aminosäure entsprach. Dieses deutete ebenfalls auf eine korrekte Interpretation der Elektronendichte, beziehungsweise auf die Abwesenheit von „model bias“ hin. Basierend auf dieser neuen Elektronendichtekarte wurde das gesamte Modell korrigiert und die unterschiedlichen Aminosäuren ergänzt. Hierbei erwies es sich als nicht ausreichend, jeweils nur ein Tetramer oder gar nur einen Monomer zu bearbeiten und das Ergebnis auf alle anderen Monomere, beziehungsweise Tetramere, zu übertragen. Vielmehr verursachte die Ungleichheit der kristallographischen Umgebung der einzelnen Monomere im Kristall leichte Divergenzen, so daß bei jedem Verfeinerungszyklus alle ca. 3000 Reste in der Einheitszelle inspiziert und gegebenenfalls in ihrer Ausrichtung korrigiert werden mußten. Alle Aminosäuren wurden hierbei nur soweit als vollständig besetzt definiert, sofern ihre Position eindeutig in der Elektronendichtekarte erkennbar war.

Abwechselnd mit der manuellen Modellverbesserung wurde eine rechnerische Verfeinerung unter Benutzung der Molekulardynamik von CNS (Brünger *et al.*, 1998), einem „maximum likelihood target“ (Adams *et al.*, 1997) und den durch die Engh-Huber-Parameter (Engh and Huber, 1991) definierten idealen Bindungslängen und –winkel der Aminosäuren durchgeführt. Hierbei wurde hauptsächlich mit dem „positional refinement“ versucht, einen möglichst optimalen Kompromiß zwischen stereochemisch idealer Struktur und der Elektronendichtekarte zu erzielen. Durch eine Verfeinerung der *B*-Faktoren wurde die mehr oder weniger ausgeprägte thermische Schwingung der einzelnen Atome um eine Gleichgewichtsposition in das Modell mit einbezogen. Anfänglich wurden im Verfeinerungsverlauf zusätzlich schwache, nicht-kristallographische Symmetrie-Restriktionen (NCS) verwendet. Diese stellen ein Kraftfeld dar, das sowohl die einzelnen Monomere als auch die Tetramere zu einer untereinander gleichen Konformation hin bewegt. Im Verlauf der Verfeinerung gab jedoch die relative Änderung der *R*-Faktoren und des *R_{free}*-Wertes (Brünger, 1992) Anlaß, auf diese NCS-Einschränkungen zu verzichten.

Der gesamte Vorgang der Modellverfeinerung bestand aus mehreren Zyklen von manuellem Modellbau abwechselnd mit rechnerischer Optimierung bis zur Konvergenz im Hinblick auf den *R*-Faktoren und den *R_{free}*-Wert des Modells. Zu diesem Zeitpunkt war die Elektronendichte für die jeweils kokristallisierten Inhibitoren optimal, so daß die Struktur der Inhibitoren in das jeweilige Modell mit aufgenommen werden konnte. Während die idealen Konformationen der einzelnen Aminosäuren durch die Engh-Huber-Parameter (Engh and Huber, 1991) bereits eindeutig beschrieben sind, so mußten für die einzelnen Inhibitoren entsprechende optimale Parameter für Bindungslängen und –winkel erst noch definiert

werden. Dies geschah in Anlehnung an verwandte Strukturen in der Kleinmolekül-Strukturdatenbank „Cambridge Structural Database“ (CSD). In die nun folgenden Verfeinerungszyklen wurde eine „bulk solvent“-Korrektur mit einbezogen, und schließlich wurden im Falle des β Ia-Tryptase + BYK76935 Komplexes und des β III-Tryptase + BYK150640-Komplexes Wassermoleküle an in der Elektronendichtekarte definierten und sterisch korrekten Positionen in das Modell mit aufgenommen. Aufgrund der geringen Auflösung des Datensatzes der β III-Tryptase + NS222-Komplex-Kristalle wurde in diesem Fall auf den Einbau von Kristallwasser verzichtet.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Proteinreinigung

Die exprimierte Tryptase im Überstand der Hefekultur war vollständig prozessiert und lag sowohl in monomerischer als auch in tetramerischer Form vor. Im Fermentermedium selbst war der Zusatz von Heparin nicht erforderlich, um das Tetramer zu stabilisieren. Offenbar wird in den Hefezellen eine glukosaminoglykan-artige Verbindung produziert, die die erforderliche Stabilisation der β -Tryptase-Tetramere bewirkt. Die exprimierte Menge an β Ia-Tryptase betrug etwa 20 mg/l und an β III-Tryptase etwa 85 mg/l Fermentkultur. Die Selektion von niedrig glykolysiertem Protein erbrachte allerdings lediglich für die Kristallisation verwertbare 6.6 mg β Ia-Tryptase und 28 mg β III-Tryptase.

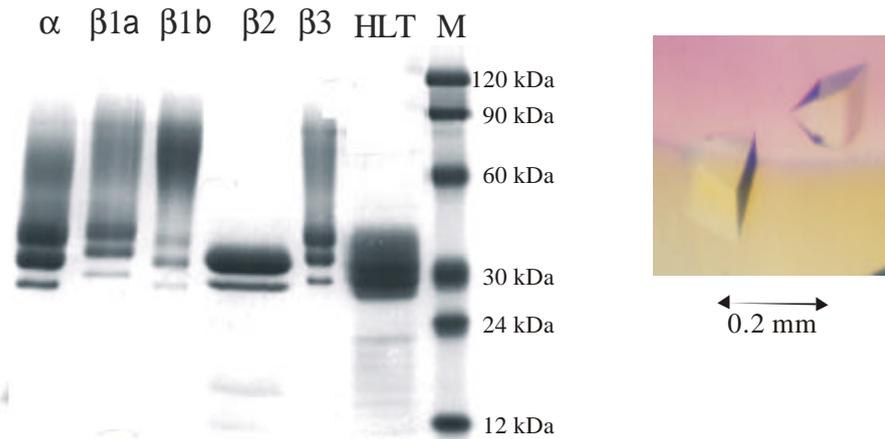


Abb. 23: Aufgereinigte Tryptase-Isoformen und resultierender β -Tryptase-Kristall

Gezeigt ist ein Western-Blot aller aufgereinigten Tryptase-Isoformen. M bezeichnet einen Molekulargewichtsmarker und HLT einen spezifischen Tryptase-Marker. Die Proben sind unterschiedlich stark glykolysiert - insbesondere β 1b-Tryptase zeigt eine extrem starke Glykolysierung. Im rechten Teilbild ist ein β III-Tryptase-Kristall gezeigt.

Abbildung 23 zeigt ein SDS-Gel, auf das sämtliche aufgereinigte Tryptase-Fraktionen aufgetragen wurden. Aus ihm geht klar hervor, daß die Selektion niedrig glykolysierter Tryptase-Tetramere bei unterschiedlichen Tryptase-Isoformen unterschiedlich erfolgreich war.

Die Einengung der verschiedenen Tryptase-Isoformen-Präparationen auf die für die Kristallisation verwendete Konzentration von 6.6 mg/ml verlief in allen Fällen problemlos und ohne Niederschlagsbildung.

3.3.2 Kristallisation

Die vorstehend beschriebenen Kristallisationsbedingungen führten in einem Zeitraum von etwa zwei Wochen zum Wachstum von Kristallen, von denen ein typisches Exemplar in Abbildung 23 gezeigt ist. Hierbei war sowohl die Größe als auch die äußere Form für alle drei β -Tryptase-Isoform-Inhibitor-Komplexe gleich.

Die Röntgenstrukturanalyse der drei Kristalltypen bestätigte deren weitgehende optische Isomorphie und ergab für alle drei Konstrukte jeweils die kristallographische Raumgruppe P1 mit sehr ähnlichen Einheitszelldimensionen: Für den β Ia-Tryptase-Komplex mit dem Inhibitor BYK76935 ergaben sich als Zellkonstanten $a = 109.6 \text{ \AA}$, $b = 109.2 \text{ \AA}$, $c = 110.1 \text{ \AA}$, $\alpha = 89.9^\circ$, $\beta = 89.4^\circ$, $\gamma = 119.8^\circ$, für den β III-Tryptase-Komplex mit dem Inhibitor BYK150640 wurden $a = 107.1 \text{ \AA}$, $b = 106.9 \text{ \AA}$, $c = 109.5 \text{ \AA}$, $\alpha = 89.8^\circ$, $\beta = 90.3^\circ$, $\gamma = 119.5^\circ$ gefunden und für den β III-Tryptase-Komplex mit dem Inhibitor NS222 wurden $a = 107.3 \text{ \AA}$, $b = 107.9 \text{ \AA}$, $c = 109.4 \text{ \AA}$, $\alpha = 89.9^\circ$, $\beta = 89.4^\circ$, $\gamma = 120.4^\circ$ als Zellkonstanten bestimmt.

Obwohl hierbei in jedem Fall die Winkel mit Größen von jeweils $a = b \neq c$, $\alpha \approx \beta \approx 90^\circ$ und $\gamma \approx 120^\circ$ das Vorliegen einer mindestens dreizähligen Symmetrie im Kristall erwarten lassen, kann aufgrund des Auftretens eines R_{merge} -Wertes von mindestens 25 % bei der Annahme einer entsprechenden Raumgruppe das Vorliegen eines trigonalen Kristallsystems ausgeschlossen werden.

Ein Matthews Parameter (Matthews, 1968) von 2.27, der einem Wassergehalt von 46 % im Kristall entspricht, ist in ausgezeichneter Übereinstimmung mit dem Vorhandensein von 12 Tryptase-Monomeren in der Einheitszelle des Kristalls. Dieser Befund ist bei der kristallographischen Raumgruppe P1 konsistent mit der Erwartung von einer asymmetrischen Einheit bestehend aus drei β -Tryptase-Tetrameren.

3.3.3 Datensammlung- und Auswertung

Die Statistik der rechnerischen Auswertung der am deutschen Elektronen-Synchrotron gemessenen Datensätze der drei β -Tryptase-Isoform-Inhibitor-Komplexe ist im Folgenden tabellarisch dargestellt.

	βIa-Tryptase + BYK76935	βIII-Tryptase + BYK150640	βIII-Tryptase + NS222
Zellkonstanten	$a = 109.6 \text{ \AA}$ $b = 109.2 \text{ \AA}$ $c = 110.1 \text{ \AA}$ $\acute{\alpha} = 89.9^\circ$ $\acute{\alpha} = 89.4^\circ$ $\gamma = 119.8^\circ$	$a = 107.1 \text{ \AA}$ $b = 106.9 \text{ \AA}$ $c = 109.5 \text{ \AA}$ $\acute{\alpha} = 89.8^\circ$ $\acute{\alpha} = 90.3^\circ$ $\gamma = 119.5^\circ$	$a = 107.3 \text{ \AA}$ $b = 107.9 \text{ \AA}$ $c = 109.4 \text{ \AA}$ $\acute{\alpha} = 89.9^\circ$ $\acute{\alpha} = 89.4^\circ$ $\gamma = 120.4^\circ$
Auflösung ^a	23,0-2.4 (2.4-2.62)	35.58-2.30 \AA (2.3-2.58 \AA)	38.63-3.3 (3.3-3.55)
Daten- Vollständigkeit ^a	95.1% (48.2 %)	82.7 % (52.9 %)	87.3 % (51.2 %)
I/σ^a	6.8 (1.5)	4.8 (1.6)	5.2 (2.1)
R_{symm} ^{a,b}	4.8 % (13.6 %)	5.4 % (16.8 %)	8.2 % (19.6%)
Anzahl der für die Verfeinerung verwendeten Reflexe ($F > 2\sigma$)	164383/8037	147871/7459	73987/3765
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ ^c			
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ ^c ($F > 2\sigma$)	28.2 %/33.9 %	28.4 %/32.0 %	32,4 %/38,2 %
Standardabweichung („R.m.s.d.“) von idealen Bindungslängen	0.010	0.010 \AA	0.010
Standardabweichung („R.m.s.d.“) von idealen Bindungswinkeln	1.5 °	1.9 °	1.6 °

^aWerte für die höchste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben

^b $R_{\text{symm}} = (\sum_{hkl} |I(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} I(hkl))$, wobei $\langle I(hkl) \rangle$ den Mittelwert äquivalenter Reflexe einer Intensität $I(hkl)$ darstellt.

^c5% aller Daten

Tab. 1: Statistische Analyse der Datenauswertung

Die Tabelle zeigt eine statistische Analyse der einzelnen Datensätze für alle drei β -Tryptase-Inhibitor-Kristalle im Vergleich

Hierbei ist auffällig, daß die im Rahmen der Strukturverfeinerungen erreichbaren R-Faktoren im Verhältnis zu den jeweiligen Auflösungen der Datensätze relativ hoch sind.

Zudem sind die Vollständigkeitsraten der ausgewerteten Datensätze teilweise nur sehr niedrig. Die in Abbildung 24 gezeigten Diffraktionsbilder zeigen einen Vergleich zwischen einem typischen α -Tryptase-Diffraktionsbild und einem für β -Tryptasen optimalen Diffraktionsbild.

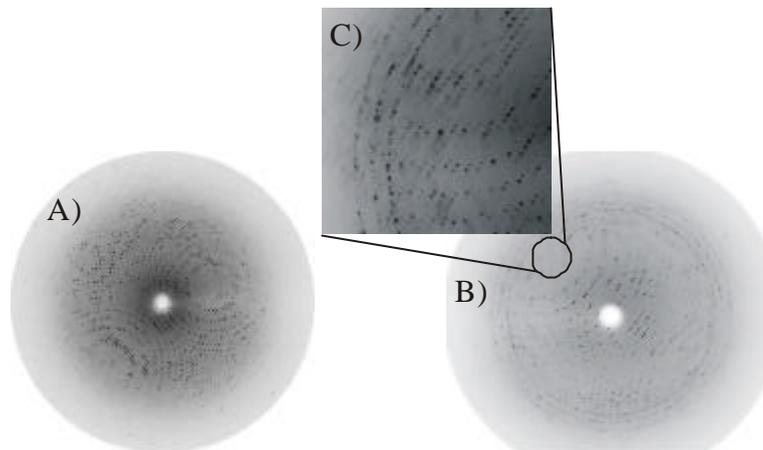


Abb. 24: Diffraktionsbilder im Vergleich

Gezeigt ist im Teilbild A) ein typisches Diffraktionsbild für α -Tryptase-Kristalle. Im Vergleich dazu ist in den Teilbildern B) und C) ein vergleichsweise sehr gutes Diffraktionsbild eines bifunktional inhibierten β -Tryptase-Kristalls gezeigt. Besonders in den höheren Auflösungsschichten (Teilbild C) sind trotzdem noch deutlich verwischte Reflexe zu erkennen.

Viele, zum Teil stark verwischte Reflexe sind auf den einzelnen Bildern zu erkennen. Deren Auftreten liegt begründet in der schlechten Qualität der Kristalle. Damit verbunden ist ihr schlechtes Frierverhalten. Die deshalb auftretenden Fehler in den Intensitäten der einzelnen Reflexe waren aufgrund der geringen Symmetrie in der Elementarzelle (Raumgruppe P1) durch Mitteln zwischen kristallographisch gleichen Reflexen kaum zu korrigieren. Viele Reflexe mußten verworfen werden beziehungsweise wurden gar nicht erst aufgenommen. Trotzdem waren die Daten in den durch die Datenqualität gegebenen Grenzen auswertbar, und die resultierende Elektronendichtekarte erlaubte die zweifelsfreie Positionierung der einzelnen Aminosäuren und Inhibitoren innerhalb der Elementarzelle.

In allen drei Elektronendichtekarten sind die Proteinketten lückenlos - beginnend vom Isoleucin 16 durchgehend bis zum Rest Prolin 243 - klar definiert. Die sich anschließenden Lysine sind vermutlich aufgrund ihrer Delokalisierung nicht mehr eindeutig zu positionieren.

Die Aminosäuren 1-15 sind im Zuge der Aktivierung vor der Kristallisation abgespalten worden. Die Proline 60a und 152b liegen in jedem Monomer in *cis*-Konformation vor.

Der freie *R*-Faktor (Brünger, 1992) und der kristallographische *R*-Faktor liegen in allen drei Fällen aus den oben genannten Gründen etwas hoch. Sie stehen aber in einem vernünftigen Verhältnis zueinander, was auf eine korrekte Verfeinerung der Struktur hindeutet. Auch die Standardabweichungen von den idealen Bindungslängen und –winkeln (Engh and Huber, 1991) nach Engh und Huber lassen keine fehlerhafte Interpretation der Elektronendichtekarte erwarten.

Die Aminosäuren nehmen in Proteinen häufig bevorzugte Konformationen ein, die durch die Winkel ϕ und ψ gekennzeichnet sind. Diese Winkel geben die Rotation der starren Peptidebenen relativ zueinander an. Um die Richtigkeit eines Proteinmodells zu überprüfen, sind die Rechenprogramme SFCHECK (Collaborative Computational Project, 1994) und PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1998) entwickelt worden. Diese ermöglichen es, die Konformation der modellierten Aminosäuren auf ihre Plausibilität hin zu überprüfen. In den Kristallstrukturen der β -Tryptase–Inhibitor-Komplexe befinden sich durchschnittlich 78.8 % der nicht-Glycin-Reste in der am meisten favorisierten Konformation, 19.5 % in der zusätzlich erlaubten und 1.7 % in der großzügig erlaubten Konformation. Der nicht erlaubten Region des Ramachandran-Graphen (Ramachandran and Sasisekharan, 1968) ist in keinem Fall eine Aminosäure zuzuordnen. Auch diese Analyse der fertigen Modelle ist konsistent mit einer korrekten Elektronendichteinterpretation.

Die Atomkoordinaten aller drei fertigen Strukturen wurden bei Firma Byk-Gulden, Konstanz, hinterlegt.

3.3.4 Kristallaufbau und Einheitszelle

Die Korrektheit des postulierten Arrangement des β -Tryptase-Tetramers (Pereira *et al.*, 1998) konnte aufgrund einer unglücklichen Kristallpackung der einzelnen Monomere nicht eindeutig nachgewiesen werden. So ist neben der kreisförmigen Anordnung der Monomere ebenfalls ein Tetramer-Aufbau denkbar, in dem sich die beiden Dimere nicht „face-to-face“ sondern „back-to-back“ aneinander anlagern (Abbildung 25).

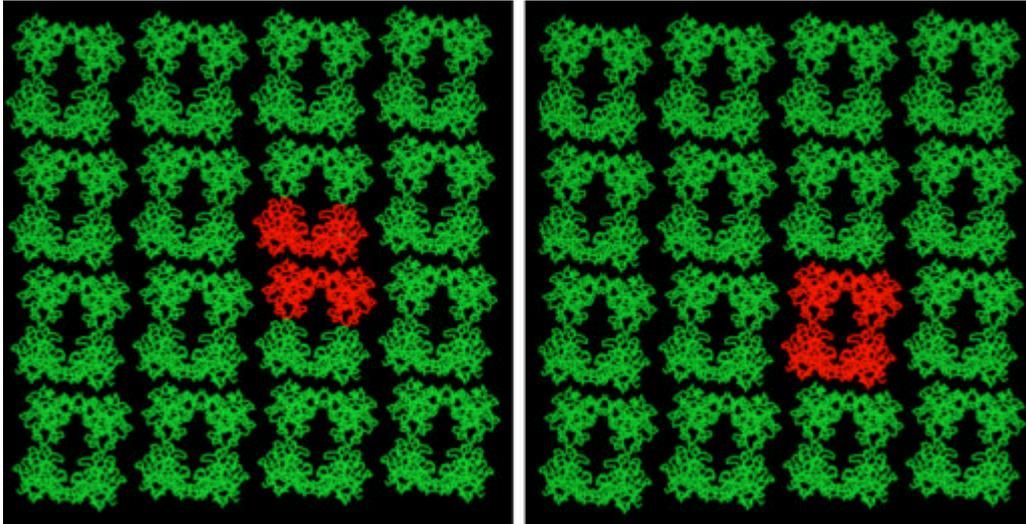


Abb. 25: Kristallaufbau der β II-Tryptase-Kristalle

Gezeigt ist eine einzelne Ebene im Kristall und die Position der Tryptase-Moleküle darin. Hierbei sind zwei Tetramer-Architekturen grundsätzlich denkbar. Das „back to back“-Arrangement ist links und das rahmenartige Tetramer ist rechts hervorgehoben. Die Abbildung wurde erstellt mit MAIN (Turk, 1992).

Hierbei würden die aktiven Zentren nicht in eine zentrale Pore zeigen, sondern nach außen, wo sie für eventuelle Substrate besser zugänglich wären. Ein tetrahedrischer Aufbau, der als weiteres Modell bisher häufig postuliert worden ist, konnte bereits durch die β II-Tryptase-Struktur widerlegt werden.

Diese Unklarheit konnte durch die gelösten Strukturen der β -Tryptase-Inhibitor-Komplexe beseitigt werden. Wie in Abbildung 26 gezeigt, erlaubt die Kristallpackung in den hier beschriebenen, zur kristallographischen Raumgruppe P1 zugehörigen β -Tryptase-Inhibitor-Kristalle die eindeutige Identifikation des ringförmigen Tetramer-Arrangements als die in der Natur relevante Konformation. Keine andere tetramerische Zusammenlagerung einzelner β -Tryptase-Monomere kann in diesem Kristallaufbau sinnvoll zugeordnet werden.

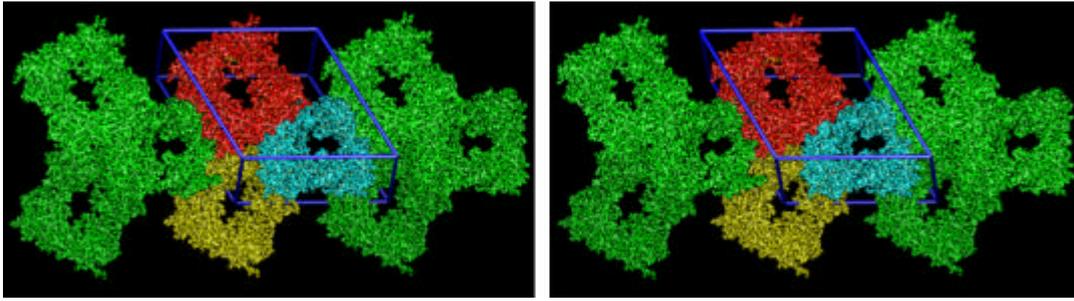


Abb. 26: Stereoabbildung des Kristallaufbaus der **bIII- und **bIa**-Tryptase-Kristalle**

Farbig abgesetzt sind drei Tetramere, die gemeinsam den Inhalt einer Einheitszelle repräsentieren. Benachbarte Tetramere sind grün gezeigt. Die Zuordnung des relevanten Tetramers ist eindeutig. Die Abbildung wurde erstellt mit MAIN (Turk, 1992).

Abbildung 26 zeigt zur Illustration eine Darstellung des β III-Tryptase-Kristalles mit dem Byk-Inhibitor BYK150640 entlang der *a*-Achse der Einheitszelle. Der Aufbau der Kristalle der beiden anderen Komplexe ist mit dem hier gezeigten Schema identisch. 12 Monomere sind in einer Elementarzelle zu drei Tetrameren zusammengelagert, welche gemeinsam die asymmetrische Einheit des Kristalls bilden. Diese sind alle annähernd parallel zu der *b-c*-Seite der Einheitszelle übereinander angeordnet und überlagern sich mit jeweils einem Monomer. Durch diesen läuft eine approximale 3_1 -Symmetrieachse, so daß sich die einzelnen Tetramere wie die Stufen einer rechtsdrehenden Wendeltreppe um diese zentrale Achse anordnen. Jeweils das erste und das vierte Tetramer sind demzufolge exakt übereinander gelagert. Die dreizählige Symmetrie ist jedoch aufgrund der leichten Verkippung des in der Abbildung als mittleres Tetramer gezeigten Komplexes nicht kristallographisch. Zusätzlich ist er leicht seitlich verschoben, so daß diese „fast“-Symmetrie kristallographisch nicht ausnutzbar ist. Sie erklärt jedoch die Zellkonstanten $a = b \neq c$, $\alpha \approx \beta \approx 90^\circ$ und $\gamma \approx 120^\circ$, die das Vorliegen einer mindestens dreizähligen Symmetrie im Kristall suggerieren. Trotzdem zeigt der Kristallaufbau - bis auf die Identität der asymmetrischen Einheit - keine weiteren Symmetrieeigenschaften.

Innerhalb der einzelnen Ebenen im Kristall gibt es außer den Wechselwirkungen, die die Tetramerisierung bewirken, kaum nennenswerte Kontaktflächen zwischen den einzelnen Monomeren, so daß die Zuweisung des nativ relevanten Tetramers hier zwingend ist. Zwischen den einzelnen Ebenen bestehen die Kristallkontakte der Monomere sowohl aus seitlichen Interaktionen zweier Monomere als auch aus Wechselwirkungen eines Monomers

der einen Ebene mit dem Interface zweier Tetramer-formenden Monomere aus der benachbarten Ebene. Aufgrund der fehlenden Symmetrieverwandtheit der Monomere in den benachbarten Kristallebenen, ist jedoch auch zwischen den Ebenen kein alternativer Tetrameraufbau identifizierbar, so daß die in der Abbildung farbig hervorgehobene Tetramer-Konstruktion als die einzig mögliche verbleibt.

3.3.5 Der b-Tryptase-Tetramer

Das vorstehend zweifelsfrei als biologisch relevant identifizierte Tetramer ist wie folgt aufgebaut: Die vier beteiligten Monomere sind im Folgenden willkürlich als Monomere A, B, C und D bezeichnet. Sie besetzen die Eckpunkte eines rechteckigen Rahmens, bei dem die A-B-Seite leicht gegen die C-D-Seite verkippt ist. Diese Architektur resultiert in einer fast perfekten 222 Symmetrie, die lediglich durch die unmittelbare kristallographische Umgebung, sowie die jeweilige Positionierung der Tyrosin 75-Reste eingeschränkt wird. In der Mitte dieses Konstruktes verbleibt ein zentraler, durchgehender Solvens-gefüllter Kanal, in dessen Zentrum sich die drei pseudo-zweifachen Symmetrieachsen kreuzen. Die erste, horizontale Symmetrieachse bildet die Monomere D auf A und C auf B ab und die zweite, vertikale Symmetrieachse transformiert die Monomere A auf B und C auf D. Die dritte Achse steht orthogonal auf den beiden anderen und setzt die Monomere A und C sowie B und D zueinander in Beziehung.

Die aktiven Zentren aller vier Monomere sind in die innere zentrale Pore des Tetramers gerichtet. Diese hat einen in etwa rechteckigen Querschnitt und ist etwa 30° um die dritte Symmetrieachse relativ zur Tetramerarchitektur verdreht. Ihre größte Ausdehnung erreicht sie im Zentrum des Tetramers mit einem Querschnitt von etwa 50 Å x 25 Å. Die zentrale Höhle verengt sich in Richtung der Eingänge bis zu einer Porenöffnung von 40 Å x 15 Å. Diese Dimensionen sind gerade groß genug, um das Eindringen eines Peptides mit dem Durchmesser einer α -Helix, sowie dessen Interaktion mit den aktiven Zentren des Tryptase-Tetramers, zu ermöglichen. Wie in Abbildung 27 ersichtlich, sind in der direkten Aufsicht auf das Tryptase-Tetramer lediglich die zwei sich gegenüberstehenden aktiven Zentren erkennbar. Die beiden anderen werden durch die 147-„loops“ verdeckt, die von den einzelnen Monomeren ausgehen und aufgrund der 222-Symmetrie auf alternierenden Seiten hervorstehten.

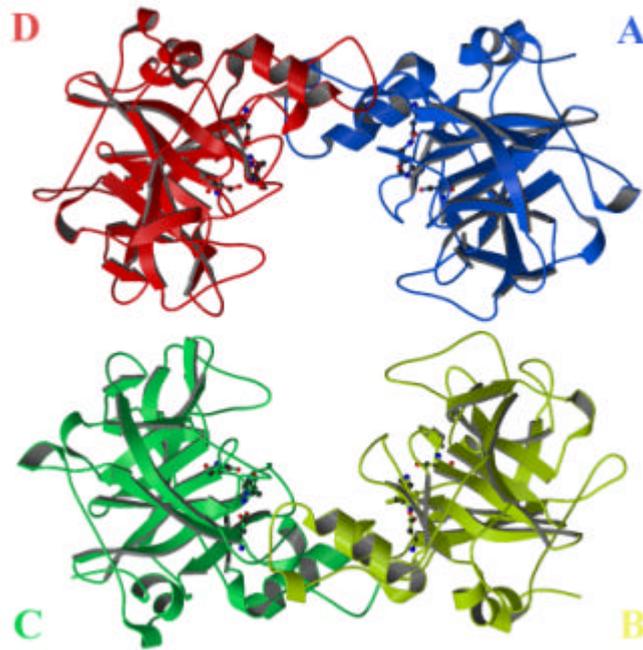


Abb. 27: Der β -Tryptase-Tetramer

Die vier Monomere sind willkürlich A,B,C und D benannt worden. Die Aminosäuren Histidin 57, Asparaginsäure 102 und Serin 195 sind als „ball-and-stick“-Modell gezeichnet. Die Abbildung wurde erstellt mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997).

Mit 32 basischen Aminosäuren im Falle von β Ia-Tryptase und 33 basischen Aminosäuren im Falle von β III-Tryptase, sowie jeweils 24 sauren Aminosäuren pro Monomer, zeigen beide Tryptase-Isoformen bei neutralem pH-Wert eine insgesamt leicht positive Ladung. Das elektrostatische Potential ist jedoch nicht gleichmäßig über die gesamte Oberfläche verteilt. Das gesamte Innere der zentralen Pore, sowie die das Äußere des Tetramers in dem A-D- und B-C-Interface verfügt über ein vorwiegend negatives elektrostatisches Potential. Positive Ladungen sind auf der von der zentralen Pore abgewandten Seite der Interaktionsflächen der Monomere A und B sowie C und D über eine elongierte Fläche von etwa 100 Å angesammelt. Wie in Abbildung 28 dargestellt, ist diese Ansammlung von elektrostatisch positivem Potential auf einer durchgehenden, jeweils die Monomere A und B sowie C und D verbindenden Fläche, in idealer Weise dazu geeignet, als Proteoglykan-Bindungsstelle zu fungieren (siehe auch Kapitel 4.3.7.).

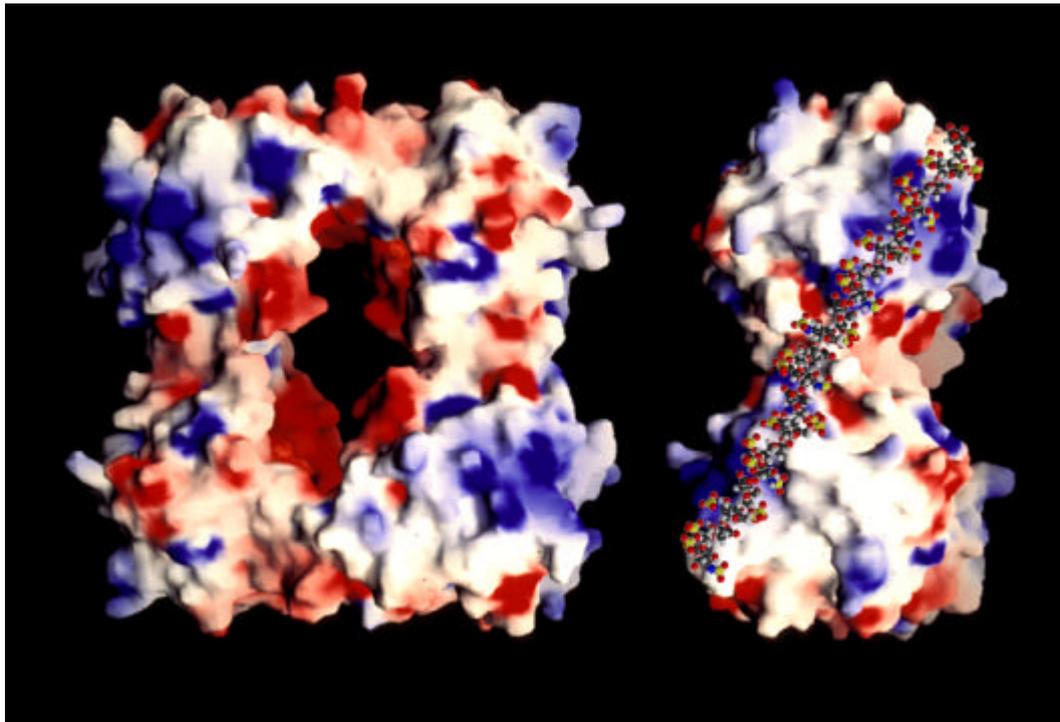


Abb. 28: Oberflächenladung der bIII-Tryptase

Gezeigt ist jeweils eine Aufsicht auf das β III-Tryptase-Tetramer und eine Seitenansicht auf die Peripherie der Monomere A und B. Eine Heparinkette ist an der entsprechenden Bindungsstelle dargestellt. Die Oberfläche ist nach ihrem elektrostatischen Potential gefärbt, wobei Blau eine positive und Rot eine negative Ladung anzeigt. Die Abbildung wurde mit GRASP erstellt (Nicholls *et al.*, 1993).

Beispielsweise eine Heparinkette bestehend aus 20 Zucker-Resten würde durch ihre Interaktion mit der gezeigten Bindungsstelle die beteiligten Monomere wie ein Pflaster verbinden und so zur Tetramer-Stabilität beitragen. Wie bereits dargestellt, ist die Bindung von Proteoglykanen für die Stabilität von β -Tryptase-Tetrameren unter nativen Bedingungen zwingend erforderlich. Experimentelle Ergebnisse von S. C. Alter, die zeigen, daß Heparinketten mit einem Molekulargewicht von mindestens 5500 Da eine tetramerstabilisierende Wirkung zeigen, befinden sich in guter Übereinstimmung mit dem gezeigten Modell (Alter *et al.*, 1987). Außerdem könnte die Bindung von Proteoglykanen sowohl bei der Formation der Tetramere als auch bei deren Lagerung in den Granula der Mastzelle eine bedeutsame Rolle spielen (Humphries *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 1995).

3.3.6 Proteinsequenzanalyse der b-Tryptase-Isoformen

In Abbildung 29 ist ein strukturell basierter Sequenzvergleich der Referenz-Serin-Proteinasen Trypsin und Chymotrypsin mit den drei im Rahmen dieser Arbeit strukturell untersuchten Tryptase-Isoformen α I-Tryptase, β Ia-Tryptase und β III-Tryptase gezeigt.

Tryptase Monomere haben demnach ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 27460 Da und besitzen aufgrund ihrer Aminosäurekomposition einen rechnerischen pI-Wert von 6.46. Im Vergleich zu den Referenz-Proteinasen sind sie in weiten Bereichen sequenz-homolog und in Großteilen sogar -identisch. So sind im Falle von Trypsin 86.6 % und im Falle von Chymotrypsin 66.1 % aller Aminosäuren sequenz-homolog zu Tryptasen. An Tertiärstrukturelementen überwiegen β -Bänder. Auch einige helikale Bereiche sind in der Struktur vorhanden. Alle dargestellten Tryptase-Isoformen bestehen aus einer 245-gliedrigen Aminosäurekette und verfügen damit über 15 Aminosäuren mehr als reifes Chymotrypsin und über 22 Aminosäuren mehr als die B-Kette von Trypsin. Diese zusätzlichen Reste sind nicht gleichmäßig über die gesamte Sequenz verteilt, sondern zum Großteil an spezifischen Bereichen inseriert. Hiervon betroffen sind sechs an der Oberfläche lokalisierte „loops“, die, wie noch gezeigt werden wird, entscheidend für die Tetramer-Formation verantwortlich sind. Im Vergleich zu Chymotrypsin sind im Einzelnen der 37-„loop“ um zwei Aminosäuren, der 60-„loop“ um fünf Aminosäuren, der 147-„loop“ um eine Aminosäure und der 173-„loop“ um sogar neun Aminosäuren verlängert. Zusätzlich ist eine Aminosäure an Position 221A und eine am C-terminalen Ende eingefügt. Auf der anderen Seite sind die ebenfalls an der Oberfläche lokalisierten 70-80- und 214-220-„loops“ um drei Reste, beziehungsweise um einen Rest verkürzt.

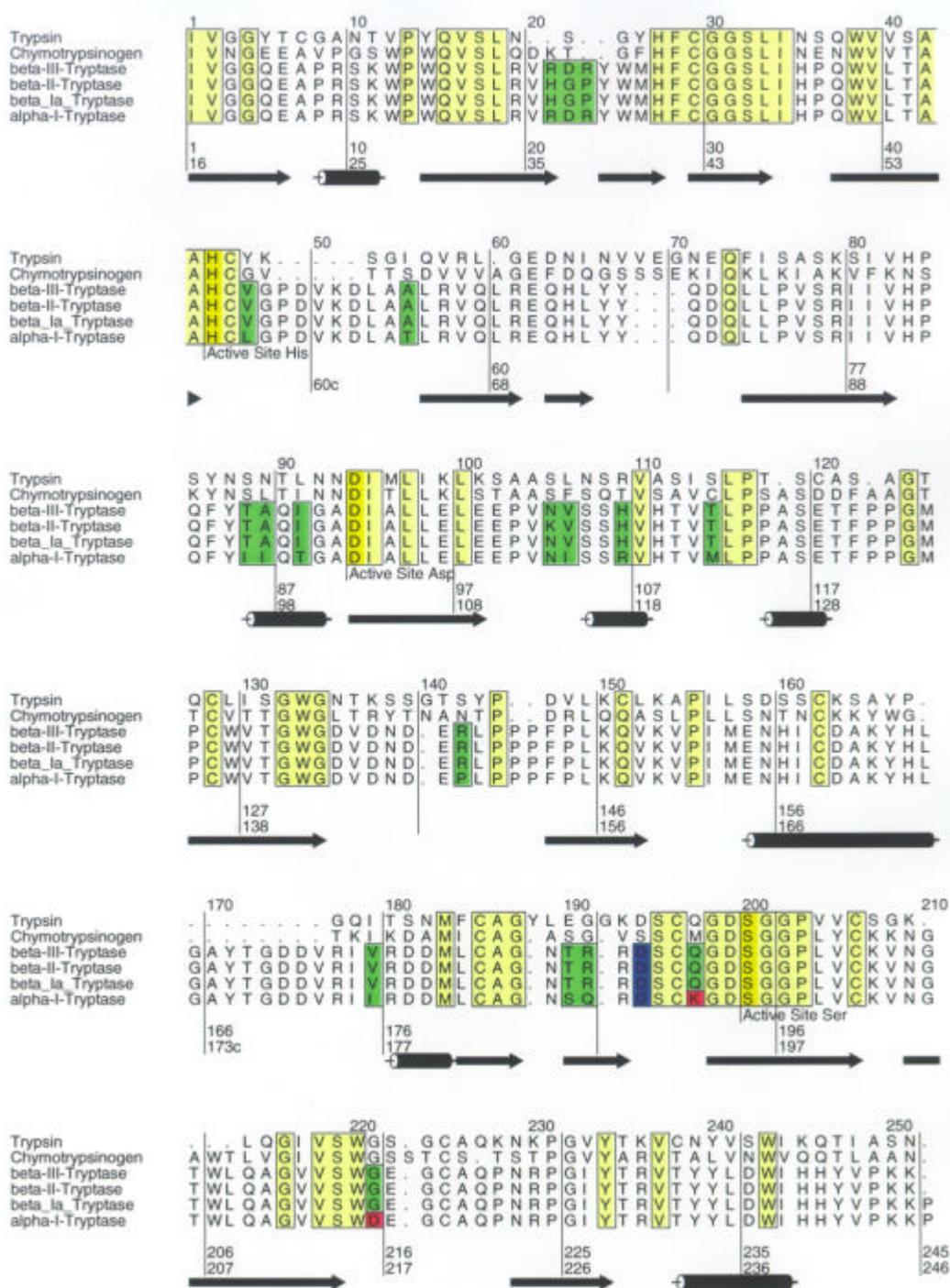


Abb. 29: Strukturbasierter Sequenzvergleich Trypsin-artiger Proteinasen

Verschiedene Trypsin-Isoformen werden verglichen mit den Referenz-Proteinasen Trypsin und Chymotrypsin. Gelb unterlegt sind die streng konservierten Aminosäuren in Trypsin-artigen Serinproteinasen. Grün hervorgehoben sind Aminosäuren, die sich in Trypsinen unterscheiden. Blau hervorgehoben ist Asparaginsäure 189 als Boden der S1-Tasche, und rot unterlegt sind abweichende Aminosäuren der α I-Trypsase in der Nähe des aktiven Zentrums. Über den Sequenzen sind die einzelnen Aminosäuren fortlaufend nummeriert. Unterhalb der Sequenzen werden die einzelnen Aminosäuren der Trypsase fortlaufen nummeriert und ganz unten steht die Numerierung in Anlehnung an die Chymotrypsin-Numerierung, die in dieser Arbeit ausschließlich verwendet wird.

Das Dendogramm in Abbildung 30 ist angelehnt an die Arbeit von M. Pallaoro (Pallaoro *et al.*, 1999) und zeigt die insgesamt sehr enge Verwandtschaft humaner Tryptasen untereinander und die im Vergleich dazu relativ große genetische Distanz zu Tryptasen anderer Säugetiere. Die Zahlen an den einzelnen Zweigen des Dendogramms repräsentieren den Anteil an nicht konservierten Aminosäuren, der aus einem entsprechenden Sequenzvergleich folgt.

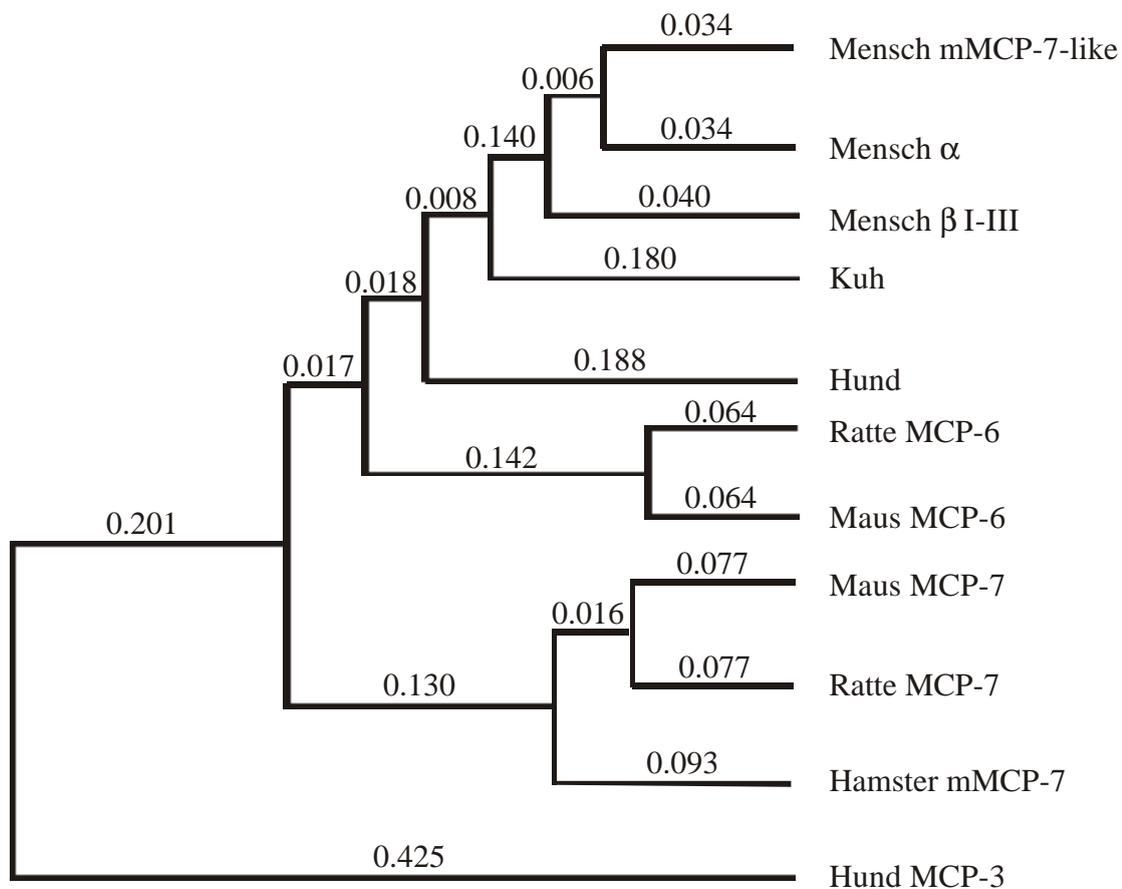


Abb. 30: Dendogramm verschiedener Tryptasen

Verschieden Tryptasen unterschiedlicher Organismen werden in diesem Dendogramm im Hinblick auf ihre Verwandtschaft untersucht. Hierbei geben die Zahlen an den einzelnen Zweigen den Anteil an Aminosäure-Ungleichheiten zwischen den verglichenen Tryptasen an.

3.3.7 Struktur der **b**-Tryptase-Monomere

Der Tryptase-Monomer ist überraschend ähnlich wie die archetypischen Serin-Proteinasen Trypsin und Chymotrypsin gefaltet, was in geeigneter Weise durch die geringe „root mean square“ (rms) Standardabweichung von 0.65 Å der C^α-Atompositionen beider Proteinpaare im Vergleich ausgedrückt werden kann. Die Struktur der β-Tryptasen wird dominiert von β-Faltblättern und besteht im Kern aus zwei nebeneinander leicht verkippt angeordneten sechs-strängigen „β-barrels“, die durch drei trans-Domänen-Segmente zusammengehalten werden, so daß vom Gesamteindruck eine Struktur entsteht, die in ihren äußeren Dimensionen an ein Brötchen erinnert.

Die katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren Histidin 57, Asparaginsäure 102 und Ser 195, befindet sich in der entstandenen Spalte zwischen den beiden „β-barrels“. Orthogonal zu der in Standardorientierung von Norden nach Süden verlaufenden Domainengrenze befindet sich die „active site cleft“ die zur Aufnahme von elongierten Proteinketten, die sich von Westen nach Osten erstrecken, ideal geeignet ist.

Diese Kernstruktur wird durch einige an der Oberfläche lokalisierte Polypeptid-„loops“, ein kurzes helikales Segment Ala 55-Gly 66, die sogenannte intermediäre Helix - beginnend von Glutamat 164 bis zum Leucin 173A - und die C-terminale Helix vom Arginin 230 bis zum Valin 242 ergänzt. Die C-terminalen Aminosäuren Lysin 243 bis zum Prolin 245 waren in der experimentellen Elektronendichte nicht mehr eindeutig definiert, so daß ihre Zugehörigkeit zur C-terminalen Helix nicht eindeutig geklärt werden konnte. Allerdings läßt die unklare Elektronendichte auf eine gewisse Delokalisierung dieser Reste schließen, was ihre Involvierung in Tertiärstrukturelemente als unwahrscheinlich erscheinen läßt.

Im Detail weicht die Topologie der β-Tryptase-Monomere jedoch erheblich von den Referenz-Proteinasen ab. Abbildung 31 zeigt eine Überlagerung der βIII-Tryptase-Struktur mit den dreidimensionalen Strukturen von Trypsin und Chymotrypsin relativ zu den C^α-Atompositionen in Standardorientierung.

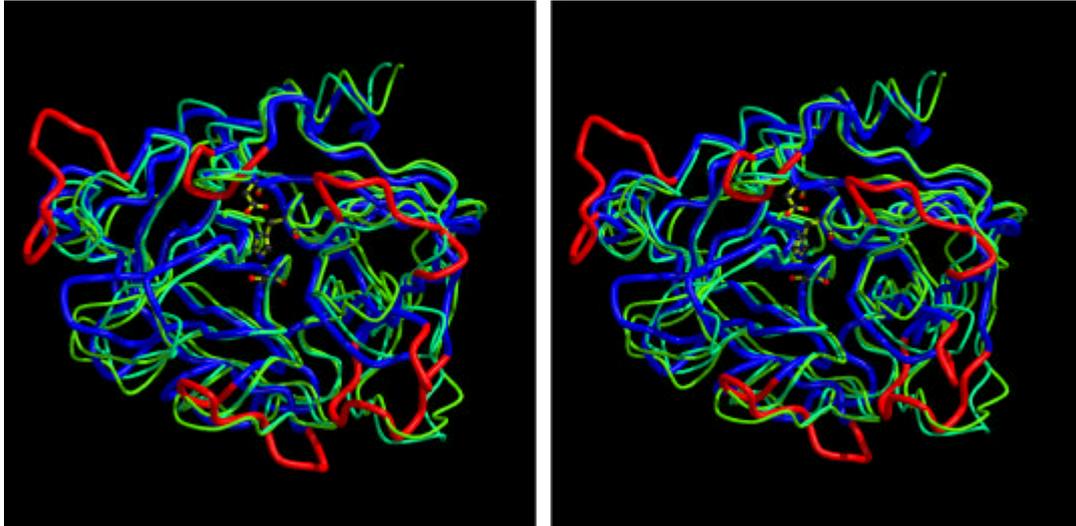


Abb. 31: Struktureller Vergleich von β -Trypsinen mit Referenzproteinasen

Die Strukturen von Trypsin (hellgrün) und Chymotrypsin (grün) werden in dieser Stereoabbildung verglichen mit der Struktur der β III-Trypsin-Monomere. Ähnlich verlaufende Sequenzabschnitte sind in blau dargestellt, während Bereiche, wo die Struktur der β -Trypsinen stark abweicht, rot hervorgehoben sind. Die Abbildung wurde erstellt mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997).

Sofort auffällig ist die Topologie der sechs farblich hervorgehobenen Oberflächen-„loops“, deren Konformation einzigartig unter Serin-Proteinasen ist. Alle diese „loops“, im Einzelnen der 147-„loop“ mit dem 152-„spur“, der 70-80-„loop“, der 37-„loop“, der 60-„loop“, der 97-„loop“ und der 173-„loop“, grenzen an die „active site cleft“ und formen diese. Die in Standardorientierung südliche, relativ saure Seitenfläche der „active site cleft“ wird hauptsächlich durch den 147-„loop“ zusammen mit Glutamin 192 gebildet. Verglichen mit den Referenz-Proteinasen ist der initiale Teil des 147-„loops“ um eine Aminosäure gekürzt und anschließend im 125-„spur“ um zwei Proline verlängert, so daß sich hier mit N-Arg150-Leu151-Pro152-Pro152A-*cis*-Pro152B-Phe153-Pro154-C ein ungewöhnlich Prolin-reicher Sequenzabschnitt ergibt. Der im Osten benachbarte 70-80-„loop“, der in Ca^{2+} bindenden Serinproteinasen die Ca^{2+} -Bindungsstelle beherbergt (Bode and Schwager, 1975b) (Bode and Schwager, 1975a), ist aufgrund seiner Topologie offenbar nicht für die Komplexierung von Ca^{2+} geeignet. Im Norden schließt sich der 37-„loop“ an, der mit Prolin 37A und Tyrosin 37B zwei zusätzlich Reste enthält, deren Akkomodation ein Ausscheren der Aminosäurenkette aus ihrer normalen Topologie bewirkt. Um zur Aufnahme der fünf zusätzlichen Aminosäuren in der Lage zu sein, erstreckt sich der benachbarte 60-„loop“ deutlich nördlich von seinem

normalen Verlauf. Hierbei sind zwei Aspekte bemerkenswert: Durch ein abruptes Abknicken direkt an der ersten eingefügten Aminosäure, dem *cis*-Prolin 60A, wird diese „loop“-Vergrößerung in Richtung Norden ermöglicht. Weiterhin ist der in den meisten anderen Serin-Proteinasen konservierte und nicht Solvens-exponierte Rest Glycin 69 in β -Tryptasen durch ein ebenfalls eingebettetes Arginin ersetzt, das diese spezielle „loop“-Konformation ebenfalls unterstützt. Obwohl objektiv gleichlang mit anderen Serin-Proteinasen in der Sequenz, nimmt der 97-„loop“ trotzdem einen ungewöhnlichen Verlauf. Im Detail betrachtet, fehlen im N-terminalen Teil zwei Aminosäuren, so daß Alanin 97 die Position des Restes 99 einnimmt. Dementsprechend ist der C-terminale Teil um zwei Aminosäuren verlängert, so daß dieser „loop“ einen zusätzlichen helikalen Teil enthält, bevor Asparaginsäure 102 wiederum seine angestammte Position einnimmt. Die mit neun Aminosäuren bei weitem umfangreichste Insertion tritt im 173-„loop“ auf, so daß die zehn Aminosäuren vom Histidin 173 bis zum Valin 173I eine zusätzliche Schlaufe um die Imidazol-Gruppe des Histidins 173 formen.

Wie bei fast allen Trypsin-artigen Serin-Proteinasen mit Ausnahme von beispielsweise einkettigem Plasminogen Aktivator (Renatus *et al.*, 1997), wird im Rahmen der Trypsase-Aktivierung nach Abspaltung des pro-Peptides das N-terminale Segment –N-Ile 16-Val 17-Gly 18-Gly 19-...C in die Ile 16-Tasche inseriert. Die Triebkraft für diese Einlagerung besteht in der Formation einer Lösungsmittel-unzugänglichen Salzbrücke zwischen der freien Ile 16- α -Amino-Gruppe und der Carboxylatgruppe des Aspartats 194. Diese neu entstehende Wechselwirkung hat die Umlagerung der Seitenkette des Aspartats 194 in eine internere Position zur Folge. Im Zymogen-Status befindet sich diese Seitenkette in einer Lösungsmittel-exponierten Lage, wo sie wahrscheinlich mit den Aminosäuren Histidin 40 und Serin 32 über Wasserstoffbrückenbindungen eine sogenannte Zymogen-Triade bildet. Bei diesem Mechanismus der Proteinase-Aktivierung handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein generelles Prinzip in der Natur, das zuerst von W. Bode und R. Huber erkannt wurde (Bode, 1979b; Bode *et al.*, 1978). Eine solche Umorientierung strukturiert die umgebende, sogenannte Aktivierungsdomäne neu. Diese beinhaltet die Isoleucin 16-Tasche, die S1-Spezifitätstasche (Ile16-Gly19, Tyr184-Asp194, Gly216-Asn223 und Gly142-Tyr151) und das „oxyanion hole“, gebildet durch die Amid-Gruppen von Glycin 193 und Ser 195. Aus diesem Prozeß resultiert schließlich die vollständig aktive Proteinase.

Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft des β -Trypsase-Monomers ist die aus vier Tryptophan-Resten (Trp 27, Trp 29, Trp 137 und Trp 207) bestehende hydrophobe

Aneinanderlagerung auf der vom aktiven Zentrum abgewandten Seite des Moleküls. Lediglich die Indolgruppen der Tryptophane 137 und 207 sind an der Moleküloberfläche exponiert. Diesem Tryptophan-„cluster“ wird von einigen Autoren eine Rolle bei der Proteinfaltung und der Tetramerbildung zugeschrieben (Huang *et al.*, 2000).

3.3.8 Sechs Oberflächen-„loops“ als Grundlage für die Tetramer-Formation

Die vier Monomere wechselwirken aufgrund der 222-Symmetrie im β -Tryptase-Tetramer in zwei unterschiedlichen Grenzflächen - einerseits zwischen den Monomeren A und B (C und D) sowie andererseits zwischen den Monomeren A und D (B und C). In Abbildung 32 ist jeweils das AB-Interface und das AD-Interface gezeigt, wobei die Struktur der beteiligten β -Tryptase-Monomere mit der Trypsin-Struktur unterlegt ist. Trypsin bildet im Gegensatz zu Tryptasen keine Dimere oder Tetramere. Aus dieser Darstellung ist klar ersichtlich, daß die Tetramer-Formation im Wesentlichen auf Interaktionen zwischen den vorstehend ausführlich beschriebenen sechs Oberflächen-„loops“ beruht, die in Tryptasen einzigartig ausgebildet sind.

Das Interface zwischen den Monomeren A und D erstreckt sich über eine Gesamtfläche von 1075 Å² und wird jeweils von dem 173-„flap“, dem 97-„loop“ und dem 60-„loop“ der beteiligten Monomere gebildet. Das zentrale Element der Interaktionen in diesem Interface bilden beide 97-„loops“, die sich mit ihren 95-99-Segmenten gegenüber stehen, wobei beide Isoleucin 99-Seitenketten direkten Kontakt miteinander haben. Der 60-„loop“ des einen Monomers interagiert mit dem 173-„flap“ des gegenüberstehenden Monomers durch die Formation einer antiparallelen Leiter des Pro 60A-Val 60C-Segmentes mit dem Gly 173B-Tyr 173D-Segment. Die Seitenketten der Tyrosine 95 werden jeweils von dem gegenüberliegenden 173-„flap“ umschlungen, während sich die phenolischen Seitenketten der Tyrosine 173D in eine hydrophobe Tasche erstrecken, die von dem eigenen 60-„loop“ und dem gegenüberliegenden 97-„loop“ gebildet wird. Zusätzlich zu den eben beschriebenen hydrophobe Wechselwirkungen werden eine Salzbrücke zwischen Asparaginsäure 60B und Arginin 224 und weitere vier Wasserstoffbrückenbindungen gebildet. So tragen zusammenfassend im A-D-Interface sowohl hydrophobe als auch polare Wechselwirkungen zu einer insgesamt recht stabilen Komplexbildung bei.

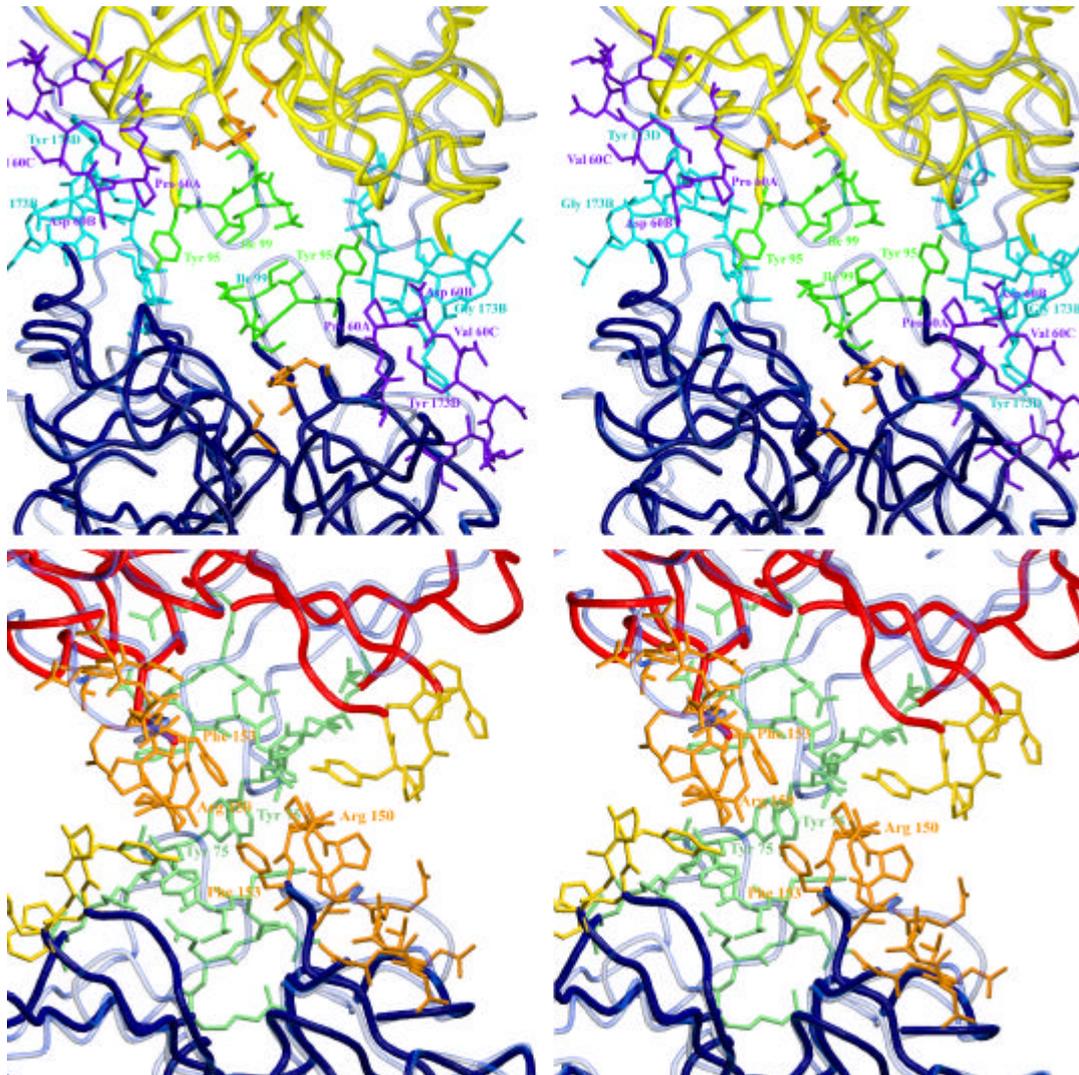


Abb. 32: Stereoabbildung der Interfaces im **b**-Tryptase Tetramer

In beiden Teilbildern ist die β III-Tryptase-Struktur durch eine Trypsin-Struktur (transparent-blau) unterlegt. Die sechs Interface-formenden „loops“ sind farblich abgesetzt: 37-„loop“ gold, 60-„loop“ violett, 78-80-„loop“ blaßgrün, 97-„loop“ grün, 147-„loop“ orange und 173-„loop“ cyan. Monomer A ist in dunkelblau, Monomer B in rot und Monomer D in gelb dargestellt. Die Abbildung wurde erstellt mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997).

Die Monomere A und B (sowie C und D) interagieren miteinander über eine mit 540 Å² nur etwa halb so große Fläche wie das A-D-Interface. An den Wechselwirkungen beteiligt sind der 147-„loop“, der 70-80-„loop“ und der 37-„loop“. Jeder 152-„spur“ erstreckt sich in

einen Hohlraum, der vom 37-„loop“ und dem 70-80-„loop“ des eigenen und dem 152-„spur“ des gegenüberliegenden Monomers eröffnet wird. Im Zentrum der Kontaktfläche stellen die Seitenketten des Tyrosins 75 und des Phenylalanins 153 annähernd einen Tetraeder dar. Auffällig hierbei ist, daß die Seitenketten des Tyrosins die ansonsten im gesamten Tetramer weitestgehend durchgehaltene 222 Symmetrie brechen. Dies muß aus der Tatsache heraus geschehen, daß bei Befolgung der Symmetrie beide phenolische Seitenketten teilweise identische Positionen einnehmen würden. Statt dessen weicht eine der beiden Seitenketten aus und orientiert sich in die entgegengesetzte Richtung. Weiterhin weichen im Zentrum des Interfaces die Seitenketten der sich gegenüberliegenden Arginine 150 unter Vermeidung unvorteilhafter Ladung-Ladung-Interaktionen in das Innere der zentralen Pore aus. Zusammenfassend betrachtet beruht die gesamte Interface-Formation ausschließlich auf hydrophoben Wechselwirkungen, die in ihrer Gesamtheit allerdings als eher schwach einzuschätzen sind. So entsteht der Eindruck, daß es sich bei diesem Monomer-Monomer Kontakt um eine Sollbruchstelle des Tetramers zu dessen Regulation handelt, die durch Heparinbindung an der äußeren Oberfläche stabilisiert wird.

3.3.9 Vergleich der Kristallstrukturen von **Ia**- und **III**-Tryptase

Beide Isoformen der β -Tryptase sind strukturell weitestgehend identisch. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in einem Bereich den 37-„loops“, der für die Formation des A-B-Interfaces mit verantwortlich ist. In β III-Tryptase ist der in β Ia-Tryptase vorhandene Sequenzabschnitt N-His 36-Gly 37-Pro 37A-C durch N-Arg 36-Asp 37-Arg 37A-C ersetzt. Arginin 37A kann, anders als Pro 37A, eine Salzbrücke zum Glutamat 149 des benachbarten Monomers bilden. Hierdurch wird das A-B-Interface durch die Formation von insgesamt zwei zusätzlichen polaren Wechselwirkungen stabilisiert.

β Ia-Tryptase und β III-Tryptase unterscheiden sich von β II-Tryptase zusätzlich durch den Aminosäureaustausch K113N. Hierdurch entsteht ein weiterer N-Glykolysierungsort, was eine insgesamt stärkere Glykolysierung von β Ia- und β III-Tryptasen zur Folge hat. Dieses Ergebnis erklärt die relativ problematische Selektion von niedrig glykolysierter Tryptase bei der Proteinaufreinigung.

3.3.10 Inhibitoren für die b-Tryptasen

Wie aus den bisher gelösten Strukturen der verschiedenen β -Tryptase-Isoformen klar ersichtlich ist, sind sowohl der Aufbau der jeweiligen aktiven Zentren als auch deren geometrische Orientierung im Tetramer zueinander in allen β -Tryptase Isoformen weitgehend identisch. Dieses ermöglicht es, mit einem einzigen Inhibitor alle β -Tryptasen in der Ausübung ihrer Funktion zu hemmen und so verschiedenste allergische Krankheiten wirksam zu bekämpfen. Hierbei erlaubt die Ausnutzung der einzigartigen Architektur des β -Tryptase-Tetramers die Entwicklung von bivalenten Inhibitoren, die eine stark erhöhte Selektivität für β -Tryptasen gegenüber den eng verwandten Trypsin-artigen Serinproteinasen besitzen.

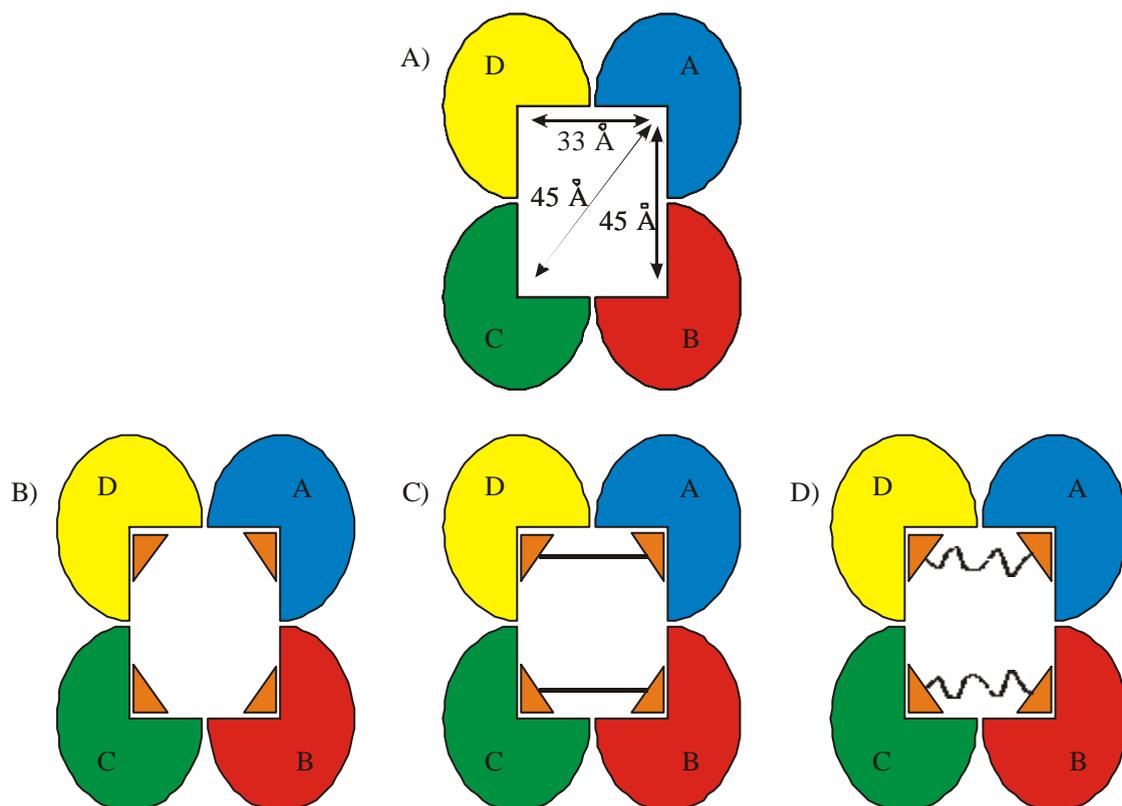


Abb. 33: Schematische Darstellung zur Inhibition von b-Tryptasen

Teilbild A) zeigt den Aufbau des Tetramers und die zu überbrückenden Abstände für die drei denkbaren bifunktionalen Inhibitionsmodelle. Teilbild B) zeigt vier monofunktionale Inhibitoren und die Teilbilder C) und D) bifunktionale Inhibitoren bei denen die funktionellen Gruppen jeweils durch einen starren und einen flexiblen Linker verbunden sind.

Das Teilbild A) der obigen Abbildung 33 zeigt die Entfernungen der einzelnen aktiven Zentren im β -Tryptase-Tetramer zueinander. Im Prinzip sind also drei verschiedene bifunktionale Inhibitorientypen denkbar, die jeweils die aktiven Zentren der Monomere A und D, A und B oder A und C verbrücken. Da aber bei der Entwicklung pharmakologischer Wirkstoffe nicht nur deren prinzipielle Wirksamkeit und Nicht-Toxizität, sondern vor allem auch deren tendenziell mit zunehmendem Molekulargewicht der Präparate abnehmende Bioverfügbarkeit eine entscheidende Rolle spielt, ist es sinnvoll, sich für die kürzeste Distanz zu entscheiden. Aufgrund der gleichen Überlegung ist die Entwicklung von tri- oder tetra-funktionalen Inhibitoren lediglich von akademischem Interesse. Alle im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Inhibitoren sind für die Verbrückung der aktiven Zentren der Monomere A und D (B und C) entwickelt worden.

Die Teilbilder B), C) und D) zeigen drei theoretische Inhibitionsmodelle. Betrachtet werden zunächst die zwei Extremfälle mit einerseits vier monofunktionalen Inhibitoren und andererseits die Inhibition mittels zweier starr verbundener bifunktionaler Inhibitoren. Der in D) abgebildete Fall zeigt zwei Inhibitorenköpfe, die über ein sehr flexibles Linkerfragment miteinander verbunden sind. Bei genauerer Betrachtung wird schnell klar, daß B) prinzipiell einen Extremfall von D) darstellt. In diesem Falle hat das Linkerfragment lediglich eine unendliche Länge und unbegrenzte Flexibilität. Will man sich die Tetramerarchitektur für die Inhibitorenentwicklung zunutze machen, so ist ein im Verbindungsteil möglichst unflexibles Molekül ideal geeignet, da so die Bindung an ein aktives Zentrum des Tetramers zu einer enorm erhöhten lokalen Inhibitoren-Konzentration in der unmittelbaren Umgebung des benachbarten, aktiven Zentrums führt. Auf diese Weise wird dessen Komplexierung optimal gefördert.

Betrachtet man allgemein ein System mit N Rezeptoren und einem N -funktionalen Bindungspartner, so ergibt sich nach Gleichung 19 die frei werdende Gesamt-Bindungsenergie aus der Summe der Änderungen der freien Gibbs-Energie für alle Einzelreaktionen und einem zusätzlichen Term, der Bindungs-Gibbs-Energie. Dieser Term setzt sich nach Gleichung 20 aus der Entropieänderung des Systems durch Verlust von Rotations- und Translations-Freiheitsgraden nach der Komplexbildung und der sich aus möglichen Konformationsänderungen ergebenden Entropieänderung zusammen.

$$\Delta G_N^{poly} = \Delta G_1^{mono} + \Delta G_2^{mono} + \dots + \Delta G_n^{mono} + \Delta G^S \quad (19)$$

$$\Delta G^S = T\Delta S_{trans+rot}^0 - T\Delta S_{conf}^0 \quad (20)$$

Die Entropieänderung aufgrund von Konformationsbeschränkungen ist von ihrem Einfluß auf das Gesamtsystem wegen ihrer geringen Größe in erster Näherung zu vernachlässigen.

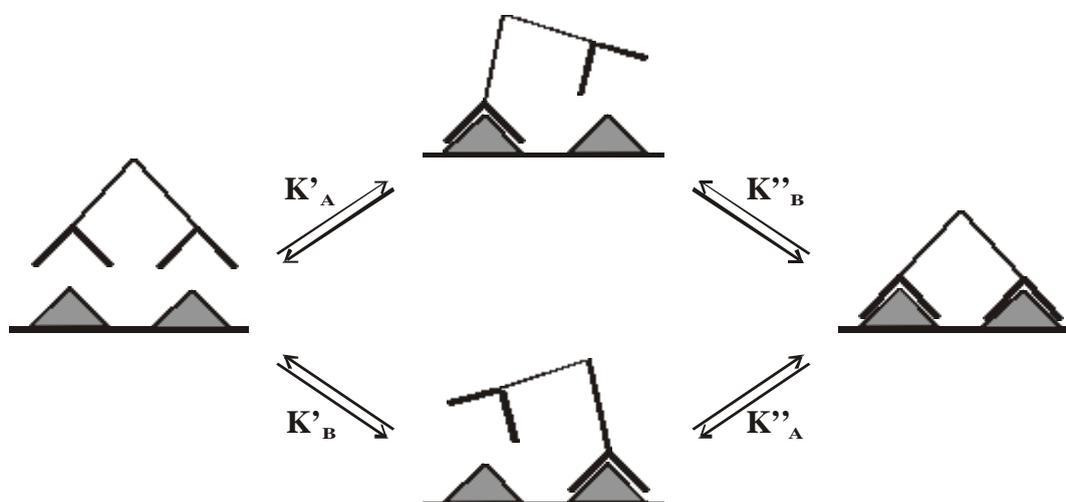


Abb. 34: Kinetisches Modell zur bifunktionalen Bindung

Eine bifunktionale Bindung kann bei gleichen Kopfgruppen und gleichen Rezeptoren auf zwei gleichberechtigte Weisen erfolgen.

In Abbildung 34 ist ein vereinfachtes System bestehend aus zwei Rezeptoren und einem bifunktionalen Liganden gezeigt. Sind beide Rezeptoren sowie die dazugehörigen Liganden gleicher Natur, so sind die dargestellten Reaktionswege gleichberechtigt und voneinander nicht zu unterscheiden. Im Verhältnis zum jeweiligen ersten Reaktionsschritt ist die Entropieänderung im zweiten Schritt ebenfalls vernachlässigbar. Da das Molekulargewicht bei kleinen Liganden nur einen sehr geringen Einfluß auf Entropieänderungen hat, ist der Term $\Delta S_{trans+rot}$ im ersten Reaktionsschritt für monofunktionale und bifunktionale Liganden pro Molekül annähernd gleich.

Dementsprechend beträgt der Unterschied in der Änderung der freien Energie zwischen einer Reaktion mit monofunktionalen Liganden und einem System mit bifunktionalen Liganden genau einmal $TDS_{trans+rot}$. In einer stark vereinfachten Betrachtungsweise läßt sich auch dieser Energieterm vernachlässigen. Die Änderung der freien Energie für die oben abgebildete Reaktion läßt sich dann durch Gleichung 21 beschreiben.

$$\Delta G_{N=2}^{bi} = \Delta G_1^{mono} + \Delta G_2^{mono} \quad (21)$$

$$K_{N=2}^{bi} = K_1^{mono} \times K_2^{mono} = (K_{avg}^{mono})^2 \quad (22)$$

Sind die freien Energieänderungen additiv, so sind die damit verbundenen Gleichgewichtskonstanten multiplikativ, wie in Gleichung 22 ausgedrückt. Die Änderung der Gibb'schen freien Energie in Abhängigkeit zu den Gleichgewichtskonstanten der Einzelreaktionen, als auch zu der Gleichgewichtskonstanten der Gesamtreaktion, kann nach Gleichung 23 berechnet werden.

$$\Delta G_{N=2}^{bi} = RT \ln K_{N=2}^{bi} = RT \ln (K_{avg}^{mono})^2 \quad (23)$$

Will man untersuchen, ob ein Ligand wirklich bifunktional bindet, so ermittelt man einen Bifunktionalitätsfaktor B^{bi} aus der experimentellen Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten sowohl für ein bifunktionales als auch für das korrespondierende monofunktionale System nach Gleichung 24. Dieser ergibt sich rein rechnerisch unter Zuhilfenahme der beschriebenen Vereinfachungen für ein monofunktionales System zu eins, für ein bifunktionales System zu zwei, für ein trifunktionales System zu drei, *etc.*.

$$B^{bi} = \frac{\lg K_{N=2}^{bi}}{\lg K_{avg}^{mono}} = \frac{\lg (K_{avg}^{mono})^2}{\lg K_{avg}^{mono}} = \frac{2 \lg K_{avg}^{mono}}{\lg K_{avg}^{mono}} = 2 \quad (24)$$

Aus dem selben experimentellen Ansatz läßt sich ein Kooperativitätsfaktor **a** bestimmen (Gleichung 25) (Mammen *et al.*, 1998). Dieser gibt an, ob nach erfolgter Bindung der ersten funktionellen Gruppe eines multifunktionalen Liganden, die Bindung der zweiten funktionellen Gruppe erleichtert (**a** > 1), erschwert (**a** < 1) oder gleichbleibend (**a** = 1) ist.

$$a = \frac{\lg K_N^{poly}}{\lg \left(K_{avg}^{mono} \right)^N} \quad (25)$$

Ein Beispiel für eine positiv kooperative, allerdings nicht multifunktionale Reaktion ist die Bindung von Sauerstoff durch Hämoglobin. Die Bindung eines bifunktionalen Antikörpers an seine Rezeptoren wurde im Gegensatz dazu als negativ kooperative Interaktion charakterisiert (Yarush and Dzantiev, 1990). Trotzdem binden bifunktionale Antikörper immer noch etwa 30x besser als monofunktionale Antikörper; das Verhältnis ist lediglich nicht mehr quadratisch. Der Kooperativitätsfaktor α ermöglicht also den Vergleich des ersten Reaktionsschrittes einer bifunktionalen Reaktion mit dem zweiten. Er ist jedoch kein Maß für das Verhältnis einer multivalenten Reaktion zu den korrespondierenden monovalenten Einzelreaktionen.

Die in Abbildung 35 gezeigten bivalenten Inhibitoren sind in dieser Studie verwendet worden. Neben der jeweiligen Strukturformel ist ihre durch molekulardynamische Kalkulation mit dem Programmpaket SYBYL (TRIPOS,INC., 1997) ermittelte, energetisch günstigste Konformation abgebildet.

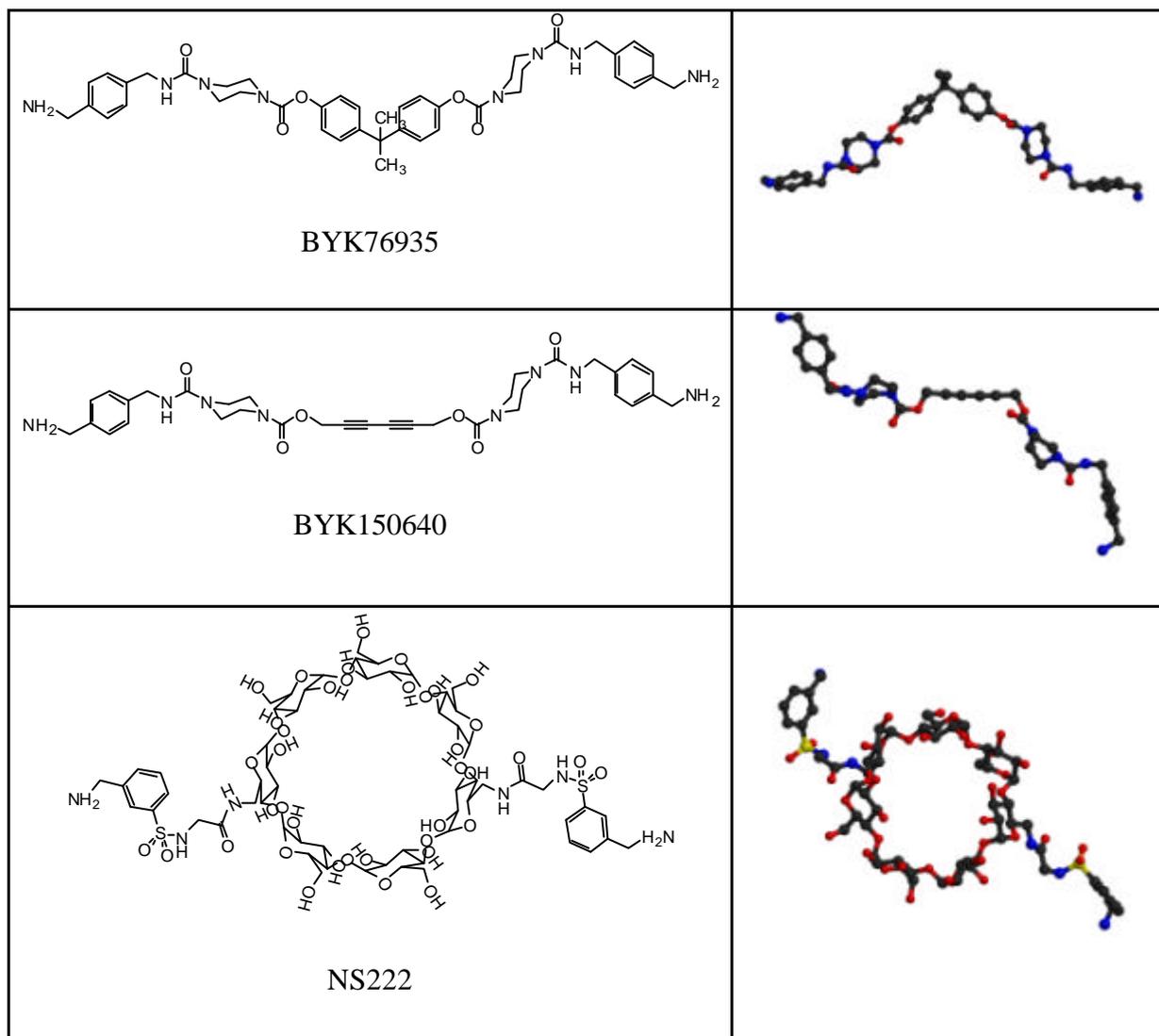


Abb. 35: Drei bifunktionale Inhibitoren

Abgebildet sind jeweils die molekularen Strukturformeln der einzelnen Inhibitoren und eine energetisch minimierte Konformation des entsprechenden Moleküls frei in Lösung. Die Abbildung wurde zum Teil erstellt mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997).

Alle diese potentiellen β -Tryptase-Inhibitoren sind prinzipiell aus drei Teilen aufgebaut. Sie bestehen aus jeweils zwei identischen Kopfgruppen mit potentiell inhibitorischer Wirkung und einem Bindeglied, das diese miteinander verbindet und so den korrekten Abstand herstellt.

Die Inhibitoren sind so entwickelt worden, daß sie mit ihren Kopfgruppen in die S1-Taschen der β -Tryptase-Monomere hineinragen und diese so inaktivieren können. Asparaginsäure 189 begrenzt die S1-Tasche an ihrem Boden und interagiert mit der basischen Seitenkette des jeweiligen P1-Restes, vorzugsweise einem Lysin oder Arginin. Es ist daher sinnvoll, auch die Inhibitoren mit basischen Kopfgruppen zu versehen, so daß sie die aktiven Zentren der Proteinasen unter anderem durch die Formation einer Salzbrücke zur sauren Seitenkette des Aspartats 189 blockieren können. *Ortho*- oder *Para*-Aminobenzyl-Gruppen erwiesen sich zu diesem Zwecke als ideal, wobei bei den BYK-Inhibitoren die *Para*-Substitution und bei dem NS222-Inhibitor die *Ortho*-Substitution eine um etwa eine Größenordnung bessere Inhibition lieferte. Das Bindeglied ist bei allen drei Inhibitoren als ein relativ starres Konstrukt gewählt, das nur um sehr wenige Bindungen frei drehbar ist. Zudem haben neben den Kopfgruppen auch die Bindeglieder einen sehr hydrophilen Charakter, um die Möglichkeit eines hydrophoben Kollabierens der elongierten Moleküle in der hydrophilen inneren Pore des β -Tryptase-Tetramers zu eliminieren.

Die verschiedenen β -Tryptase-Isoformen wurden zur Bestimmung der Inhibitionskinetik mit den einzelnen Inhibitoren titriert. Für alle drei Inhibitoren ergab sich hierbei für die optimale Inhibition mit den Inhibitoren BYK150640 und NS222 ein molares Verhältnis von Inhibitor zu β -Tryptase-Monomer von $1.93 \pm 0.1 : 1$. Für den Inhibitor BYK76935 war kein eindeutiges Maximum bestimmbar. So verbesserte sich die Inhibition auch nach Überschreitung der Verhältnisgrenze von 2:1 weiter. Die Ergebnisse der kinetischen Messungen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Inhibitor	K_i [μM]	B^{bi}	a
BYK76935	0.00076	1.6	0.80
BYK150640	0.00025	1.9	0.95
NS222	0.00060	1.9	0.96

Tab. 3: Kinetische Kennzahlen der einzelnen Inhibitoren

Die einzelnen Inhibitoren wurden im Hinblick auf ihre Hemmeigenschaften bei β -Tryptasen charakterisiert. Die Ergebnisse sind hier kurz zusammengefaßt.

Alle drei Inhibitoren sind im sub-nanomolaren Bereich wirksam und besitzen so eine ausgezeichnete Proteinase-hemmende Aktivität. Außerdem wird eine exzellente Selektivität erzielt; die Bindung an β -Tryptasen ist der Bindung an Referenzproteinasen wie Trypsin oder Thrombin um mindestens vier Größenordnungen im K_i -Wert bevorzugt. Dem theoretischen B^{bi} -Wert von zwei für eine bifunktionale Bindung kommen lediglich die Inhibitoren BYK150640 und NS222 sehr nahe. Im Gegensatz dazu liegt der Inhibitor BYK76935 mit 1.6 zwischen mono- und bifunktionaler Bindung.

Um den genauen Bindungsmodus der einzelnen Inhibitoren zu ergründen, wurden die Strukturen aller drei Komplexe gelöst.

3.3.11 Struktur der **Ia**-Tryptase im Komplex mit dem Inhibitor BYK76935

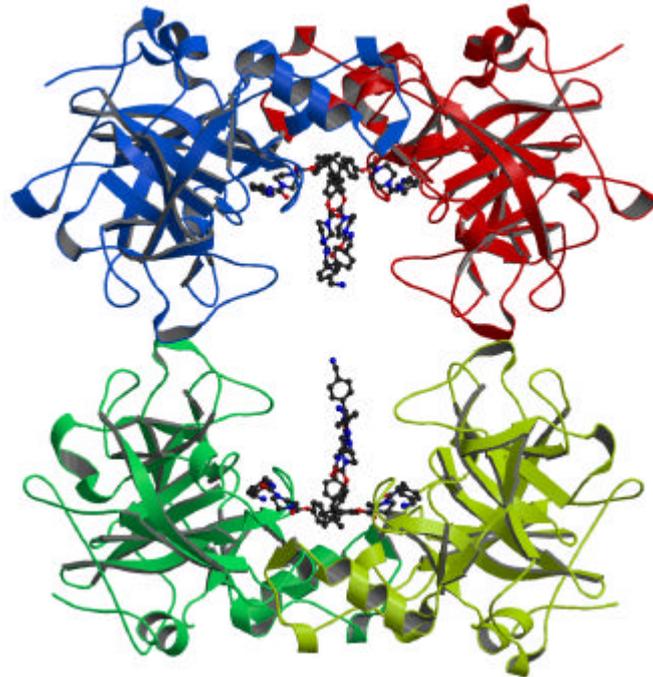


Abb. 36: Die Platzierung von BYK76935 im **Ia-Tryptase-Tetramer**

Vier BYK76935-Moleküle binden pro Tryptase-Tetramer. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT/Raster3D erstellt (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997).

Aus Abbildung 36 ist klar ersichtlich, daß entgegen aller Erwartung statt zwei Inhibitormoleküle pro Tetramer deren vier an der Tryptase-Hemmung beteiligt sind. Das für die bifunktionale Inhibition entwickelte Molekül bindet tatsächlich nur mit einer Kopfgruppe in ein aktives Zentrum. Dort befindet sich die Aminobenzyl-Gruppe in 2.5 Å Entfernung zur Seitenkette des Aspartats 189 und damit in idealer Position zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung. Der Inhibitor erfüllt den Raum der S1-Tasche in idealer Weise (Abbildung 37) und verläuft im Anschluß entlang der Molekül-Oberfläche. Von der sich anschließenden Peptidbindung im Inhibitormolekül interagiert der Carbonyl-Sauerstoff mit der 2.9 Å entfernten Seitenkette des Glutamins 192, während die die N-H-Gruppe in einer hydrophilen Umgebung, gebildet durch den Carbonyl-Sauerstoff des Serins 214 und die Seitenkette des Serins 195, eingebettet wird. Im weiteren Verlauf des Inhibitors bis zum zentralen quartären Kohlenstoff werden kaum noch zusätzliche spezifische Wechselwirkungen ausgebildet. Am ehesten wäre hier noch der Carbonyl-Kohlenstoff der

Esterbrücke zu nennen, der sich in 3.7 Å Entfernung zum peptidischen Stickstoff des Alanins 97 befindet. Der Inhibitor verläuft stets direkt entlang der Oberfläche des β -Tryptase-Tetramers, an die er sich optimal anlegt. Jedoch anstatt eine S-artige Konformation einzunehmen, um mit der andern Kopfgruppe die benachbarte S1-Tasche zu blockieren, verläuft der Inhibitor weiterhin angeschmiegt an der Moleküloberfläche, wenn auch jetzt des benachbarten Monomers. Spezifische Interaktionen treten ansonsten lediglich noch zwischen der Esterbrücke des zweiten Inhibitorarmes und der Peptidbindung des Glycins 219 des benachbarten Monomers auf, die sich in 2.8 Å Entfernung zueinander befinden. Insgesamt betrachtet bindet der Inhibitor BYK76935 allerdings durchaus bifunktional, indem er einerseits in das aktive Zentrum des einen Monomers bindet und dieses andererseits mit der Oberfläche des benachbarten Monomers verbrückt.

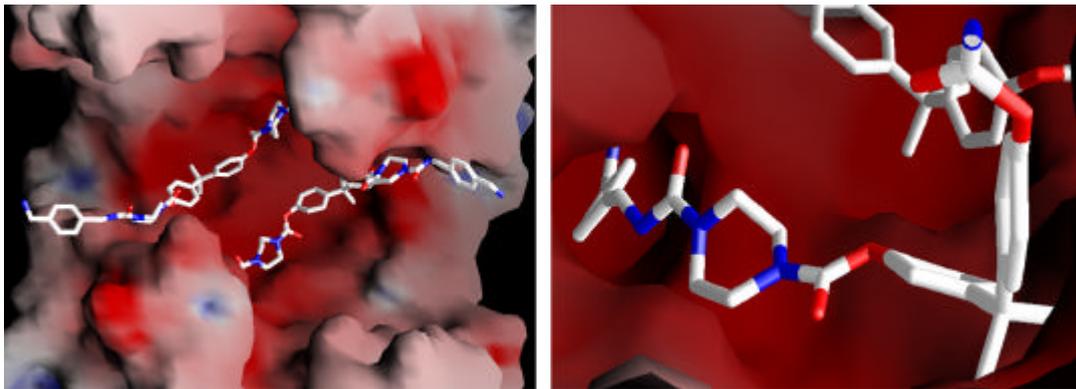


Abb. 37: BYK76935 komplexiert mit bIII-Tryptase

Das linke Teilbild zeigt den Blick vom Inneren des Tetramers aus auf das A-D-Interface. Die S1-Taschen der benachbarten Monomere befinden sich im Norden und im Süden, jedoch sind die Böden der Spezifitätstaschen nicht sichtbar. Die Inhibitoren sind als Stab-Darstellung abgebildet. Das rechte Teilbild zeigt den Blick entlang des Inhibitors bis auf den Boden der S1-Tasche. Die Oberflächen sind entsprechend ihrer Ladung gefärbt. Die Abbildung wurde mit GRASP erstellt (Nicholls *et al.*, 1993).

3.3.12 Struktur der **b III**-Tryptase im Komplex mit dem Inhibitor BYK150640

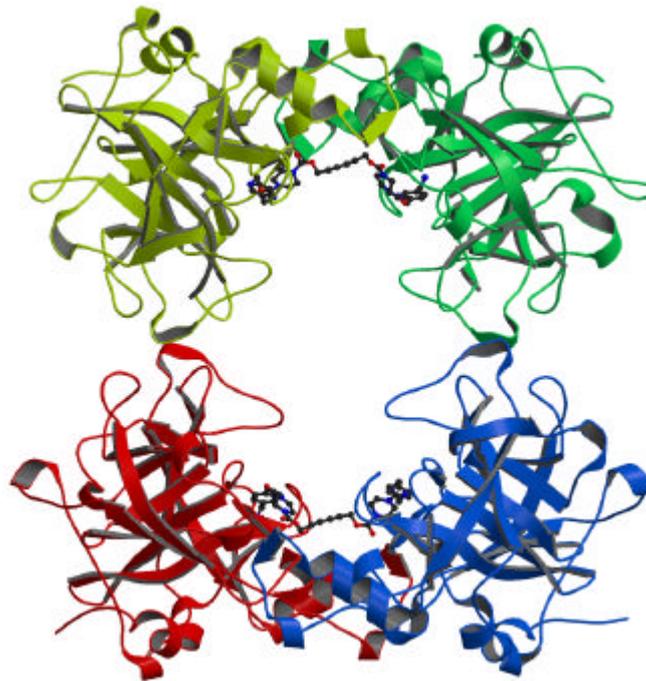


Abb. 38: Die Platzierung von BYK150640 im **b III-Tryptase-Tetramer**

Vier BYK150640-Moleküle binden pro Tryptase-Tetramer. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT/Raster3D erstellt (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997).

Abbildung 38 zeigt, wie der Inhibitor BYK150640 die aktiven Zentren der benachbarten Monomere A und D sowie B und C verbrückt, so daß insgesamt zwei Inhibitormoleküle pro β -Tryptase-Tetramer binden. Hierbei nimmt die Verbindung eine S-förmige Konformation ein, die dieses Verhalten ermöglicht. Die Aminobenzyl-Gruppe wird in der S1-Spezifitätstasche aufgenommen, wobei die Aminogruppe 2.6 Å entfernt zur Carboxylgruppe der Seitenkette des Aspartats 189 steht und so eine Wasserstoffbrücke bildet. Die Carbonylgruppe der sich anschließenden Peptidbindung wird durch Wechselwirkungen mit der in einem Abstand von 2.7 Å positionierten Hydroxylgruppe des Serins 195 und dem Stickstoff der Imidazolgruppe des Histidins 57 koordiniert, die sich in einem Abstand von 2.9 Å ebenfalls in guter Entfernung und Orientierung befindet, um Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Die sich anschließende Esterbindung wird ebenfalls durch eine Wasserstoffbrückenbindung des Carbonylkohlenstoffs mit dem um 2.7 Å distanzierten Stickstoff des Alanins 97 in seiner Position gehalten.

Der zweite Arm des bifunktionalen Inhibitors interagiert in gleicher Weise mit dem benachbarten Monomer. Die lineare hydrophobe Kohlenstoffkette dient hierbei als optimales Bindeglied zwischen den beiden polaren Kopfgruppen, da sie sich über einen weitgehend ungeladenen Teil der Moleküloberfläche erstreckt. Abbildung 38 zeigt den Blick aus der S1-Tasche des Monomers A, in die die Aminobenzyl-Gruppe im Vordergrund bindet, in Richtung der S1-Tasche des Monomers D. Hierbei ist die Darstellung der Oberfläche des Monomers A aus Gründen der Übersichtlichkeit ausgelassen worden. Es wird deutlich, daß beide Arme des Inhibitors in idealer Weise dazu geeignet sind, den Raum, den die Substratbindungstelle der β -Tryptasen bietet, vollständig zu füllen.

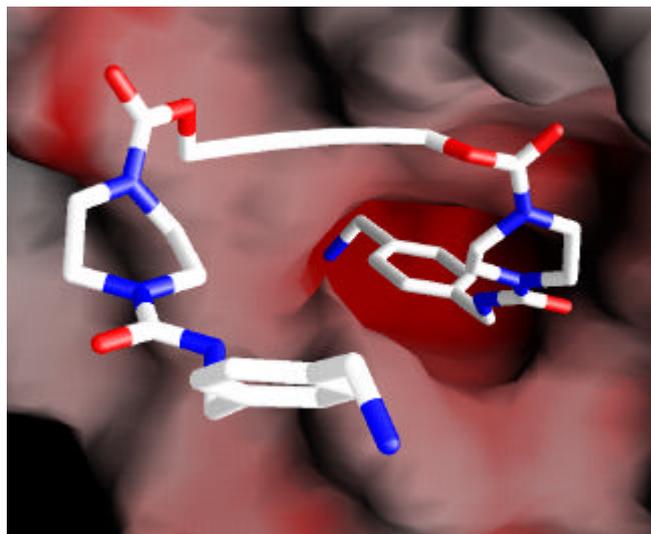


Abb. 39: BYK150640 komplexiert mit bIII-Tryptase

Der Inhibitor ist als Stab-Modell abgebildet. Der Blick richtet sich aus der S1-Tasche, in die die Aminobenzyl-Gruppe im Vordergrund bindet in die benachbarte S1-Tasche. Die Oberfläche ist relativ zu ihrer Ladung gefärbt. Die Abbildung wurde mit GRASP erstellt (Nicholls *et al.*, 1993).

3.3.13 Struktur der bIII-Tryptase im Komplex mit dem Inhibitor NS222

Die schlechte Qualität und geringe Auflösung des Datensatzes für diesen Komplex bedingt, daß die exakten Atompositionen des Inhibitors nur sehr schwer zu ermitteln waren. Auf genaue Angaben über Atomabstände und Interaktionen soll deshalb hier verzichtet

werden. Das linke Teilbild der Abbildung 39 zeigt das Ergebnis eines Modellierungs-Experimentes, in dem der Inhibitor NS222 in die aktiven Zentren der benachbarten Monomere A und D hineingedockt wurde. Cyclodextrin erweist sich hierbei als ein Platzhalter von geradezu idealen Dimensionen, um die beiden Arme des Inhibitors miteinander zu verbinden. Das Röntgenexperiment sollte im Folgenden endgültig Aufschluß über den wahren Bindungsmodus des Inhibitors geben.

Das rechte Teilbild zeigt die unverfeinerte, experimentelle bei 1σ konturierte $2F_{obs} - F_{calc}$ -Elektronen-Dichte für den Cyclodextrin-Ring. Diese befindet sich in einer für die bifunktionale Inhibition und Verbrückung der benachbarten aktiven Zentren idealen Position. Das in die experimentelle Dichte eingebaute Cyclodextrinmodell illustriert dies. Basierend auf diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß auch der Inhibitor NS222 wirklich bifunktional bindet und mit seinen Armen die Spezifitätstaschen der benachbarten Monomere A und D blockiert.

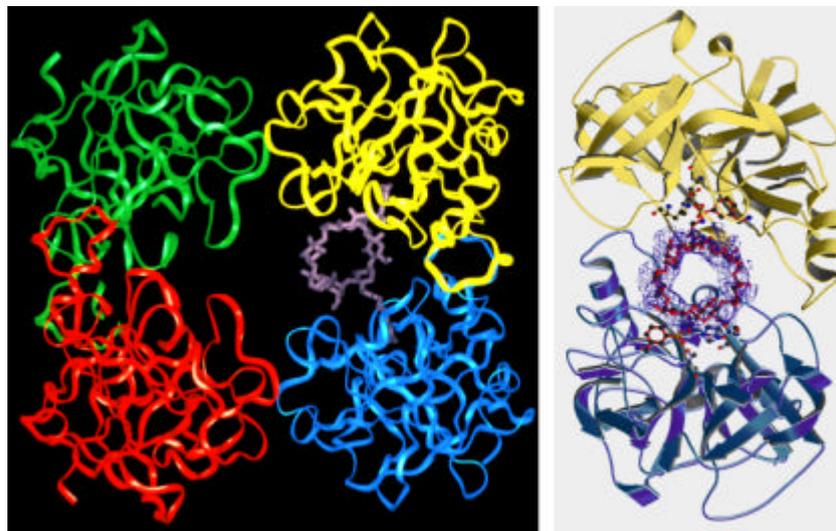


Abb. 40: Die Platzierung von NS222 im β III-Tryptase-Tetramer

Das linke Teilbild zeigt das Ergebnis einer initialen Modellierung mit SYBYL (Tripos Inc.), in dem der Inhibitor NS222 in die Struktur der β III-Tryptase eingefügt wurde. Das rechte Teilbild zeigt die experimentelle Elektronendichte für den Cyclodextrinring des Inhibitors, in die die Struktur des Inhibitors zur Illustration eingefügt wurde. Die Abbildungen wurden mit BOBSCRIPT und MOLSCRIPT/Raster3D erstellt (Esnouf, 2000) (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997).

3.4 Diskussion

Die Kristallpackung der drei β -Tryptase-Isoform-Kristalle erlaubte es, in allen Fällen unzweifelhaft das rechteckig aufgebaute Tetramer als die nativ relevante und enzymatisch aktive β -Tryptase-Tetramer-Konformation zu identifizieren. Damit ist diese Tetramer-Architektur mit der inhärenten pseudo 222 Symmetrie und den in die zentrale Pore deutenden aktiven Zentren für β Ia-Tryptase und für β III-Tryptase belegt.

Das β -Tryptase-Tetramer wird hauptsächlich durch Interaktionen der sechs beschriebenen Oberflächen-„loops“ miteinander in zwei unterschiedlichen Interfaces gebildet. Diese Oberflächen-„loops“ sind, mit Ausnahme der in der Literatur als γ -Tryptase beschriebenen Proteinase (Caughey *et al.*, 2000), in allen humanen Tryptase-Isoformen wie auch in den Tryptasen anderer Säugetiere vorhanden. In humanen β -Tryptasen sind sogar die Protein-Sequenzen dieser Bereiche streng konserviert, während auffälligerweise die Mehrzahl der Sequenzunterschiede beispielsweise im Vergleich zu α -Tryptasen ebenfalls im Bereich dieser Oberflächen-„loops“ zu finden sind. Ein Proteinsequenzvergleich legt daher den beschriebenen Tetramer-Aufbau auch bei den bisher nicht strukturell untersuchten Tryptase-Isoformen, zumindest aber bei sämtlichen β -Tryptasen sehr nahe. γ -Tryptasen bilden hierbei eine Ausnahme, da sie keine der sechs charakteristischen Oberflächen-„loops“ aufweisen und es auch bisher keinen biochemischen Hinweis auf ihr Vorliegen als Tetramer gibt. Die Benennung dieser Proteinase, die zusätzlich über einen Membrananker verfügt, als Tryptase, erfolgte auf der Grundlage der bisher etablierten Definition von Tryptasen als in Mastzellen exprimierte Trypsin-artige Serinproteinasen (Schwartz and Austen, 1980). Die neu gewonnenen Erkenntnisse über den Aufbau der β -Tryptasen werfen die Frage auf, ob die Definition von Tryptasen nicht aktualisiert und an ihre strukturell konservierten Eigenschaften angepaßt werden muß.

Viele der einzigartigen Eigenschaften der β -Tryptasen werden durch ihre Struktur leicht erklärbar. So ist deren Substratspezifität im Unterschied zu den meisten anderen Serinproteinasen höchstwahrscheinlich vornehmlich durch die Architektur des Tetramers und weniger durch die genaue Struktur des aktiven Zentrums bestimmt, die Referenz-Proteinasen

wie Trypsin oder Chymotrypsin stark ähnelt. So gesehen, können die β -Trypsasen als ein Mitglied der Gruppe der „self-compartmentalizing proteases“ betrachtet werden. Bestehend aus einer ringartigen Anordnung von lediglich vier Monomeren mit einem Gesamt-Molekulargewicht von 135 kDa stellen β -Trypsasen eine sehr kleine und einfach strukturierte Form dieser Proteinase-Klasse dar. Ihre prominentesten Vertreter bestehen sonst aus mindestens zwei Ringen mit jeweils drei identischen Monomeren, wie beispielsweise Gal6 aus *Saccharomyces cerevisiae* (300 kDa) oder die Tricorn Proteinase aus *Thermoplasma acidophilum* (720 kDa) mit bis zu vier Ringen mit sieben identischen Untereinheiten, wie das eukaryontische Proteasom (750 kDa). Alle letztgenannten Vertreter der „self-compartmentalizing proteases“ üben wichtige Funktionen in der Proteindegradation in der Zelle aus. Im Gegensatz dazu sind β -Trypsasen sowohl im Zellplasma als auch im extrazellulären Raum vollständig aktiv (Schwartz and Bradford, 1986) (Goldstein *et al.*, 1992) und in die Immunantwort involviert.

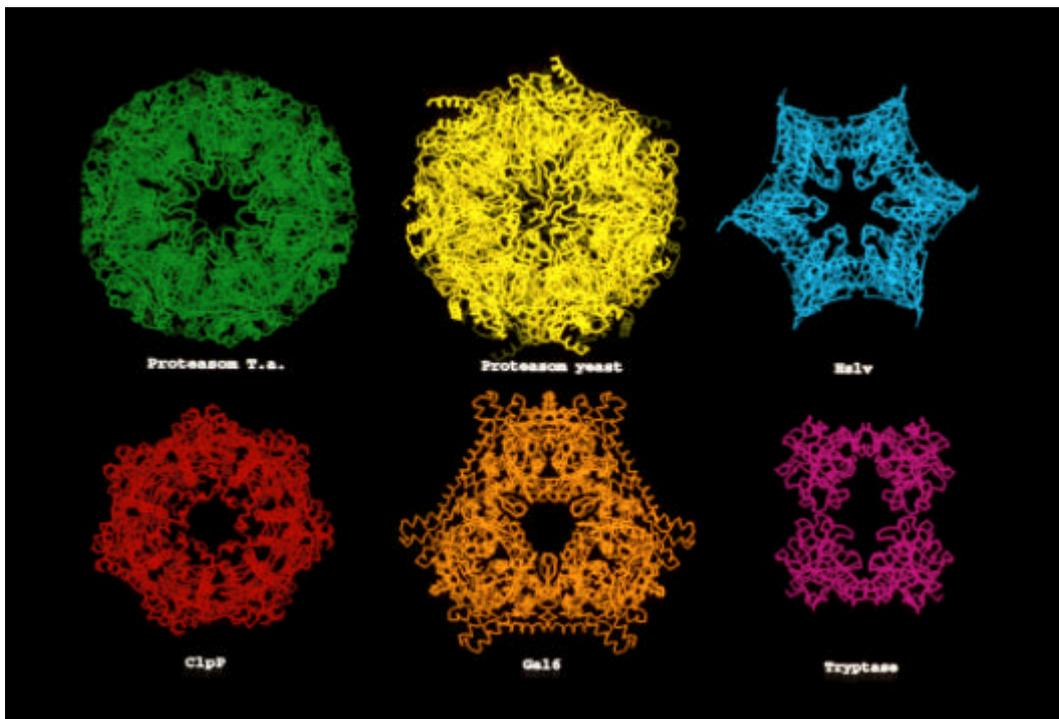


Abb. 41: Einige Vertreter der „self-compartmentalizing proteases“

Trypsasen sind der mit Abstand kleinste Vertreter der „self-compartmentalizing proteases“. Alle Proteinasen dieser Klasse sind hoch-symmetrisch aufgebaut. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997) erstellt.

Die Struktur des β -Tryptase-Tetramers erklärt seine Resistenz gegenüber fast allen makromolekularen Serinproteinase-Inhibitoren. So zeigten die Serpine („serine proteinase inhibitors“) α_1 -Proteinase Inhibitor, Antithrombin III und C1-Esterase-Inhibitor sowie α_2 -Makroglobulin keinerlei hemmende Wirkung bei Tryptasen (Schwartz and Bradford, 1986) (Alter *et al.*, 1990). Dieses liegt eindeutig in der verminderten Zugängigkeit der aktiven Zentren durch den Tetramer-Aufbau begründet. Aber auch kleinere Inhibitoren, wie etwa die des Kazal-Typs oder des Kunitz-Typs können nicht an die aktiven Zentren der humanen β -Tryptase binden, da sie insbesondere mit dem 147-„loop“ des jeweils benachbarten Monomers kollidieren würden. So erklärt sich die Inaktivität von Rinder-pankreatischem Trypsin-Inhibitor (Aprotinin) und der Kunitz-Domäne der Vorstufe des Alzheimer- β -Amyloid-Proteins. In dieser Hinsicht unterscheiden sich humane β -Tryptasen von Tryptasen anderer Säugetiere, die häufig mit ihren endogenen Inhibitoren des Kunitz-Typs kolokalisiert sind. So wird Rinder-Tryptase sehr wohl durch Aprotinin (Fiorucci *et al.*, 1995) und Ratten-Tryptase durch Trypstatin (Kido *et al.*, 1988) gehemmt. Diese Ergebnisse lassen in diesen Tryptasen eine von humanen β -Tryptasen verschiedene Tetramer-Architektur erwarten. Vermutlich ist die zentrale Pore in diesen verwandten Enzymen etwas größer dimensioniert. Der bisher einzige gefundene natürliche Inhibitor, der humane β -Tryptase inhibiert, ist der vom medizinischen Blutegel (*Hirudo medicinalis*) stammende, aus 46 Aminosäuren bestehende „leech derived tryptase inhibitor“ (LDTI) (Sommerhoff *et al.*, 1994). Modellierung Studien haben ergeben, daß dieser Inhibitor genau in die zentrale Pore des Tryptase-Tetramers paßt.

Auch die Erfordernis der Bindung von Proteoglykanen an β -Tryptasen für deren Stabilität wird aus der Tetramer-Struktur erklärlich. Durch die Bindung von Heparin an die A-B-Peripherie des Tetramers wird dieses durch seine Hydrophobizität und durch seine geringe Ausdehnung gekennzeichnete A-B-Interface stabilisiert und so der Zusammenhalt des Tetramers gewährleistet.

Die einzelnen Isoformen der β -Tryptasen haben eine oft über 99 % liegende Sequenzidentität. Sie weisen zum Teil lediglich eine unterschiedliche Anzahl an N-Glykolysierungsorten auf und im Falle der β III-Tryptase ist zusätzlich ein etwas stabileres A-B-Interface zu erwarten. Warum dennoch derart viele β -Tryptase-Isoformen gleichberechtigt produziert werden, ist unklar. Neue Ergebnisse lassen vermuten, daß β I-Tryptasen und β II-Tryptasen sogar funktional äquivalent sind (Harris J.L. *et al.*, 2001); mit

anderen Worten, daß die Anzahl der N-Glykosylierungsorte keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität hat. Strukturell gibt es ebenfalls kaum Anhaltspunkte, daß sich die veränderte Interface-Stabilität in β III-Trypsin auf die proteolytischen Eigenschaften des Enzyms auswirken könnte.

Wirksam inhibiert werden alle Isoformen der β -Trypsinen durch niedermolekulare synthetische Serinproteinase-Inhibitoren wie beispielsweise Diisopropylfluorophosphat oder verschiedene Benzamidderivate (Smith *et al.*, 1984) (Sturzebecher *et al.*, 1992). Aufgrund der häufig relativ geringen Affinität dieser bisher synthetisierten Inhibitoren, die durch deren K_i -Wert im lediglich micromolaren Bereich ausgedrückt wird, sind diese Präparate jedoch für ihre Applikation *in vivo* nicht geeignet. Häufig sind diese Verbindungen zusätzlich instabil gegenüber dem Stoffwechsel oder weisen eine hohe Toxizität auf.

Wegweisend für die Entwicklung klinisch verwertbarer Inhibitoren wird das Problem der geringen Spezifität in der Natur ebenfalls durch multivalente Inhibition gelöst. So wurden im medizinischen Blutegel (*Hirudo medicinalis*) und im javanesischen Blutegel (*Hirudo javanica*) neben dem monomerisch vorliegenden „leech derived trypsin inhibitor“ (LDTI) ebenfalls multimere Varianten identifiziert (Piechottka, 2001) (Matschiner, 1998). Die K_i -Werte fallen hierbei bis in den niederen pikomolaren Bereich, während der K_i -Wert der LDTI-Monomere im nanomolaren Bereich liegt.

Verschiedene Studien mit synthetischen bivalenten Inhibitoren sind bereits von uns und anderen Gruppen durchgeführt worden (Rice *et al.*, 2000a; Rice *et al.*, 1998; Rice *et al.*, 2000b) (Sturzebecher *et al.*, 1992) (Schaschke *et al.*, 2000; Schaschke *et al.*, 2001) (Ono *et al.*, 1999) (Wright *et al.*, 1999) (Burgess *et al.*, 1999). Hierbei wurden aus synthesechemischen Gründen stets symmetrische Verbindungen entwickelt. Diese bestanden aus zwei, möglichst paßgenau für die Insertion in die S1-Tasche und die Bindung an die Seitenkette des Aspartats 189 gestalteten, basischen Kopfgruppen, die durch ein flexibles Bindeglied miteinander verbunden sind. Diese Flexibilität sollte die Anpassung an die jeweilige Umgebung erleichtern. Die Variation eines hierbei im Linker enthaltenen $(-\text{CH}_2)_n$ -Elementes lieferte einen optimalen K_i -Wert für eine bestimmte Moleküllänge, der sich bei Verlängerung und bei Verkürzung des Verbindungssegmentes verschlechterte. Dieses Verhalten wurde mit einem bifunktionalen Bindungsmodus am K_i -Optimum begründet, auch wenn dieses Postulat bisher strukturell noch nie belegt werden konnte.

Eine Aminosäurenkette bestehend aus acht Aminosäuren kann die aktiven Zentren der β -Tryptasen miteinander verbinden, wie im Modell in Abbildung 41 gezeigt. Die strenge Geometrie der aktiven Zentren zueinander könnte als strukturelle Grundlage für eine Funktion als „molecular ruler“ dienen. Erste experimentelle Studien zeigen, daß β -Tryptasen tatsächlich geeignete elongierte peptidische Substrate in Peptide, bestehend aus acht Aminosäuren, zerlegen können (T. Laßleben, persönliche Kommunikation).

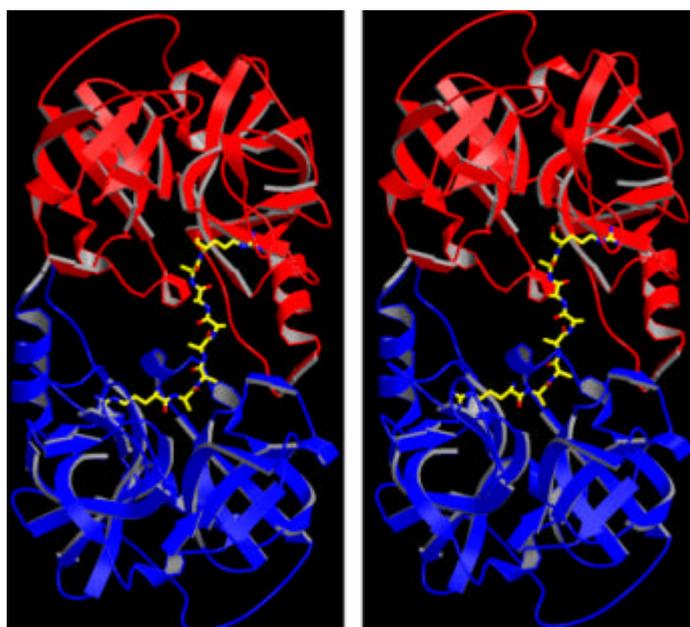


Abb. 42: Acht Aminosäuren können zwei benachbarte aktive Zentren verbrücken

Die aktiven Zentren der Monomere A und D können durch eine Aminosäure bestehend aus acht Gliedern, hier Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys miteinander verbunden werden. Diese Stereo-Abbildung wurde erstellt mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997).

Inhibitoren, die diese aktiven Zentren verbrücken sollen, müssen daher mindestens die Länge eines achtlgliedrigen Polypeptids besitzen. Die im Rahmen dieser Studie verwendeten Inhibitoren unterscheiden sich von den bisher untersuchten Verbindungen durch ihr starres Bindeglied, was den Verlust an Konformationsentropie durch die Komplexbildung verringert. Die Inhibitoren BYK150640 und BYK76935 können aufgrund ihrer geringen Größe durchaus als Leitstrukturen für die Entwicklung klinisch einsetzbarer Verbindungen dienen. Das Cyclodextrinderivat hingegen ist aufgrund seines Zuckerkerns metabolisch instabil und aufgrund seiner Größe als potentiell nur schwer bioverfügbares Präparat einzustufen und daher eher als eine *in vitro* zu benutzende Modellverbindung für die selektive

bivalente Inhibition von Tryptasen zu betrachten. Hierbei haben die über den Bindungsmodus der Kopfgruppen gewonnenen Erkenntnisse durchaus klinische Relevanz.

Erstmalig ist es gelungen, durch die Lösung einer Kristallstruktur den bivalenten Bindungsmodus eines Inhibitormoleküls zu belegen. Die drei Strukturen zeigen, daß die Verbindungen BYK150640 und NS222 bifunktional die zwei benachbarten aktiven Zentren der Monomere A und D miteinander verbrücken. Für das Inhibitorendesign ergibt sich aus diesen Studien, daß für die Ausnutzung der besonderen Tryptase-Architektur für die Inhibition nicht unbedingt nur die Geometrie der aktiven Zentren zueinander eine besondere Rolle spielen muß. Es ist durchaus auch die Bindung an eine Exosite abseits eines aktiven Zentrums als Strategie denkbar. Dies würde die Verwendung von unsymmetrischen Molekülen ermöglichen, die den Vorteil haben, in Bezug auf ihre funktionellen Gruppen leichter variierbar zu sein. So können Verbindungen wesentlich einfacher auf ihre Bioverfügbarkeit optimiert werden. Beispielsweise wäre es möglich, um das Molekulargewicht eines Inhibitors zu verringern, eine Verbindung zu entwickeln, die einerseits in ein aktives Zentrum bindet und sich andererseits an die Tryptase-spezifische A-D-„loop“-Region im A-D-Interface anlagert.

Der mit Hilfe von kinetischen Messungen ermittelte Faktor B^{bi} für die Verbindungen BYK150640 und NS222 von 1.9 liegt nahe bei dem theoretischen Wert von zwei für die bifunktionale Bindung. Für die Verbindung BYK76935 konnte lediglich ein B^{bi} -Wert von 1.6 bestimmt werden. Die entsprechende Kristallstruktur liefert für diesen Wert eine plausible Erklärung. Der Inhibitor bindet lediglich an ein aktives Zentrum und zusätzlich an eine Exosite an der Oberfläche des benachbarten Monomers. Diese Exosite weist offenbar eine geringere Affinität für die Kopfgruppe des Inhibitors auf, als das aktive Zentrum der Proteinase. Hieraus erklärt sich ein geringerer K^{mono} -Wert für diese Teilreaktion, was sich dann in einem ebenfalls reduzierten Wert von B^{bi} zeigt.

Schlußfolgernd aus diesen Experimenten ergibt sich, daß der theoretische Faktor B^{bi} streng mit dem wahrhaften Bindungsmodus korreliert und so die experimentelle Ermittlung dieses Wertes Voraussagen über die Art der Bindung eines entsprechenden Inhibitors zuläßt.

4 Humane α -Tryptase – Kristallstruktur und funktionale Charakterisierung

4.1 Vorbemerkungen

Trotz der knapp über 90 % liegenden Sequenzidentität zwischen α -Tryptasen und β -Tryptasen (Lutzelschwab *et al.*, 1997), gibt es entscheidende Unterschiede zwischen den beiden Isoformen. Diese lassen unterschiedliche Rollen der beiden Tryptasen *in vivo* erwarten.

Während β -Tryptasen den Hauptteil der Tryptasen in Mastzellen darstellen, so werden α -Tryptasen nur in geringeren Mengen in Lungen- und Haut-Mastzellen exprimiert. Sie sind jedoch die einzige Tryptase-Isoform, die in Basophilen generiert wird, wie durch Analyse der mRNA-Häufigkeit (Xia *et al.*, 1995) und durch Antikörper-Färbung (Castells *et al.*, 1987) festgestellt wurde. In der monozytären Zelllinie Mono-Mac-6 wurde ebenfalls nur α -Tryptase gefunden (Huang *et al.*, 1993).

Zunächst wurde vermutet, daß α -Tryptasen nicht korrekt zur reifen Serinproteinase prozessiert würden, da sich die pro-Form der α -Tryptase an Position –3 von der pro-Form der β -Tryptase unterscheidet. Hier ist ein Glutamin durch ein Arginin ersetzt, ein Austausch, von dem erwartet wurde, daß er eine Reifung der pro- α -Tryptase zur α -Tryptase und damit zur aktiven Proteinase verhindere (Sakai *et al.*, 1996). Erst kürzlich gelang es, humane α -Tryptase sowohl in Insektenzellen (Huang *et al.*, 1999) als auch in transfizierten COS-Zellen (Mirza *et al.*, 1997) zu exprimieren. In beiden Fällen war die Tryptase korrekt zum reifen Enzym prozessiert. Das zeigte, daß sowohl der erste autokatalytische Schritt von der pro- α -Tryptase zur pro'- α -Tryptase als auch die Reifung der pro'- α -Tryptase zum reifen α -Tryptase-Tetramer auch im Falle des α -Isoenzym vollständig ausgeführt werden. Hiermit konnte die initiale Vermutung Sakais widerlegt werden.

Obwohl diese rekombinant produzierte α -Tryptase sowohl vollständig gereift als auch tetramerisiert war, allem Anschein nach also eine vollständig aktive Serinproteinase vorlag,

zeigte sie keinerlei hydrolytische Aktivität gegen proteinogene Substrate der β -Tryptasen (Huang *et al.*, 1999). Nur für das Substrat tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA wurde eine extrem schwache, nicht quantifizierbare hydrolytische Aktivität beobachtet, die allerdings auch möglicherweise auf eine Probenverunreinigung zurückzuführen sein könnte. Aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen α - und β -Tryptasen ist dieser drastische Unterschied in der Aktivität um so erstaunlicher.

Von den 245 Aminosäuren der α I-Tryptase unterscheiden sich nur 17 Aminosäuren von der hydrolytisch voll aktiven β Ia-Tryptase. Für die Inaktivität der α -Tryptase wird im allgemeinen eine einzige Aminosäure in der Nähe des „aktiven“ Zentrums der α -Tryptase, Die Asparaginsäure 216, verantwortlich gehalten. Durch Homologie-Modellierung unter Zuhilfenahme der gelösten Struktur der β II-Tryptase wurde Asparaginsäure 216 am Rand der Spezifitäts-Tasche der α -Tryptase lokalisiert. Während das in β -Tryptasen vorhandene Glycin 216 diese räumlich nicht einschränkt, wurde von der Seitenkette des Aspartats erwartet, daß es den in der S1-Tasche zur Verfügung stehenden Raum einschränke und zusätzlich durch seine eigene Ladung die Oberflächen-Beschaffenheit der Spezifitäts-Tasche verändere. Hierdurch entstünde eine möglicherweise alternierte Substratspezifität oder gegebenenfalls eine Inaktivität. Da es bisher jedoch nicht gelungen ist, ein mögliches Substrat für α -Tryptasen zu identifizieren, werden α -Tryptasen gemeinhin als inaktive Serinproteinasen angesehen.

Die wichtige Rolle, die Die Asparaginsäure 216 diesbezüglich ausübt, wurde durch Mutationsexperimente demonstriert, wo Die Asparaginsäure 216 in der α -Tryptase zu einem in β -Tryptasen an dieser Position vorhandenen Glycin mutiert wurde (Huang *et al.*, 1999). Hierdurch gelang es, eine Aktivität gegen Substrate der β -Tryptase wieder herzustellen. Allerdings betrug diese nur etwa 1/25 der bei β -Tryptasen beobachteten Aktivität, was darauf schließen läßt, daß auch andere der sich in den Isoformen unterscheidenden Aminosäuren Einfluß auf die Aktivität des Enzyms haben.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen α - und β -Tryptasen ist es, daß im Gegensatz zu β -Tryptasen α -Tryptasen nicht in den Sekretions-Granula gelagert werden, sondern anstelle dessen laufend freigesetzt werden (Sakai *et al.*, 1996). Dies ist konsistent mit der im Laufe dieser Arbeit beschriebenen Beobachtung, daß das α -Tryptase-Tetramer im Gegensatz zum β -Tryptase-Tetramer für seine Stabilität der Heparinbindung nicht bedarf.

Erhöhte α -Tryptase-Konzentrationen sind bisher im Blut von Patienten mit systemischer Mastocystis (Schwartz *et al.*, 1995) und chronischen Allergierkrankungen (Li *et al.*, 1998) nachgewiesen worden. Diese Erkenntnisse verlangen nach einer genaueren Untersuchung der Frage, ob α -Tryptase eine aktive Proteinase ist, oder nicht.

Zur Funktion der α -Tryptasen ist zur Zeit in der Literatur nur wenig beschrieben. Wie bereits erwähnt, sind noch keinerlei Substrate für α -Tryptase identifiziert worden. Außerdem ist seit kurzem bekannt, daß α -Tryptasen im Gegensatz zu β -Tryptasen nicht für die Anziehung von Basophilen aus dem Blutkreislauf verantwortlich sind (Huang 2001). Einige mögliche Funktionen der α -Tryptase ergeben sich aus dieser Arbeit und sollen im Anschluß an dieses Kapitel diskutiert werden.

Um die anscheinende Inaktivität reifer α -Tryptase sowie die ihr zugrunde liegenden strukturellen Ursachen zu ergründen, ist hier die Kristallstruktur der reifen α I-Tryptase gelöst worden. Diese Untersuchungen ergaben für das aktive Zentrum, abweichend von den vorstehend beschriebenen Vermutungen, eine komplett umgeordnete Substratbindungsregion. Diese strukturelle Konformation ist weder kompatibel mit initialer Substratbindung noch mit anschließender Hydrolyse einer Peptidbindung und erklärt so die beobachtete proteolytische Inaktivität dieser Tryptase-Isoform. Weiterhin läßt diese Kristallstruktur Schlüsse zu, die die beobachtete erhöhte Stabilität des α -Tryptase-Tetramers auch ohne Heparinbindung erklären könnten.

Im Hinblick auf die besonderen Eigenschaften der α -Tryptase hinsichtlich des tetramerischen Aufbaus und der Tetramer-Stabilität sowie der Tatsache, daß diese Tryptase-Isoform die mit Abstand am häufigsten auftretende Isoform im Blut ist, stellt sich die Frage, ob α -Tryptasen neben nicht-proteolytischen Funktionen möglicherweise doch proteolytisch aktiv sein können. Dies würde allerdings wiederum eine Umordnung des „aktiven“ Zentrums zu der in der β -Tryptase sowie in allen anderen Serinproteinase gefundenen Konformation voraussetzen. Ein solcher Schritt könnte beispielsweise durch die Bindung eines idealen Substrates initiiert werden. Ein solcher „induced-fit“ Mechanismus ist bisher bei Serinproteinase unbeobachtet und würde einen neuen Weg der Proteinase-Regulation repräsentieren.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, ist hier eine systematische Suche nach proteolytischer Aktivität der α -Tryptase durchgeführt worden. Tatsächlich ist es im Rahmen

dieser Experimente gelungen, mit „bovine serum albumin“ (BSA) ein, wenn auch nicht physiologisches, Protein-Substrat zu identifizieren, das exakt an einem Ort in der Proteinsequenz hydrolysiert wird. Basierend auf diesen Ergebnissen war es möglich, ein peptidisches Substrat zu entwickeln, und so die proteolytische Aktivität der α -Tryptase hinsichtlich ihrer kinetischen Konstanten zu charakterisieren. Interessanterweise läßt sich diese Aktivität der α -Tryptase durch die Komplexbildung von Zn^{2+} inhibieren. Zur genaueren Untersuchung des Mechanismus, nach dem Zn^{2+} die proteolytische Aktivität einschränkt, wurde die Struktur eines Zn^{2+} -Komplexes der α -Tryptase ebenfalls gelöst.

4.2 Materialien und Methoden

4.2.1 Klonierung, Expression und Selektion niedrig glykolysierter Tryptase

α -Tryptase wurde analog zu den vorstehend beschriebenen β -Tryptasen kloniert und aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2.). Die cDNA des α -Tryptase Gens wurde in den pPICZA α -Vektor kloniert und der Hefestamm *pichia pastoris* mit diesem Klon elektrotransformiert. Die Kultivierung der Hefezellen bis zu Zelldichten von 80g/l erfolgte in einem Fermenter. Nach der Expression der Proteinase und deren Aufreinigung mit Hilfe der Kationenaustauschchromatographie folgte die Vereinigung der schwach glykolysierten α I-Tryptase-Fractionen, die für Kristallisationsversuche geeignet sind.

4.2.2 Konzentration

Die Einengung der von der Kationenaustauschersäule eluierten niedrig glykolysierten Fractionen erfolgte in Analogie zur Einengung der β -Tryptase-Isoformen (siehe Kapitel 3.2.4.). Auf die Einstellung der Präparation auf einen NaCl-Gehalt von 1.5 M konnte aufgrund der anscheinend erhöhten Stabilität des α -Tryptase-Tetramers verzichtet werden. Abschließend wurde die auf 6.6 mg/ml konzentrierte Proteinlösung durch Filtration durch eine proteinabweisende Membran mit einer Porengröße von 0.22 μ m von Schwebstoffen und anderen Verunreinigungen befreit.

4.2.3 Kristallisation

Die Kristallisationsansätze erfolgten methodisch analog dem in Kapitel 3.2.5. beschriebenen Verfahren.

Die besten Kristalle entstanden, wenn 1.5 μ l einer auf 6.6 mg/ml konzentrierten Proteinlösung mit einem gleichen Volumen an Präzipitanzlösung vermischt und gegen 500 μ l Präzipitanzlösung äquilibriert wurde. Die Präzipitanzlösung bestand aus 22 % PEG4000 und 0.1 M Magnesiumchlorid in einem 100 mM HEPES-Puffer, pH-Wert 7.6 und wurde mit einer dünnen Schicht Mineralöl (Sigma) überlagert, um die Äquilibrationszeit zu verlängern. Kleine, stäbchenförmige Kristalle wuchsen innerhalb einer Woche. Diese Kristalle wurden anschließend zum „macro-seeding“ verwendet. Die umgesetzten Kristalle wuchsen nun im Laufe einer weiteren Woche bis zu einer typischen Größe von 150 μ m x 150 μ m x 230 μ m heran und waren von ihren Dimensionen her gut für die Röntgenstrukturanalyse geeignet.

Zur Herstellung der Zn^{2+} - α I-Tryptase-Komplexe wurde zu den in ihrer Mutterlauge befindlichen α I-Tryptase-Kristallen 0.2 μ l einer 10 mM $ZnCl_2$ -Lösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten konnten die Kristalle geerntet und zur Strukturanalyse verwendet werden.

4.2.4 Datensammlung

Zur Aufnahme der Diffraktionsdaten wurden die Kristalle zunächst in silanisierten Quarzkapillaren (Mark-Röhrchen für röntgenographische Aufnahmen, W. Müller, Berlin) montiert und bei Raumtemperatur in einer Serie von Rotationsaufnahmen bei einem Drehwinkel von 1° an einem mit Graphit Monochromator versehenen Drehanodengenerator (Rigaku RU 300, Hong-Kong) vermessen. Die Datenaufzeichnung erfolgte mit Hilfe eines 300 mm „image plate“ Detektors (Marresearch, Hamburg). Leider ließ die Datenqualität bei solchen Aufnahmen bei zunehmender Meßzeit stark nach, so daß bei einer initialen Auflösung bis zu 3.0 Å nach bereits drei Aufnahmen keine Reflexe mehr erkennbar waren. Diese Verschlechterung der Datenqualität ist auf eine durch die starke Röntgenstrahlung verursachte Schädigung des Kristalls zurückzuführen.

Um die Schädigung des Kristalls durch die Röntgenstrahlung zu vermindern, sollte die Datenaufnahme bei $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgen. Hierzu wurde der Kristall mit einer Kryoprotektanz behandelt. Im Fall der α -Tryptase wurde zu den Kristallen in ihrer Mutterlauge in 15-minütigen Abständen jeweils $0.1\text{ }\mu\text{l}$ L,L-2,3-Butandiol hinzugegeben. Anschließend wurden die Kristalle mit Hilfe eines „cryo-loops“ aus der Mutterlauge gefischt, augenblicklich in flüssigen Stickstoff getaucht und so blitzgefroren. Während der Datenaufnahme erfolgte die Kühlung des Kristalls durch permanente Bedampfung mit einem auf 100 K temperierten Stickstoffstrom. Als geeignete Apparatur wurde hierzu ein „cryostream cryosystem“ (Oxford Cryosystems, Oxford, U.K.) verwendet.

Vorläufige Datensätze für die α -Tryptase Kristalle und der Datensatz für den Zn^{2+} -Komplex der α -Tryptase wurden“ mit $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung, produziert von einer rotierenden Kupfer-Anode, bei 100 K aufgenommen. Die Datenaufnahme bis zu einer Auflösung von etwa 3.0 \AA erfolgte in 0.8° -Schritten unter Benutzung einer 345 mm „image plate“ (Marresearch, Hamburg) gesammelt.

An der „wiggler-beamline“ BW6, die an den DORIS-Ring am deutschen Elektronen-Synchrotron in Hamburg gekoppelt ist, konnte der endgültige Datensatz für die α -Tryptase-Kristalle aufgenommen werden. Die deutlich höhere Intensität der Röntgenstrahlung an dieser „beamline“ erlaubte eine Datenaufnahme bei signifikant verbesserter Auflösung. So gelang eine Datensammlung bis zu einer Auflösung von 2.2 \AA in 0.8° Inkrementen über einen Gesamtmeßbereich von 90° .

4.2.5 Integration und Phasierung

Die Intensitäten der Reflexe beider Datensätze wurden mit MOSFLM, Version 6.1 (Leslie, 1991) integriert und mit den Programmen SCALA und TRUNCATE der CCP4 suite (Collaborative Computational Project, 1994) zusammengefaßt und skaliert.

Die Orientierung und die Anordnung der α -Tryptase-Monomere in der Einheitszelle konnte nach der Methode des molekularen Ersatzes mit dem Programm AMORE (Navaza *et al.*, 1998) unter Verwendung der Reflexe im Auflösungsbereich zwischen 10 \AA und 4 \AA ermittelt werden.

Für die Phasenbestimmung der α I-Tryptase-Struktur wurden als Suchmodell sowohl β II-Tryptase-Monomere (Pereira *et al.*, 1998) als auch das von P.J.B. Pereira *et al.* postulierte Tetramer (Pereira *et al.*, 1998) als Suchmodell eingesetzt. Beide Rotations- und Translationssuchen ergaben Ergebnisse mit einer gleichen, besten Lösung. Diese hob sich sowohl durch ihren Korrelationsfaktor $c = 0.40$ als auch durch ihren R -Faktor von 44 % deutlich von der zweitbesten Lösung ($c = 0.35$, $R = 48$ %) ab. Inspektion der vorgeschlagenen Anordnung der Tryptase-Monomere, beziehungsweise Tetramere in der Einheitszelle mit dem kristallographischen Programm MAIN (Turk, 1992) ergaben keinerlei Überlappungen der Proteine und eine für Proteine typische Raumauffüllung.

Die so ermittelte Anordnung und Ausrichtung der α I-Tryptase Monomere in der Einheitszelle wurden daher als korrekt eingestuft. Da die Rotationssuche, sowie die Translationssuche in kleinen Inkrementen und nicht stufenlos erfolgt, wurde, um die Monomere endgültig korrekt zu positionieren, anschließend rechnerisch ein „positional refinement“-Schritt und ein „simulated annealing“-Schritt mit CNS (Brünger *et al.*, 1998) ausgeführt. Erst dann erfolgte die Berechnung einer initialen Differenz-Fourier-Elektronendichtekarte für den nun folgenden Modellbau.

Für die Lösung der Struktur des Zn^{2+} -Komplexes, wurde unter Verwendung der Phaseninformation aus den Kristallen der α I-Tryptase und dem prozessierten Datensatz der Zn^{2+} -Komplex-Kristalle ebenfalls eine erste Elektronendichte errechnet.

4.2.6 Modellbau und Verfeinerung

Zunächst wurden mit Hilfe von MAIN (Turk, 1992) automatisch alle sich außerhalb der experimentellen Dichte befindlichen Teile der Proteinstruktur in ihrer Besetzungszahl auf null gesetzt. Ebenso wurde mit sämtlichen Seitenketten der zwischen β II-Tryptase und α I-Tryptase unterschiedlichen Aminosäuren verfahren. Das so erhaltene, initiale Modell hatte einen R -Faktor von 41.2 % und einen freien R -Faktor (Brünger, 1992) R_{free} von 41.8 %. Sämtliche, sich unterscheidende Aminosäuren, konnten im Folgenden, soweit in der Elektronendichte eindeutig definiert, neu eingebaut und in ihrer Besetzung auf eins gesetzt werden. Das gesamte Proteinmodell wurde anhand der Elektronendichte unter Zuhilfenahme der graphischen Eigenschaften von MAIN (Turk, 1992) inspiziert und verbessert. Wie bereits aus der initialen Elektronendichte klar hervorging, war das 214-220-Segment signifikant

anders angeordnet als im β II-Trypsase-Modell und wurde daher zunächst von der Verfeinerung ausgenommen.

Die rechnerische Verfeinerung des modifizierten Modells erfolgte anschließend unter Benutzung der Molekulardynamik von CNS (Brünger *et al.*, 1998), einem „maximum likelihood target“ (Adams *et al.*, 1997) und den durch die Engh-Huber-Parameter (Engh and Huber, 1991) definierten idealen Bindungslängen und -winkel. Hierbei wurden zusätzlich schwache, nicht-kristallographische Symmetrie (NCS)-Einschränkungen verwendet, die ein Kraftfeld darstellen, das alle vier Monomere, die eine asymmetrische Einheit bilden, exakt aufeinander abbildet.

Der gesamte Vorgang des Modellbaus beinhaltete mehrere Zyklen von Modellbau abwechselnd mit rechnerischer Verfeinerung, hauptsächlich durch „positional-refinement“ und Anpassung der *B*-Faktoren, bis zur Konvergenz der *R*-Faktoren. Zu diesem Zeitpunkt war die Elektronendichtekarte für den bisher ausgelassenen 214-220 „loop“ von ausgezeichneter Qualität, so daß nun auch diese Sequenz in das Modell mit aufgenommen werden konnte. In den abschließenden Verfeinerungszyklen wurde eine „bulk solvent“-Korrektur angewandt, und außerdem wurden Wassermoleküle an stereochemisch richtigen und in der Elektronendichtekarte definierten Positionen in das Modell eingeführt.

Im Falle des Zn^{2+} -Komplexes mußte aufgrund der niedrigen Auflösung auf den Einbau von Kristallwasser in das Modell verzichtet werden. An den Orten extrem hoher Elektronendichte wurden Zn^{2+} -Kationen in das Modell eingesetzt, sofern die stereochemische Umgebung dies als vernünftig erscheinen ließ.

4.2.7 HPLC-Experimente

5 μl humaner α I-Trypsase (6.6 mg/ml) wurden mit 5 μl Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markiertem Casein (2 mg/ml) in 90 μl Trypsase-Puffer (50 mM Tris HCl, pH 7.0, 5 mM MgCl_2) bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Eine Kontrollreaktion ohne α I-Trypsase wurde unter ansonsten identischen Bedingungen durchgeführt. Die Analyse beider Proben erfolgte anschließend auf einer „reversed phase“ X-TERRA-TM-C8 Chromatographiesäule (5 μm , 3.9x150 mm) mittels HPLC. Die Proteinfragmente wurden mit einem Gradienten von A (5% AcCN, 95% 2%ige H_3PO_4) bis B (90% AcCN) in einem

zeitlichem Rahmen von 18 Minuten von der Säule eluiert. Die Ermittlung des Elutionsprofils erfolgte durch Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 440 nm.

4.2.8 Zymographische Studien

20 μ l einer auf 0.1 μ g/ μ l konzentrierten humanen α I-Tryptase - Probe wurden in 80 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8, 10 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS und 0.0025 % Bromphenol-Blau für 10 Minuten inkubiert und anschließend auf ein vorgefärbtes, Casein enthaltendes Zymogram Gradienten-Acrylamidgel (4-16 %) aufgetragen. Die chromatographische Trennung erfolgte in einem Tris-Glycin Laufpuffer (29 g Tris-Base, 144 g Glycin und 10 g SDS in 10 l Wasser) bei einer konstanten Spannung von 125 V. Als Molekulargewichtsmarker diente hierbei ein vorgefärbter Standard-Marker. Gleichzeitig wurde als Kontrolle ein identischer Gel-Elektrophorese-Versuch durchgeführt, bei dem anstatt eines Casein-Gels ein normales Gel Verwendung fand. Die aufgetrennten Proben in diesem Kontroll-Gel wurden anschließend nach der Methode des „Western Transfers“ auf eine Poly-Vinyliden-Difluorid (PVDF) Membran übertragen und im Anschluß mit Commassie-Blue R-250 angefärbt. Das Zymogramm-Gel wurde kurz mit deionisiertem Wasser gewaschen und dann für 30 Minuten in 100 ml Renaturierungs-Puffer (2,5% (v/v) Triton X-100 in Wasser) unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Renaturierungs-Puffer wurde dann durch 100 ml Entwicklungspuffer (12.1 g Tris-Base, 63 g Tris-HCl, 117 g NaCl, 7.4 g CaCl_2 und 0.02 % (w/v) Brij 35 in 10 l Wasser) ersetzt und die Agitation 30 Minuten lang fortgesetzt. Anschließend wurde der Entwicklungspuffer durch frischen Puffer ersetzt und die Entwicklungsreaktion in einen 37 °C warmen Reaktor transferiert. Nach etwa vier Stunden war die klare Bande eindeutig zu erkennen und nach weiteren zwölf Stunden war der beobachtbare Kontrast optimal. Das Zymogramm-Gel und die Transfer-Membran wurden verglichen. Eine Bande auf der Membran konnte der klaren Bande eindeutig zugeordnet werden. Diese Proteinbande wurde mit der Edman-Methode sequenziert.

4.2.9 Massenspektroskopische Experimente

In einem Gesamtvolumen von 12.5 μ l wurden 6 μ g α I-Tryptase mit 10 μ g hochreinem BSA inkubiert. Die Reaktion erfolgte in einem 50 mM Tris/Cl, pH 7.5, 5 mM MgCl_2 und

100 mM NaCl enthaltenden Puffer bei Raumtemperatur über Nacht. Die Probe wurde anschließend direkt mittels „matrix assisted laser desorption/ionization mixture reflector time-of-flight mass spectrometry“ (MALDI-TOF-MS) auf einem Bruker Reflex III TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) analysiert. Dieses Gerät war mit einem 337 nm Stickstoff-Laser ausgerüstet und benutzte dihydrobenzoische Säure als Matrix. Die Dauer des Laser-Pulses betrug 4 ns mit einer Pulsverzögerung von 20000 ns. Die Spektren resultierten aus einer Summation über 120 Pulse. Die Messungen wurden im „positive reflector“-Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 20000 V und einer Reflektoren-Spannung von 22800 V durchgeführt. Hauptsächlich einfach und doppelt positiv geladene Ionen konnten detektiert werden. Die Massen der Molekül (M^+)-„peaks“ konnten mit einer Genauigkeit von ± 5 Da ermittelt werden.

4.2.10 Kinetische Experimente

10 μ g aufgereinigter humaner α I-Tryptase wurden in einem Gesamtvolumen von 500 μ l Tryptase-Puffer (50 mM Tris/Cl, pH 7.0, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$) mit 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M und 500 μ M der Substrat-Analoga Gly-Pro-Lys-*p*NA und Gly-Pro-Arg-*p*NA versetzt. Gut vermischt wurde der Reaktionsansatz in einer Plastik-Küvette in ein Photospektrometer (UVIKON 943, BIO-TEK KONTRON instruments) überführt. Der Fortgang der stattfindenden proteolytischen Reaktion bei Raumtemperatur konnte durch Absorptionmessungen bei einer Wellenlänge von 410 nm in Zeitabständen von einer Minute über einen Gesamtzeitraum von 900 Minuten exakt verfolgt werden. Eine Kontrollreaktion, die nur das *para*-Nitroanilid-aktivierte Peptid und keine Tryptase enthielt, wurde parallel zur Datenaufnahme mitvermessen und die gemessenen Absorptionen von denen der enzymatisch katalysierten Reaktion substrahiert.

Die ermittelten kinetischen Daten für die einzelnen Reaktionen wurden mit der 32-bit Workstation Software für UV/VIS Spektroskopie (KONTRON Instruments) ausgewertet und die K_M - und v_{max} -Werte durch lineare Regression ermittelt, wobei alle Datenpunkte gleich gewichtet wurden.

4.2.11 Modellierungs-Experimente

Die Struktur humaner α I-Tryptase wurde mit humaner β II-Tryptase unter Rücksichtnahme auf deren C^α -Atompositionen mit dem kristallographischem Programm MAIN (Turk, 1992) überlagert. Der Ser 214-Cys 220-„loop“ der α I-Tryptase wurde in Anlehnung an die β -Tryptase-Struktur modelliert. In diese „aktivierte“ Form der α I-Tryptase erfolgte die Insertion der Tripeptide N-Gly-Pro-Lys-C und N-Gly-Pro-Arg-C, wobei der entsprechende Bindungsmodus dem Komplex von Trypsin und LDTI (Stubbs *et al.*, 1997) nachempfunden wurde. Sämtliche Wasser-Moleküle, die im Rahmen der Strukturlösung ermittelt wurden verblieben im Modell, mit Ausnahme derer, die mit dem eingeführten Peptid kolokalisiert waren. Sämtliche fehlenden Wasserstoffatome wurden dem Modell hinzugefügt. Mit Hilfe des Programmpaketes SYBYL (Tripos, Inc., 1997) konnte das so generierte Modell der aktivierten α I-Tryptase unter Benutzung der Powell-Methode mit maximal 1000 Iterationen, eines Tripos-Kraftfeldes und eines Terminations-Gradienten von 0.05 kcal/mol Å energetisch minimiert werden.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Präparation der α I-Tryptase

Zur Präparation von α I-Tryptase wurde eine Hefe-Kultur in einem 10 l-Fermenter angesetzt. Aus der Aufreinigung des Enzyms resultierten etwa 200 mg reinen Proteins, was einem Expressionsniveau von 20 mg/l entspricht. Die Vereinigung der für die Kristallisation ausschließlich verwertbaren, niedrig glykolysierten Fraktionen ergab jedoch nur 6.6 mg an reinem Protein.

Das so aufgereinigte Protein konnte problemlos ohne auftretenden Niederschlag auf 6.6 mg/ml aufkonzentriert werden.

4.3.2 Heparinbindung

β -Tryptase-Tetramere benötigen für ihre Stabilität die Bindung von Proteoglykanen, wie zum Beispiel Heparin, an ihre molekulare Oberfläche (siehe Kapitel 3.2.4).

Zu unserer Überraschung und in starkem Kontrast zu β -Tryptasen ist das α -Tryptase Tetramer auch bei Raumtemperatur und Salzkonzentrationen von 100 mM wochenlang stabil. Diese Heparinunabhängigkeit hat sicherlich einen Einfluß auf die physiologische Rolle der α -Tryptasen, und deshalb sollen die strukturellen Grundlagen dieser bemerkenswert erhöhten Tetramer-Stabilität im Verlauf dieser Arbeit aufgezeigt werden.

4.3.3 Kristallisation

Das vorstehend beschriebene Kristallisationsverfahren (Kapitel 4.2.3.) führte zum Wachstum der Kristalle. In Abbildung 43 ist ein typisches Exemplar gezeigt.

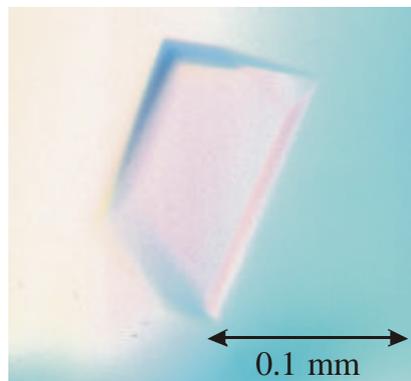


Abb. 43: Typischer α I-Tryptase-Kristall

α I-Tryptase Kristalle erreichten nach Durchlaufen der „seeding“-Prozedur die dargestellte Form und Größe.

Die röntgenographische Untersuchung dieser Kristalle ergab deren Zugehörigkeit zur kristallographischen Raumgruppe $P2_12_12_1$. In dieser Raumgruppe betragen die drei Winkel α , β und γ jeweils 90° , und die Verfeinerung der Einheitszelle ergab Kantenlängen von a

= 91.44 Å, $b = 110.69$ Å und $c = 130.09$ Å. Im Falle des Zn^{2+} -Komplexes beeinflussen die eindiffundierten Kationen diese Einheitszelle etwas, so daß sich die Zellkonstanten nun zu $a = 89.53$ Å, $b = 101.04$ Å und $c = 137.14$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ergeben.

Der Matthews-Parameter (Matthews, 1968) wurde zu 2.74 bestimmt, was einem Wassergehalt des Kristalls (v/v) von 55 % entspricht. Ein α -Tryptase-Tetramer mit einer Gesamtmasse von ~120 kDa kann als asymmetrische Einheit erwartet werden. Aufgrund der Kristallsymmetrie enthält dann die Einheitszelle die vier Tetrameren entsprechende Proteinmenge.

4.3.4 Datensammlung, Auswertung und Modellqualität

Die Auswertung der Diffraktionsdaten sowohl für die native Struktur als auch für den Zn²⁺-Komplex ist in Tabelle 4 dargestellt.

	αI-Tryptase	αI-Tryptase, Zn²⁺-Komplex
Zellkonstanten	a = 91.44Å, b = 110.69Å, c = 130.09Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 89.53Å, b = 101.04Å, c = 137.14Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Auflösung ^a	23.94-2.20 Å (2.19-2.33 Å)	32.79-3.30 Å (3.30 Å -3.48 Å)
Daten- Vollständigkeit ^a	94.7 % (71.9 %)	94.5% (70.3 %)
I/ σ ^a	7.7 (0.8)	8.2 (1.5)
R _{symm} ^{a,b}	6.4 % (34.9 %)	12.6 % (26.4 %)
Anzahl der für die Verfeinerung verwendeten Reflexe (F > 2 σ) R _{work} /R _{free} ^c	64252/3244	18261/887
R _{work} /R _{free} ^c (F > 2 σ)	21.0%/26.0%	22.0%/27.9%
Standardabweichung („R.m.s.d.“) von idealen Bindungslängen	0.010 Å	0.008 Å
Standardabweichung („R.m.s.d.“) von idealen Bindungswinkeln	1.7°	1.5°

^aWerte für die höchste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben

^bR_{symm} = $(\sum_{hkl} |I(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} I(hkl))$, wobei $\langle I(hkl) \rangle$ den Mittelwert äquivalenter Reflexe einer Intensität I(hkl) darstellt.

^c5% aller Daten, von der Verfeinerung ausgenommen

Tab. 4: Statistik der Datenauswertung der α I-Tryptase-Kristalle

Die Statistik der Datenauswertung der α I-Tryptase-Datensätze ist kurz tabellarisch zusammengefaßt

Sowohl in der nativen α I-Tryptase-Struktur als auch in ihrem Zn²⁺-Komplex sind die vier Proteinketten der Tetramer-bildenden Monomere in der Elektronendichtekarte durchgehend eindeutig definiert - beginnend von Rest 16 bis zum Rest 242. Die Position des darauffolgenden Prolins 243 ist nur teilweise erkennbar. Hier ist die Proteinkette nicht mehr

in tertiäre Strukturelemente involviert und daher teilweise ungeordnet. Im Rahmen des Aktivierungsvorganges von der pro-Form zur reifen Proteinase sind die Aminosäuren bis einschließlich des Restes 15 abgespalten worden und fehlen daher in der Struktur des aktiven Tetramers.

In jedem Monomer sind die Proline 60a und 152b klar als *cis*-Prolin erkennbar. Alle anderen Proline liegen in der *trans*-Konformation vor.

Die native α I-Tryptase-Struktur wurde bei einer Auflösung bis zu 2.2 Å gelöst und bis zu einem kristallographischen *R*-Faktor von 21 % verfeinert. Der freie *R*-Faktor (Brünger, 1992) beträgt hierbei 26 %, was eine Überverfeinerung der Struktur und damit eine fehlerhafte Interpretation der Elektronendichte als sehr unwahrscheinlich erscheinen läßt. Ebenso liegen die Standardabweichungen von den idealen Bindungslängen und Bindungswinkeln nach R. Engh und R. Huber (Engh and Huber, 1991) mit 0.010 Å und 1.7 ° im nahezu idealen Bereich.

Der Datensatz für den Zn^{2+} -Komplex der α I-Tryptase war lediglich bis zu 3.3 aufgelöst. Nach Konvergenz der Strukturverfeinerung lag der *R*-Faktor bei 22.0 % ($R_{free} = 27.9$ %), und die Standardabweichungen von Bindungslängen und -winkeln betragen 0.008 und 1.5°.

In den Kristallstrukturen der α I-Tryptase-Kristalle und des Zn^{2+} -Komplexes befinden sich hierbei 82.6 % der nicht-Glycin-Reste in der am meisten favorisierten Konformation, 16.5 % haben zusätzlich erlaubte und 0.9% der Aminosäuren besitzen eine großzügig erlaubte Konformation. In der nicht erlaubten Region des Ramachandran-Graphen (Ramachandran and Sasisekharan, 1968) befindet sich keine einzige Aminosäure.

Die Atomkoordinaten der Struktur der humanen α I-Tryptase wurden bei der Protein-Datenbank der RCSB (“Research Collaboratory for Structural Bioinformatics”) hinterlegt.

4.3.5 Kristallaufbau und Einheitszelle

Während die Richtigkeit des flachen, rechteckigen Tetramers als native β -Tryptase-Tetramer-Struktur im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt wurde, so bedeutet dies nicht automatisch, daß der α -Tryptase-Tetramer ebenfalls so aufgebaut ist. Dessen erhöhte

Stabilität in Verbindung mit der beobachteten Heparinunabhängigkeit, sowie die proteolytische Inaktivität könnten unter anderem in einem unterschiedlichen tetramerschen Aufbau begründet liegen.

Abbildung 44 zeigt eine Sektion des α I-Tryptase Kristalls, betrachtet entlang seiner a -Achse.

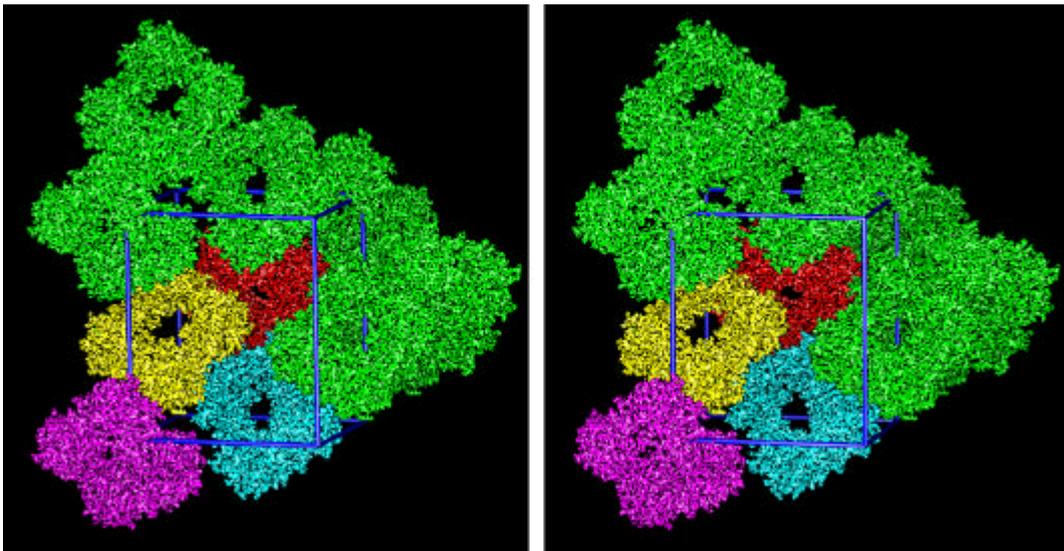


Abb. 44: Blick auf die Einheitszelle der α I-Tryptase-Kristalle

Die Einheitszelle der α I-Tryptase-Kristalle ist in einer Stereo-Darstellung entlang ihrer a -Achse gezeigt. Die farblich hervorgehobenen Tetramere stellen jeweils eine asymmetrische Einheit dar, die gemeinsam über eine 2_212_1 -Symmetrie miteinander verbunden sind. Die grünen Tetramere vermitteln einen Eindruck von der Dichte der Kristallpackung. Die Abbildung wurde mit MAIN (Turk, 1992) erstellt.

Die sechzehn Monomere in der Einheitszelle sind zu Tetrameren zusammengelagert, von denen in guter Übereinstimmung mit der bereits beschriebenen Kristallanalyse nach Matthews jeweils ein Tetramer die asymmetrische Einheit bildet.

Diese Tetramere sind jedoch, anders als bei der von P.J.B. Pereira *et al.* gelösten Kristallstruktur der β II-Tryptase (Pereira *et al.*, 1998), nicht parallel nebeneinander gelagert, wobei die Kristallkontakte aus Seite-an-Seite Wechselwirkungen zwischen benachbarten Tetrameren bestehen und die so entstehenden Ebenen durch Überlagerung das Kristallgitter bilden. Statt dessen sind die α I-Tryptase-Tetramere in ihrem Kristallverbund

gegeneinander rotiert und zueinander versetzt, so daß Wechselwirkungen eher aus Ecke-an-Seite Interaktionen bestehen. Hierbei erfüllen die Positionen der Tetramere die $2_12_12_1$ Symmetrie der Kristalle. So kann jeder der farblich hervorgehobenen Tetramere unter Ausnützung der durch die Raumgruppe $P2_12_12_1$ definierten Symmetrieoperationen auf die anderen farblich abgesetzten Tetramere abgebildet werden. Die grünen Tetramere repräsentieren eine Auswahl symmetrieverwandter Tetramere aus benachbarten Einheitszellen und geben so einen Eindruck von der insgesamt dichten Kristallpackung.

Die Identifikation der farblich hervorgehobenen Tetramere als biologisch relevante α -Trypsase Tetramere ist aufgrund der Kristallpackung zweifelsfrei möglich.

4.3.6 Proteinsequenzanalyse der α I-Tryptase, Vergleich zu anderen Tryptasen

Im Vergleich zu Chymotrypsin und Trypsin besitzen α -Tryptasen 15, beziehungsweise 22 zusätzliche Aminosäuren.

Wie bei den β -Tryptasen bereits beschrieben, sind diese hauptsächlich in die in Abbildung 45 farbig hervorgehobenen „loop“-Regionen inseriert, die bei der Formation der Tetramere mit dem jeweils benachbarten Tetramer wechselwirken.

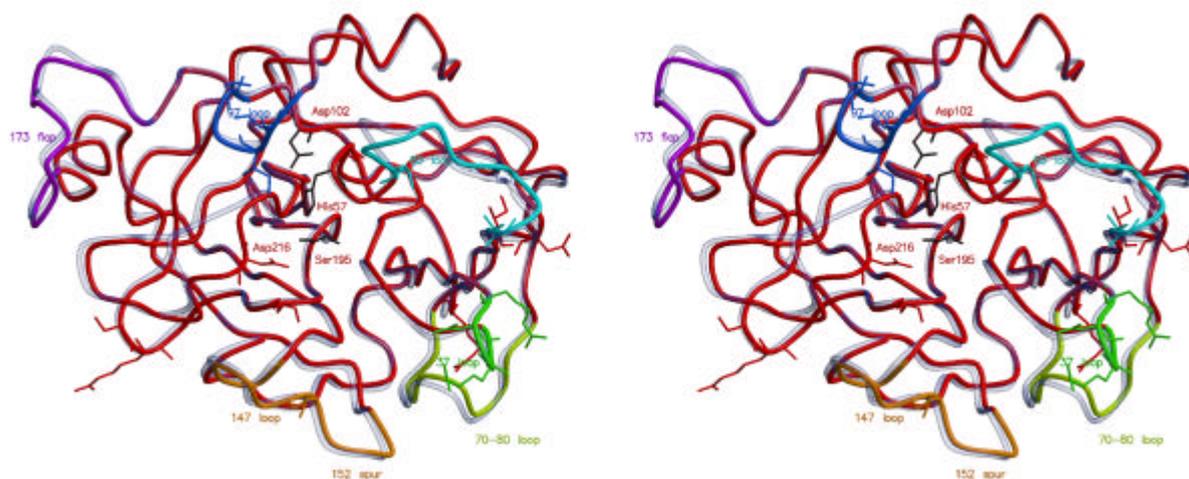


Abb. 45: Der α I-Tryptase-Monomer

In dieser Stereoabbildung ist die Überlagerung des β II-Tryptase-Monomers (transparent blau) mit dem α I-Tryptase-Monomer (rot) gezeigt. Die sechs für Tryptasen typischen „loops“ sind farblich hervorgehoben. Sämtliche sich von β -Tryptasen unterscheidenden Reste sind als Stick-Modell gezeigt. In schwarz ist die katalytische Triade abgebildet. Die Darstellung wurde mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997) erstellt.

Die in Serinproteinasen typischerweise konservierten Regionen sind bis auf die „loop“-Regionen im wesentlichen auch in α -Tryptasen konserviert, mit einer einzigen entscheidenden Ausnahme: Das Gly216, das ein Bestandteil des den Eingang zur Spezifitätstasche darstellenden 214-220 „loop“ ist, wird in α -Tryptasen durch Asp216 ersetzt.

4.3.7 Struktur der α I-Tryptase-Tetramere

Die bereits gegebene Beschreibung der tetramerschen Form nativer und aktiver β -Tryptasen ist im wesentlichen übertragbar auf die Struktur der α I-Tryptase:

Vier α I-Tryptase-Monomere (willkürlich bezeichnet als Monomere A, B, C und D in Übereinstimmung zu den β -Tryptase-Strukturen) besetzen die Eckpunkte eines flachen, rechteckigen Rahmens. Dieses Tetramer zeigt eine pseudo- 222 Symmetrie, die aufgrund der asymmetrischen kristallographischen Umgebung sowie der Packung der Tyrosin 75-Reste, die der Symmetrie nicht folgen, nicht ganz perfekt ist. Die horizontale und die vertikale zweizählige Rotationsachse, die sich im Zentrum des Tetramers schneiden, bilden die Monomere A auf B und C auf D, sowie A auf D und B auf C ab. Die dritte zweizählige Symmetrieachse steht orthogonal auf den beiden anderen und schneidet sie in deren Schnittpunkt. Sie bildet die Monomere A auf C und B auf D ab.

Durch dieses Arrangement der Monomere entsteht im Inneren des Tetramers eine zentrale Pore, in die die aktiven Zentren der einzelnen Monomere hineinzeigen. Diese Pore hat eine ebenfalls rechteckige Form und ist um etwa 30° um die Achse des Tetramers verdreht. Sie zeigt an ihrem Eingang und Ausgang eine Öffnung von $40 \text{ \AA} \times 15 \text{ \AA}$ und weitet sich im Inneren des Komplexes bis auf $50 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA}$. Auch in der α -Tryptase ist diese zentrale Pore genau groß genug, um es einem Peptid mit dem Durchmesser einer α -Helix zu ermöglichen, mit den aktiven Zentren zu interagieren.

Daher kann auch in einer eventuell unterschiedlichen Porengröße die stark abweichende Aktivität der α -Tryptasen nicht begründet liegen.

Die Eingänge zu dieser zentralen Pore sind beide teilweise durch die sich durch einen hohen Gehalt an sauren Aminosäuren auszeichnenden 147-“loop” der einzelnen Monomere blockiert. Dies geschieht abwechselnd auf beiden Seiten des Tetramers, so daß jeweils nur zwei sich diagonal gegenüberliegende aktive Zentren direkt sichtbar sind, wie in Abbildung 46 gezeigt ist.

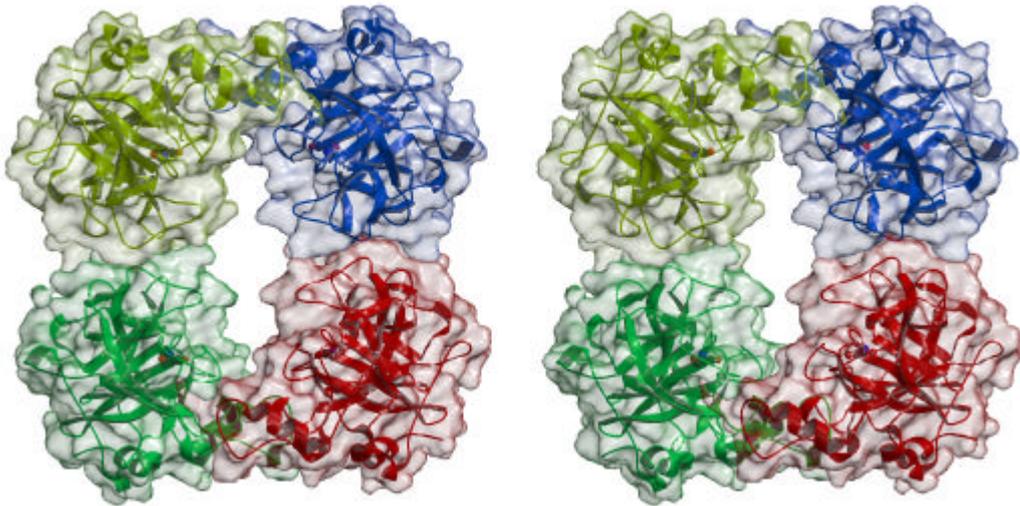


Abb. 46: Der α I-Tryptase-Tetramer

Gezeigt ist eine Stereodarstellung des α I-Tryptase-Tetramers. Serin 195 ist als Ball-and-Stick-Modell gezeichnet. Die Darstellung wurde mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997) erstellt.

Jeweils die Monomere A und D sowie B und C wechselwirken über eine elongierte Kontaktoberfläche von etwa 1050 \AA^2 , während die Monomere A und B sowie C und D über ein annähernd rundes Interface mit Ausmaßen von etwa 530 \AA^2 interagieren. Eine Analyse der bei der RCSB hinterlegten Proteinstrukturen ergab, daß für einen Komplex von zwei Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kDa eine Interaktionsoberfläche von 1000 \AA^2 im unteren Durchschnittsbereich liegt, während 530 \AA^2 die mit Abstand kleinste bisher bekannte Interaktionsfläche für einen solchen Proteinkomplex darstellt. Dies läßt die Bindung einer Heparinkette an die Oberflächen der benachbarten Monomere A und B sowie C und D als Voraussetzung für die Tetramer-Stabilität der β -Tryptasen plausibel erscheinen. Um so erstaunlicher ist es, daß das α -Tryptase-Tetramer der Bindung von Heparin für dessen Stabilität nicht bedarf.

Während der innere Kern des α I-Tryptase-Tetramers ein stark negatives elektrostatisches Potential besitzt, zeigt das Tetramer an seiner Außenseite - insbesondere an der A-B (und C-D) Peripherie - positive Ladung. Abbildung 47 zeigt die Aufsicht auf die A-B Seite des Tetramers. Die molekulare Oberfläche wurde entsprechend ihres elektrostatischen Potentials eingefärbt. Ein Modell einer Heparinkette, die an die positive Ladung der A-B Peripherie bindet, ist ebenfalls gezeigt.

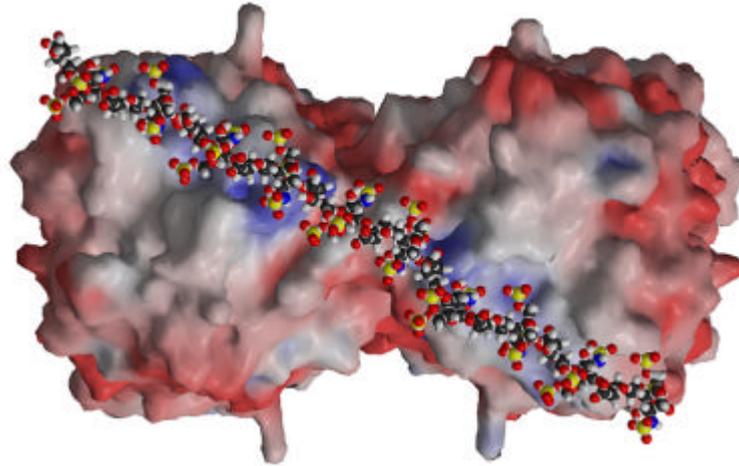


Abb. 47: Die Heparin-Bindungsstelle der α -Tryptasen

Gezeigt ist eine Aufsicht auf die Peripherie der A-B-Oberfläche, die in Anlehnung an ihr elektrostatisches Potential gefärbt ist. Über den blauen (positiv geladenen) Teil der Oberfläche erstreckt sich eine 20-gliedrige Heparinkette. Die Darstellung wurde mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997) BOBSCRIPT (Esnouf, 2000) und GRASP (Nicholls *et al.*, 1993) erstellt.

Dieses positive elektrostatische Potential wird hauptsächlich durch die an der Oberfläche befindlichen Aminosäuren Lys 243, Lys 244, His 119, Arg 117, Arg 24, Lys 26, Lys 202, Lys 159, Lys 171 und Arg 188 verursacht. Diese formen ein lineares Arrangement positiv geladener Seitenketten an der A-B (und C-D) Peripherie, die beide Monomere miteinander verbindet. So entsteht eine Fläche positiven elektrostatischen Potentials, die sich diagonal über die Oberflächen beider Monomere erstreckt und bis auf die Vorderseite reicht. Diese Fläche ist von idealer Größe und Ladung, um mit längeren Proteoglykanen zu interagieren. In Abbildung 47 ist das Bild eines Komplexes mit einer 20-gliedrigen Heparinkette gezeigt.

Obwohl für die Stabilität des α -Tryptase-Tetramers die Bindung von Heparin nicht erforderlich ist, so verfügen α -Tryptasen doch über eine Heparin-Bindungsstelle. Diese unterscheidet sich von den Heparin-Bindungsstellen in β -Tryptasen durch die Arg 187 (β) \rightarrow Gln (α), His 177 (β) \rightarrow Arg (α) und insbesondere Lys 113 (β) \rightarrow Asn (α) Aminosäurenaustausche. Daraus wird eine geringfügig schwächere Affinität für Heparin bei α -Tryptasen resultieren.

Das zuletzt erwähnte Asparagin 113 könnte zusätzlich über den Stickstoff mit einer Zuckerkette verbunden sein, was die Bindung von negativ geladenen Molekülen weiter verkomplizieren würde.

Zusammengefaßt und im Vergleich zu β -Trypsinen könnten diese Unterschiede in einer geringeren Stabilität des α -Trypsin-Heparin Komplexes resultieren. Allerdings reduzieren die beschriebenen Aminosäureaustausche gleichzeitig die innere endogene Instabilität, verursacht durch intermolekulare Ladungsabstoßung zwischen benachbarten Monomeren, was den Tetramer an sich stabilisiert. Ob die Bindung von Heparin - wenn auch nicht für die Tetramer-Stabilität - so doch für die Reifung der Proteinase und die Ausbildung des Tetramers vonnöten ist, kann allein auf struktureller Basis nicht geklärt werden.

Die gesamte Architektur des α -Trypsin-Tetramers unterscheidet sich dennoch leicht von dem β -Trypsin Tetramer. Betrachtet man lediglich die Schwerpunkte der Monomere, so haben sie im Hinblick auf das kleine Interface zwischen den Monomeren A und B sowie C und D des α I-Trypsin-Tetramers mit 43.4 Å einen um 0.9 Å geringeren Abstand als im β II-Trypsin Tetramer. Die über das große Interface interagierenden Monomere liegen mit 36.5 Å 0.4 Å weiter voneinander entfernt. Da die Wechselwirkungen zwischen den Monomeren A und B (und C und D) im Wesentlichen hydrophober Natur sind, kann eine Abstandsverringern um fast 1 Å erhebliche positive Auswirkungen für die Stabilität dieser Wechselwirkungen haben. Da aber beide Trypsin-Isoformen in unterschiedlichen Raumgruppen kristallisiert sind und diese durch Wechselwirkungen der im Kristall benachbarten Tetramere eine leichte Kompression oder Entspannung bewirken könnten, entsteht hierbei möglicherweise ein geringer Meßfehler, in dessen Rahmen möglicherweise die Differenz von 0.4 Å liegt, sicherlich aber nicht eine Differenz von 0.9 Å. Die Betrachtung der beiden unterschiedlichen Kristallpackungen gibt jedoch keinen Anlaß, einen größeren Einfluß der Raumgruppen auf die Tetramerarchitektur zu erwarten. Abbildung 48 zeigt eine Überlagerung des α I (rot)- und des β II (transparent blau) -Trypsin-Tetramers. Die A-Monomere sind hierbei exakt unter Berücksichtigung ihrer C ^{α} -Atome miteinander überlagert. Der Rest der Strukturen ist relativ zur Position der A-Monomere abgebildet.

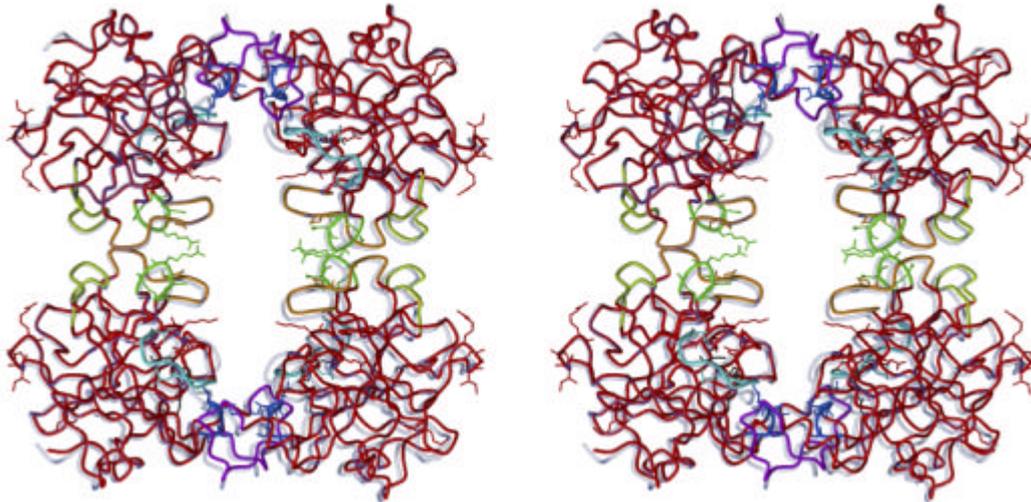


Abb. 48: Der α I-Tryptase-Tetramer

Dieses Stereobild ist die Überlagerung des β II-Tryptase-Tetramers (transparent blau) mit dem α I-Tryptase-Tetramer (rot). Exakt überlagert sind lediglich die Monomere oben links. Der Rest der Struktur ist relativ dazu abgebildet. Die sechs für Tryptasen typischen „loops“ sind farblich hervorgehoben. Sämtliche sich von β -Tryptasen unterscheidenden Reste sind als Stick-Modell gezeigt. Die Darstellung wurde mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997) erstellt.

4.3.8 Der α I-Tryptase-Monomer

Wie die β -Tryptase Untereinheiten, so zeigen auch die Monomere der α I-Tryptase einen Faltungstyp, der insgesamt dem des Trypsins ähnelt. Der Kern des Enzyms besteht im Wesentlichen aus zwei sechssträngigen β -„barrels“ die gemeinsam die das aktive Zentrum bildenden Reste His 57, Asp 102 und Ser 195 präsentieren. Die sogenannte „active site cleft“ verläuft an der Grenze, an der beide β -„barrels“ miteinander in Kontakt stehen.

Wie in den meisten anderen trypsinartigen Serinproteinasen, reicht das nach der Aktivierung frei gewordene Ile16–Val17-Segment in die sogenannte Isoleucin 16-Tasche hinein. Hierbei bildet sich über die freie α -Ammonium-Gruppe des Isoleucins eine klar definierte Salzbrücke zu Asparaginsäure 194. Die Seitenkettenkonformation dieses Aspartats ist seinerseits ausschlaggebend für die Formation einer funktionalen Substratbindungsstelle und eines einsatzbereiten aktiven Zentrums (Bode, 1979a).

Mit 245 Aminosäuren besteht reife α I-Tryptase aus exakt der gleichen Anzahl an Aminosäuren wie die β -Isoenzyme. Von diesen 245 Resten sind 243, beginnend von Ile 16 bis zum Lys 243, genau in der Elektronendichtekarte der vier voneinander kristallographisch

unabhängigen Monomere identifizierbar. Lediglich die Positionen beider C-terminaler Arginine sind aufgrund ihrer Delokalisierung nicht eindeutig festzulegen.

Mit Ausnahme des drastisch unterschiedlich angeordneten Substrat-Bindungs-Segments Trp215-Asp216-Glu217-Gly219, auf das im Folgenden noch genauer eingegangen werden soll, sind fast alle Aminosäuren räumlich ähnlich angeordnet, wie in den β -Isoformen der Tryptase. Dies wird sehr gut durch die kleine Standardabweichung von 0.34 Å der C^α-Atom-Positionen zwischen α I und β II-Tryptase ausgedrückt, wenn man von diesem Vergleich die Segmente 214-220, 60-60B, 173H und 79 ausschließt und lediglich die verbleibenden 233 C^α-Atome berücksichtigt.

Lediglich 18 der 245 α I-Tryptase Reste besitzen im Vergleich zur β II-Tryptase unterschiedliche Seitenketten. Zudem sind all diese Aminosäureaustausche zumeist sehr konservativer Natur, wie aus der Sequenzanalyse in Abbildung 29 ersichtlich ist. Die meisten dieser Austausche treten in den sechs in Abbildung 31 farblich abgesetzten Oberflächen-„loops“ um die Reste 37, 60, 75, 97, 147 und 173 auf, durch die die einzelnen Untereinheiten mit den benachbarten Monomeren wechselwirken und die so für die Tetramerbildung mit verantwortlich sind. Ihre entscheidende Abweichung sowohl in ihrer Länge als auch in ihrer Konformation von anderen Trypsin-ähnlichen Serinproteinasen wurde bereits für β -Tryptasen ausführlich beschrieben.

Sehr bemerkenswert ist der deutlich unterschiedliche Verlauf des Trp215-Gly219 Segmentes, welches in β -Tryptasen die initiale Substratbindungsstelle und den Eingangsrahmen zur S1-Spezifitätstasche darstellt, sowie die signifikante räumliche Versetzung der Gly 60–Asp60B Aminosäuresequenz, die in die Formation des A-D, sowie B-C Kontaktes involviert ist. Auffälligerweise sind die Hälfte aller sich zwischen den Tryptase-Isoformen unterscheidenden Reste in einem der sechs charakteristischen Oberflächen-„loops“ lokalisiert. Außerdem treten in den Monomeren die Bereiche, die die größten topologischen Unterschiede aufweisen, ebenfalls in oder nahe bei den jeweiligen Kontaktflächen auf. Auch wenn diese Unterschiede nicht direkt zu einer deutlich unterschiedlichen Tetramer-Architektur führen, so können sie doch erheblichen Einfluß auf dessen Stabilität haben.

Durch den Austausch des Lysins 113 durch einen Asparagin-Rest entsteht in der α I-Tryptase neben dem gemeinhin bekannten Asn204-Gly205-Thr206 N-Glykolysierungsort ein zusätzliche, für die N-Glykolysierung zugängliche Sequenz Asn113-Ile114-Ser115. Während

beide Asparagin-Seitenketten eindeutig in der Elektronendichtekarte der α I-Tryptase-Struktur definiert sind, so ist in beiden Fällen jedoch kaum zusammenhängende Elektronendichte erkennbar, die von N-gebundenen Zuckerketten herrühren könnte. Dies mag an einer gewissen Unordnung liegen, reflektiert aber höchstwahrscheinlich bloß die erfolgreiche Selektion niedrig glykolysierter Tryptase für die Kristallisation.

Wie bereits beschrieben, wird das Tetramer zusammengehalten durch Monomer-Monomer-Wechselwirkungen in einem großen (A-D und B-C) und einem kleinen (A-B und C-D) Interface.

Der größere A-D-Kontakt ähnelt grundsätzlich den für die β -Tryptasen beschriebenen Wechselwirkungen. Sie unterscheiden sich jedoch in wichtigen Details, die in Abbildung 49 dargestellt sind.

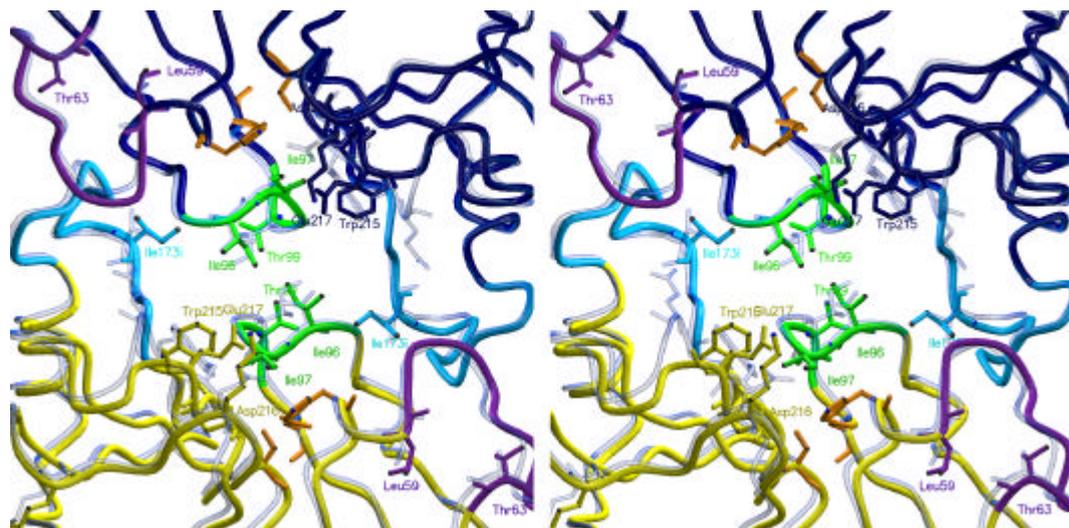


Abb. 49: Das A-D Interface der α I-Tryptase

Diese Stereodarstellung ist eine Überlagerung der β II-Tryptase (transparent blau) mit α I-Tryptase (blau und gelb). Der 60-„loop“ ist violett, der 97-„loop“ grün und der 173-„flap“ hellblau dargestellt. Sämtliche sich von β -Tryptasen unterscheidenden Reste sind als Stick-Modell gezeigt. Die katalytischen Triaden sind orange eingefärbt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997) erstellt.

Die homotropischen Interaktionen des zentralen 97-„loops“ mit dem entsprechenden Segment des benachbarten Monomers sind trotz der veränderten Aminosäurefolge von Thr96-

Ala97-Ile98 zu Ile96-Ile97-Thr98 in der α I-Tryptase erstaunlich ähnlich verglichen mit β -Tryptasen. Bemerkenswert ist weiterhin eine Verlagerung des von der Sequenz her konservierten Pro60A-Asp60B Abschnittes, resultierend in einer Schwächung der Salzbrücken/Wasserstoffbrücken-Interaktionen zwischen den Seitenketten Asp 60B und Arg 224 sowie zwischen den gegenüberstehenden Hauptkettenabschnitten Pro60A-Val60C und Gly173B-Tyr173D. Diese Bewegung scheint nicht durch die sich direkt an die in Kontakt stehenden Segmente anschließenden Val 59 (β) \rightarrow Leu (α) und Val 175 (β) \rightarrow Ile (α) Austausch begründet zu sein. Sie reflektieren eher die konformationelle Änderung des Indol-Teils des Tryptophans 215 und die Verschiebung der nahen Glutaminsäure 217-Seitenkette des benachbarten D-Monomers von ihrer in den β -Tryptasen bekannten Position. So wird die energetisch unvorteilhafte Wechselwirkung zwischen Glutaminsäure 217 und Asparaginsäure 60B gelockert und gleichzeitig eine leere, beziehungsweise wäßrig gefüllte Höhle in der Kontakt-Region gebildet.

An dem sich über eine geringere Oberfläche erstreckenden Kontakt zwischen den Monomeren A und B sind hauptsächlich die sich gegenüberliegenden 37-„loops“, 70-80-„loops“ und 152-„spurs“ beteiligt.

Aminosäuren, nämlich ...Pro150-Leu151-Pro152-Pro152A-*cis*Pro152B-Phe153-Pro154... . Dieses Segment könnte den Kontakt zwischen den beiden Monomeren in diesem Interface versteifen. Außerdem entfallen durch diesen Austausch die unvorteilhaften Ladung-Ladung-Interaktionen zwischen den gegenüberstehenden Arg 150-Seitenketten, die in der α I-Tryptase nicht vorhanden sind. So wird prinzipiell eine dichtere Aneinanderlagerung der gegenüberstehenden Monomere in diesem Interface ermöglicht, was wiederum die dominierenden hydrophoben Wechselwirkungen positiv beeinflusst.

4.3.9 Das „aktive“ Zentrum

In β -Tryptasen, wie in allen anderen funktionalen Chymotrypsin-artigen Serinproteinasen mit Trypsin-ähnlicher Spezifität, ist die „active-site cleft“ eingebettet in eine Anzahl von Oberflächen-„loops“. In ihrem Zentrum befindet sich die katalytische Triade bestehend aus Histidin 57, Asparaginsäure 102 und Serin 195. Serin 195 ist mit seinem O^γ -Atom über eine Wasserstoffbrücke mit dem N^ϵ -Atom der Imidazol-Gruppe des Histidins 57 verbunden. Histidin 57 bildet wiederum mit seinem $N^{\delta 1}$ -Atom eine Wasserstoffbrücke zu der nach innen gewandten Carboxylat-Gruppe des Aspartats 102.

Betrachtet man die Umgebung des aktiven Zentrums in der vorstehend definierten Standard-Orientierung, so öffnet sich westlich des Serins 195 die S1-Spezifitätstasche. Hierbei bezeichnet S1 die Tasche, die für die Aufnahme des P1-Restes des designierten peptidischen Substrates prädestiniert ist. Die zur zu spaltenden Peptidbindung C-terminal ständigen Aminosäuren werden in dieser Notation mit P1', P2' etc. und die hierzu N-terminal ständigen Aminosäuren mit P1, P2, etc. benannt.

Diese sehr voluminöse S1-Spezifitätstasche wird im Nord-Westen durch das Ser214-Cys220-Segment begrenzt, welches bei Rest 217 (ein Glutamat in Tryptasen; typischerweise fehlt in Trypsin-artigen Serinproteinasen Rest 218, was eine direktere Glu217-Cys220-Verbindung zur Folge hat) nach Süden abknickt. Der Boden und der süd-östliche Eingangsrahmen wird beschrieben durch die Aminosäuren 190-195, das Segment 225-228 begrenzen den Hohlraum an seiner Rückseite, und die Disulfidbrücke Cys191-Cys220 schließt den Eingangsbereich der S1-Tasche im Süden ab. Diese Architektur hat zur Folge, daß die Seitenkette des Aspartats 189 von Süden her in die Spezifitätstasche hineinragt und so mit seiner Carboxylat-Gruppe einen idealen Bindungspartner für die alkalischen Seitenketten von Lysin oder Arginin als P1-Rest darstellt.

Um eine produktive Substratbindung zu gewährleisten, müssen sich entsprechende Peptide auf eine antiparallele Weise an das ausgestreckte Ser214-Gly219-Segment anlagern. Hierbei werden zwei Wasserstoffbrücken jeweils zwischen P3 N und O und Gly 216 O und N, sowie eine Wasserstoffbrücke zwischen P1 N und Ser 214 O gebildet.

In Abbildung 51 wurde das Tetrapeptid C-Ala-Lys-Leu-Lys-N in die Substratbindungstaschen S1-S4 der überlagerten β III-Tryptase-Struktur hineinmodelliert.

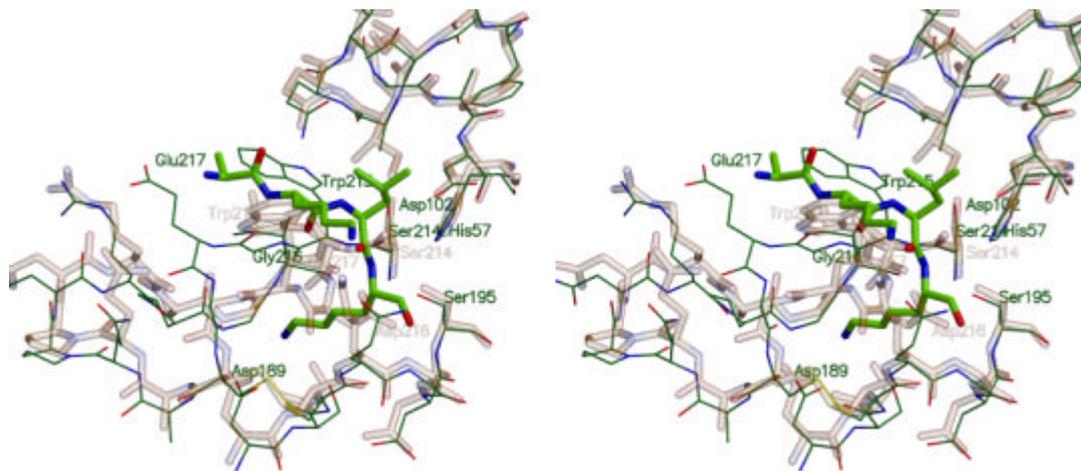


Abb. 51: Substratbindung in β -Tryptasen

In dieser Stereoabbildung ist dunkelgrün die Umgebung der S1-Spezifitätstasche der β III-Tryptase dargestellt, die das mittelgrüne Substrat C-Ala-Lys-Leu-Lys-N enthält. Transparent-orange ist im Vergleich dazu die Struktur der α I-Tryptase relativ zu den C $^{\alpha}$ -Atompositionen überlagert. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997) erstellt.

Das Substrat wurde hierbei nach den anscheinenden Spezifitätsanforderungen der β -Tryptase ausgewählt, und der Modus der Substratbindung folgt dem der LDIT-Bindung durch Rinder-Trypsin (Stubbs *et al.*, 1997). Demzufolge wird die Lysin-P1-Seitenkette in der S1-Spezifitätstasche der β -Tryptase aufgenommen, und die Prolin-P2-Seitenkette erstreckt sich in den hydrophoben S2-Hohlraum, der von der flachen Seite der Histidin 57-Imidazol-Gruppe und dem Alanin 97 gebildet wird. Die basische P3-Seitenkette ragt in einen negativ geladenen Raum, der zwischen den einzelnen Domänen liegt, während das Alanin in P4-Position von einer durch die Seitenketten von Tryptophan 215 und Glutamin 98 des eigenen und von

Tyrosin 95 des benachbarten Monomers gebildeten Furche Aufnahme findet. Durch diese „nonprimed“ (P1-S1, P2-S2,...) und andere “primed” (P1'-S1', P2'-S2',...) Wechselwirkungen wird die zu spaltende Peptidbindung optimal für den nukleophilen Angriff des Serins 195 ausgerichtet.

Ein gänzlich anderes und bisher in der Natur unbekanntes Bild ergibt sich in der Struktur der α I-Trypsase. Hier sind die „nonprimed“ Bindungsstellen in einer Art und Weise strukturiert, die eine Substratbindung und dessen Spaltung nicht ermöglichen. Dies liegt hauptsächlich in einer drastischen Konformationsänderung des Ser 214-Cys 220-Segmentes begründet, die bisher noch nicht in anderen Chymotrypsin-artigen Serinproteinasen beobachtet wurde. Während die Position des Serins 214 inklusive seiner Carbonyl-Gruppe immer noch den anderen Serinproteinasen gleicht, so verläßt das folgende Trp215-Gly219-Segment abrupt den normalerweise bekannten Verlauf - beginnend mit dem C ^{α} -Atom des Tryptophans. Es verläuft nun in zickzack-artiger Weise durch die molekulare Oberfläche und blockiert hierbei vollständig sämtliche „nonprimed“ Bindungsstellen.

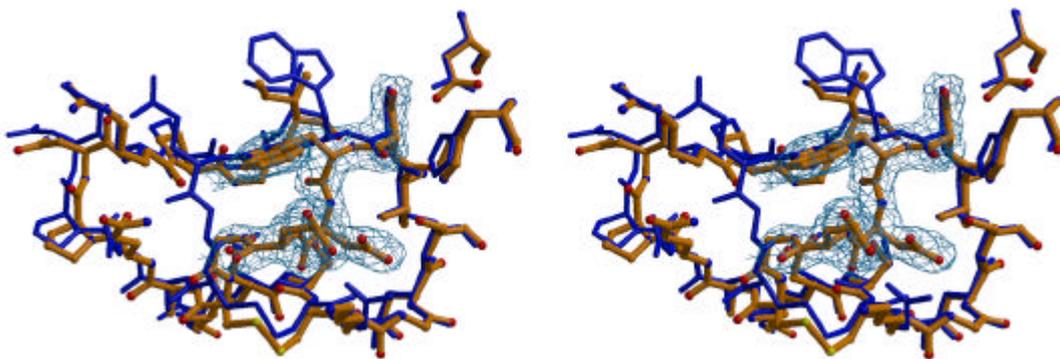


Abb. 52: Definition des 214-220-„loops“ in der Elektronendichtekarte

Blau dargestellt ist die Umgebung der S1-Spezifitätstasche der β III-Trypsase als Stereobild. In orange ist zum Vergleich dazu die Struktur der α I-Trypsase relativ zu den C ^{α} -Atompositionen überlagert. Die $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte für das 214-220-Segment ist ebenfalls gezeigt. Die Abbildung wurde mit BOBSCRIPT/Raster3D (Esnouf, 2000) (Merritt and Bacon, 1997) erstellt

Die in Abbildung 52 dargestellte und bei 1σ konturierte $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte illustriert, daß dieses umgelagerte Segment mit all seinen Seitenketten ausgezeichnet in der Elektronendichte definiert ist. Ferner befinden sich die B-Faktoren dieser Atome ebenfalls im Bereich des Durchschnitts der Gesamtstruktur. Beides läßt darauf schließen, daß es sich bei diesem umgefalteten aktiven Zentrum um eine sehr stabile

Konformation handelt. Der Indol-Ring des Tryptophans 215 und die Seitenkette des Glutamats 217 erstrecken sich in den Raum, der in β -Tryptasen durch den P3- oder P4-Rest des gebundenen Substrates eingenommen würde. Eine Salzbrücke kann zwischen den Seitenketten der Aminosäuren Glutamin 217 und Lysin 192 aufgrund ihrer räumlichen Nähe gebildet werden. Diese Salzbrücke kann jedoch nicht permanent vorliegen, da die Position der terminalen Aminogruppe des Lysins in der Elektronendichtekarte nicht eindeutig erkennbar war.

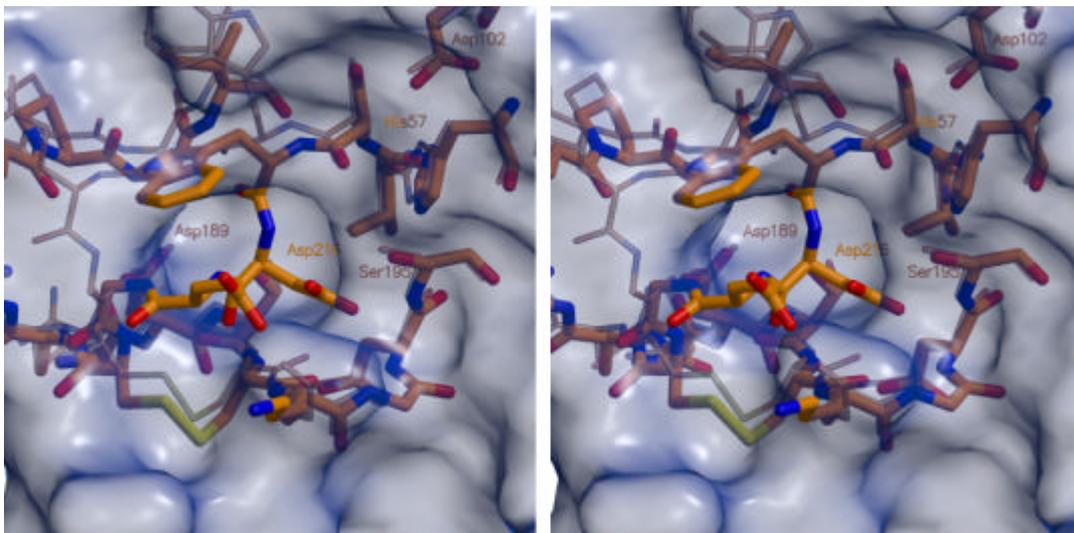


Abb. 53: Das 214-220-Segment blockiert die S1-Spezifitätstasche

Orange ist die Umgebung der S1-Spezifitätstasche der α I-Tryptase als Stab-Modell als Stereobild dargestellt. Relativ zu den C $^{\alpha}$ -Atompositionen ist als dünnes Stab-Modell die Struktur der β III-Tryptase überlagert. Die Oberfläche der β III-Tryptase ist transparent blau gezeigt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997) erstellt

Die Asparaginsäure 216 blockiert, wie in Abbildung 53 gezeigt, sowohl mit seinen Haupt- als auch mit seinen Seitenkettenatomen den Eingang zur S1-Spezifitätstasche. Die freie Carboxylat-Gruppe des Aspartats erstreckt sich dabei in das „oxyanion hole“ und bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit den Amid-Wasserstoffen des Glycins 193 und des Serins 195 in *trans*-Richtung und mit dem O $^{\gamma}$ -Atom des Serins 195 in *cis*-Richtung. Hierdurch wird mit dem Serin 195 ein Mitglied der katalytischen Triade gebunden. Die räumliche Konformation des typischen Ser195-His57-Asp102-Arrangements wird durch diese

zusätzlichen Wasserstoffbrücken jedoch nicht wesentlich beeinflusst. Etwa mit dem C^α-Atom des Glycins 219 erreicht die Hauptkette der α I-Tryptase wieder den bekannten Verlauf der β -Tryptasen. Verglichen mit diesen ist jedoch die Gly219-Cys220 Peptidbindung invertiert, so daß die Carbonyl-Gruppe nun von der blockierten S1-Tasche weg zeigt. Dies hat zur Folge, daß α -Tryptase die Fähigkeit verliert, Ammonium- oder Guanidyl-Gruppen des P1-Restes eines gebundenen Substrates zu koordinieren. Diese Segmentumlagerung wirkt sich bis zum Cystein 220 aus, dessen in die Disulfidbindung zum Cystein 191 eingebundene Seitenkette im Vergleich zur β -Tryptase deutlich verschoben ist. Abschließend sei bemerkt, daß sich die beschriebenen strukturellen Unterschiede im 214-220 Segment im Wesentlichen auf den Eingangsbereich zur S1-Tasche auswirken. Asparaginsäure 189 und die sich anschließende Hauptkette bis zum Serin 195, die den Boden der S1-Tasche darstellt, sowie der Gly 226-Tyr 228 Abschnitt, der in funktionalen Proteinasen die innere Wand der S1-Tasche repräsentiert, sind im Wesentlichen ähnlich angeordnet wie in β -Tryptasen.

Die Konsequenz aus der beschriebenen Umlagerung ist, daß potentielle peptidische Substrate sterisch sowohl an der Annäherung an die Substratbindungsregion als auch an der korrekten Bindung als Voraussetzung für die Hydrolyse der Peptidbindung gehindert werden. Eine Spaltung einer Peptidbindung erscheint nur möglich, wenn eine komplette Rückfaltung des Ser 214-Cys 220 Segmentes zur der in Serinproteinasen normalerweise bekannten Konformation der Substratbindung voraus- oder mit dieser einhergeht.

Die Möglichkeit eines solchen konformationell bedingten Umschaltens zwischen einer aktiven und einer deaktivierten Form der α -Tryptase, eventuell induziert durch die Annäherung eines idealen Substrates, soll im Folgenden genauer untersucht werden.

4.3.10 α -Tryptase, eine aktive Proteinase?

Um die Möglichkeit einer Substrat- oder autoinduzierten Aktivierbarkeit der α I-Tryptase zu einer funktionalen Serinproteinase zu untersuchen, oder mit anderen Worten, um zu ergründen, ob eine Rückfaltung des Ser 214-Cys 220-Segmentes tatsächlich stattfinden kann, ist die α I-Tryptase-Präparation zunächst mit Fluoreszenz-markiertem Casein (FITC-Casein) inkubiert worden. Dieses Protein-Substrat liegt in teilweise denaturierter Form vor und verfügt somit über ideale Voraussetzungen, in die zentrale Pore des α I-Tryptase-Tetramers einzudringen und bis zu den aktiven Zentren vorzustößen. Diese Inkubation erfolgte in einem

Trypsase-Puffer bei Raumtemperatur über Nacht und ließ so auch einem möglicherweise langsamen Enzym genügend Zeit, hydrolytische Aktivität zu zeigen. Eine Kontrollreaktion wurde ohne α I-Trypsase unter ansonsten identischen Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurden beiden Proben mittels „reversed phase“-Chromatographie analytisch auf einer „high pressure/performance liquid chromatography“ (HPLC)-Anlage aufgetrennt. Die resultierenden Elutionsprofile sind in Abbildung 54 dargestellt.

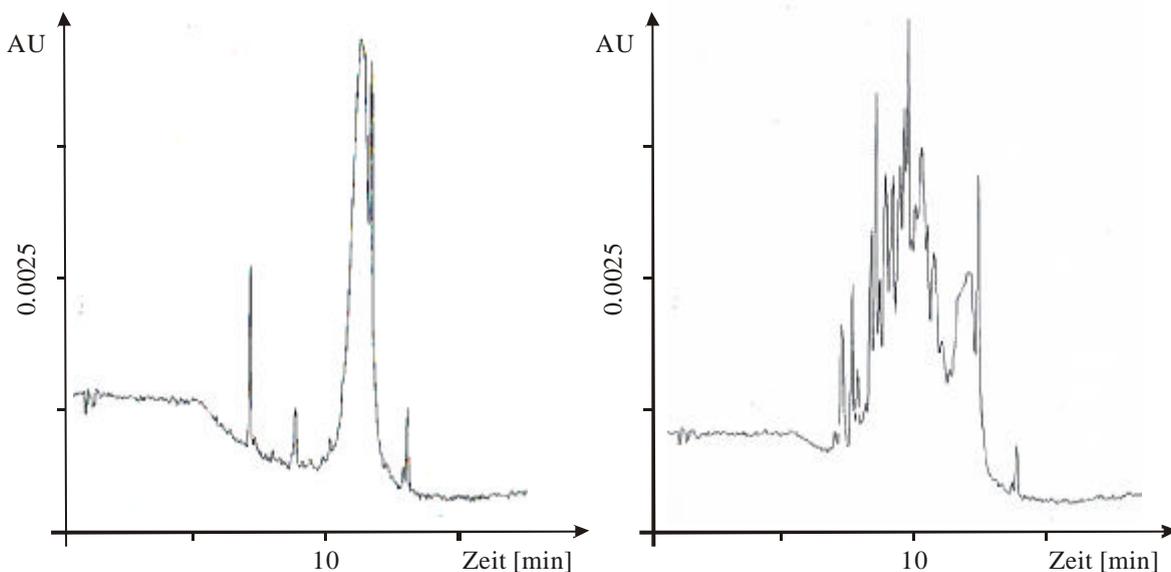


Abb. 54: HPLC-Elutionsprofile

Im linken Teilbild ist das HPLC-Profil der Kontrollreaktion ohne α I-Trypsase gezeigt. Das rechte Teilbild zeigt das Elutionsprofil nach erfolgter proteolytischer Reaktion.

Eine eindeutige Degradation des Caseins ist nur in der α I-Trypsase enthaltenen Probe festzustellen, während in der Kontrollreaktion keinerlei hydrolytische Aktivität zu verzeichnen ist. Weiterhin bemerkenswert ist die Tatsache, daß die Casein-Fractionen in relativ wenigen, klar definierten „peaks“ von der chromatographischen Säule eluieren. Dies erlaubt zu spekulieren, daß die Hydrolyse der Peptidbindungen anscheinend auf eine geringe Anzahl von Schnittstellen in der Casein-Proteinsequenz begrenzt ist. Dies würde eine hohe Spezifität der α I-Trypsase in Bezug auf dessen Zielsequenz andeuten.

Die Präparation der α I-Trypsase, die für diese Experimente verwendet wurde, war hochgradig rein, wie aus „sodium dodecyl sulphate“ (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)-Analysen und der Bereitschaft der Protein-Präparation zu kristallisieren, hervorging.

Um trotzdem jede mögliche, wenn auch selbst auf überladenen SDS-Gelen nicht sichtbare Kontamination, die die beobachtete Spaltung des Caseins hervorgerufen haben könnte, auszuschließen, wurde die Methode der Zymographie angewendet. Diese spezielle Verfahrensweise wird hauptsächlich auf dem Gebiet der Metallo-Matrixproteinase-Forschung (Kleiner and Stetler Stevenson, 1994) angewandt, und dient dazu, auch sehr schwache proteolytische Aktivität zu detektieren.

Hierbei wurde eine SDS-behandelte Probe der α I-Tryptase auf einem Casein enthaltenden vorgefärbten SDS-Gradienten-Gel elektrophoretisch von etwaigen Unreinheiten getrennt. Nach der Durchführung der Elektrophorese wurde das SDS langsam aus dem Gel herausgewaschen. Hierdurch wird die Renaturierung der im Gel befindlichen Proteine und damit der α I-Tryptase ermöglicht. Das im Gel enthaltene Commassie-blau gefärbte Casein kann nun durch aktive Proteinase degradiert werden. Die entstandenen Caseinfragmente wurden in einem letzten Schritt aus dem Gel herausgewaschen und hinterließen einen klaren Punkt im Gel am Ort ihrer Entstehung, der im Gegenzug Proteinase-Aktivität signalisiert.

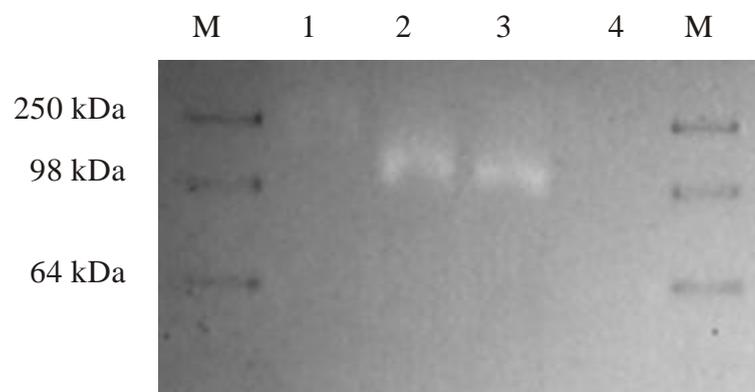


Abb. 55: Zymogramm

Gezeigt ist das entwickelte Zymogramm-Gel. Jeweils die Spuren 1 und 4 sowie 2 und 3 enthalten identische Proben. In den Spuren 1 und 4 wurden die Proben in SDS gekocht und in den Spuren 2 und 3 nicht hitzedenaturierte Proben verwendet.

Abbildung 55 zeigt das so entwickelte Zymogramm-Gel, daß eine eindeutige, klare Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa aufzeigt. Da die α I-Tryptase im Gegensatz zum Molekulargewichtsmarker nicht hitzedenaturiert und zudem vor der Elektrophorese mit weniger SDS behandelt wurde, aber auch aufgrund der ungewöhnlichen

Form des α I-Tryptase-Tetramers ist es nachvollziehbar, weshalb das Tetramer sich nicht exakt wie ein 120 kDa schweres Protein auf dem SDS-Gel verhält. Bemerkenswerterweise scheint das α I-Tryptase-Tetramer sogar im gewissen Ausmaß gegen eine Behandlung mit SDS stabil zu sein. Parallel zu dem Zymogramm Gel wurde α I-Tryptase in ansonsten gleicher Weise auf einem caseinfreien, ungefärbten Gel elektrophoretisch analysiert. Von diesem Gel wurde ein Western-Transfer angefertigt. Die klare Bande auf dem Zymogramm-Gel konnte nun eindeutig einer Bande auf dem Western-Transfer zugeordnet werden, die im Anschluß nach der Methode des Edman-Abbaus (Edman and Begg, 1967) N-terminal sequenziert wurde. Als einzige Sequenz ergab sich die Aminosäurenabfolge N-Ile-Val-Gly-Gly-Gln-Glu-Ala-...-C, die mit α I-Tryptase, allerdings auch mit β -Tryptasen, zu 100 % identisch ist. Wenn man allerdings β -Tryptasen in gleicher Weise behandelt, wie vorstehend für α -Tryptase beschrieben, so migriert diese als Monomer mit einem Molekulargewicht von etwa 27 kDa auf einem SDS-Gel und zeigt weiterhin - aufgrund der Instabilität der Tetramere - keinerlei caseinolytische Aktivität (Ren *et al.*, 1998).

Deshalb belegen diese Experimente, daß die beobachtete proteolytische Aktivität sowohl in den HPLC- als auch in den Zymographie-Experimenten der tetramerischen α I-Tryptase zuzuschreiben ist. α I-Tryptase kann also durchaus bei Gegenwart eines geeigneten Substrates als aktive Proteinase fungieren.

Welche Proteinsequenz aber zeichnet so ein geeignetes Substrat aus? Um die Substratspezifität der α -Tryptase eingehender zu untersuchen, wurden seine proteolytischen Eigenschaften gegenüber gut charakterisierten Proteinen getestet. Am vielversprechendsten waren hierbei die Ergebnisse mit Rinder Serum Albumin (BSA). Dieses Protein wurde nach einer Inkubation mit α I-Tryptase über Nacht an einer einzigen Peptidbindung gespalten. Hierbei entstanden ein längeres und ein sehr kurzes Fragment. Beide Fragmente wurden nach der Edman-Methode ansequenziert. Diese Analyse ergab mit N-Met-Lys-Trp...-C den N-terminus von BSA und mit N-Ala-Phe-Asp-Glu-Lys-Leu-Phe-Thr-Phe-His...-C den N-terminalen Teil eines C-terminalen BSA-Peptids beginnend an Position 524 (Abbildung 56). In der Proteinsequenz des BSA-Moleküls gehen dem C-terminalen Peptid die Aminosäuren N-Tyr^{P4}-Val^{P3}-Pro^{P2}-Lys^{P1}523-C voraus. Da jedoch bei der Sequenzierung nach Edman oft die erste Aminosäure nicht eindeutig zu bestimmen ist, wurde die genaue Lage der Schnittstelle bestätigt.

```

MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFK 44
GLVLIAFSQYLQOCQPFDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVA 102
SLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSHKDDSPDLPKLKPDPNTLCDEFKADEKFFWGK 160
YLYEIARRHPYFYAPELLYYANKYNGVFQEQCAEDKGACLLPKIETMREKVLTS SAR 218
QRLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLEC 276
ADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAE 334
DKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCA KDDPHAC 392
YSTVFDKCLKHLVDEPQNLIKQNCDFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVS 450
RSLGKVGTRCCTKPESERMPC TEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVT KCCTESLVNRR 508
PCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLKHKPKATEEQ 566
LKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA 607

```

Abb. 56: Identifikation der Schnittstelle im BSA

Das ansequenzierte Fragment, resultierend aus der Behandlung von BSA mit α -Tryptase wurde mit der BSA-Sequenz verglichen. Blau eingefärbte Aminosäuren sind in der BSA-Struktur in tertiäre Strukturelemente involviert. Rot hervorgehoben sind sämtliche Pro-Lys-Sequenzabschnitte. Gelb unterlegt sind die bei der Sequenzierung gefundenen Aminosäuren.

Hierzu wurden die α -Tryptase-behandelte BSA-Probe und die dazugehörige Kontrollreaktion ohne Tryptase mit Hilfe der „matrix assisted laser desorption/ionization mixture reflector time-of-flight mass spectrometry“ (MALDI-TOF-MS) mit hoher Massengenauigkeit (Jensen *et al.*, 1997) analysiert. Das aufgenommene Spektrum der positiven Probe ist in Abbildung 57 wiedergegeben.

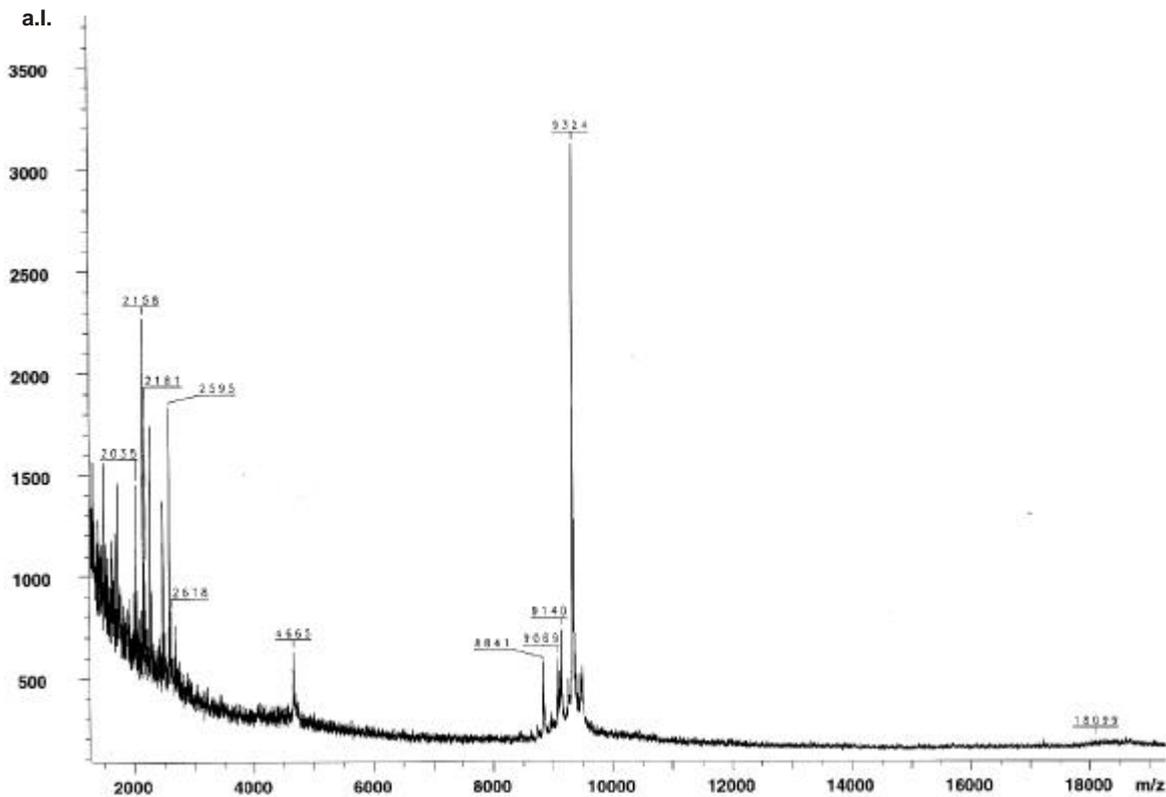


Abb. 57: Massenspektrum nach der α I-Tryptase Behandlung von BSA

Dargestellt ist ein Massenspektrum, aufgenommen nach proteolytischer Behandlung von BSA mit α I-Tryptase.

In guter Übereinstimmung mit den beschriebenen Elektrophorese-Studien wurde auch hier ein einzelnes Fragment mit einem Masse/Ladungs-Verhältnis von 9324 (\pm 5) Da/z identifiziert, das von der Masse exakt dem C-terminalen BSA-Peptid gleicht. Ein zweiter „peak“ bei einem Masse/Ladungs-Verhältnis von 4665 (\pm 5) Da/z rührt wahrscheinlich von dem selben Fragment her, das hier allerdings doppelt positiv geladen ist.

Im Ergebnis identifizieren beide vorgestellten Methoden die N-...-Val^{P3}-Pro^{P2}-Lys^{P1}523-Ala^{P1'}524-Phe^{P2'}-Asp^{P3'}-...-C-Sequenz als die einzige Schnittstelle der α I-Tryptase im BSA. Dieses Resultat betont die Wichtigkeit der Existenz eines Lysins an Position P1 und eines Prolins an Position P2 für die Aktivität der α -Tryptase. Die 3D-Struktur des humanen Serum Albumins (HSA) (Sugio *et al.*, 1999) zeigt, daß die ermittelte Schnittstelle Teil eines exponierten Oberflächen-„loops“ ist, der sich im Vergleich zum Rest der Struktur durch sehr hohe B-Faktoren auszeichnet. Dies suggeriert eine sehr hohe Flexibilität dieses loops, was diesen in die Lage versetzt, zu den aktiven Zentren der α I-Tryptase vorzudringen. Keiner der anderen fünf vorhandenen N-...-Xaa-Pro-Lys-Xaa-...-C-Sequenzorte wird von α I-Tryptasen

hydrolysiert, was deren zu geringe räumliche Adaptionfähigkeit reflektiert. Weiterhin erscheint bemerkenswert, daß keinerlei Hydrolyse der Peptidbindung nach dem lediglich vier Reste entfernten, im selben „loop“ befindlichen, Lys 528 erfolgt. Anstelle eines Prolins in P2-Position befindet sich hier ein Aspartat. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse (Harris et al., 2001) legen nahe, daß β -Tryptasen in ihrer Selektivität nicht zwischen ungeladenen P3-Resten unterscheiden. Deshalb wurden für die nun folgende kinetische Charakterisierung die kommerziell erhältlichen Substrate tosyl-GlyProLys-pNA und sein Arginin (P1) Homolog als Modellssubstrate eingesetzt.

4.3.11 Kinetische Untersuchungen an der α I-Tryptase

α I-Tryptase wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der chromogenen Substrate Gly-Pro-Lys-pNA und Gly-Pro-Arg-pNA inkubiert und dabei der Fortschritt der proteolytischen Reaktion über einen Zeitraum von 900 Minuten quantitativ aufgezeichnet. Exemplarisch sind hier die Ergebnisse für die Reaktion mit Gly-Pro-Lys-pNA in den Abbildungen 56 und 57 dargestellt.

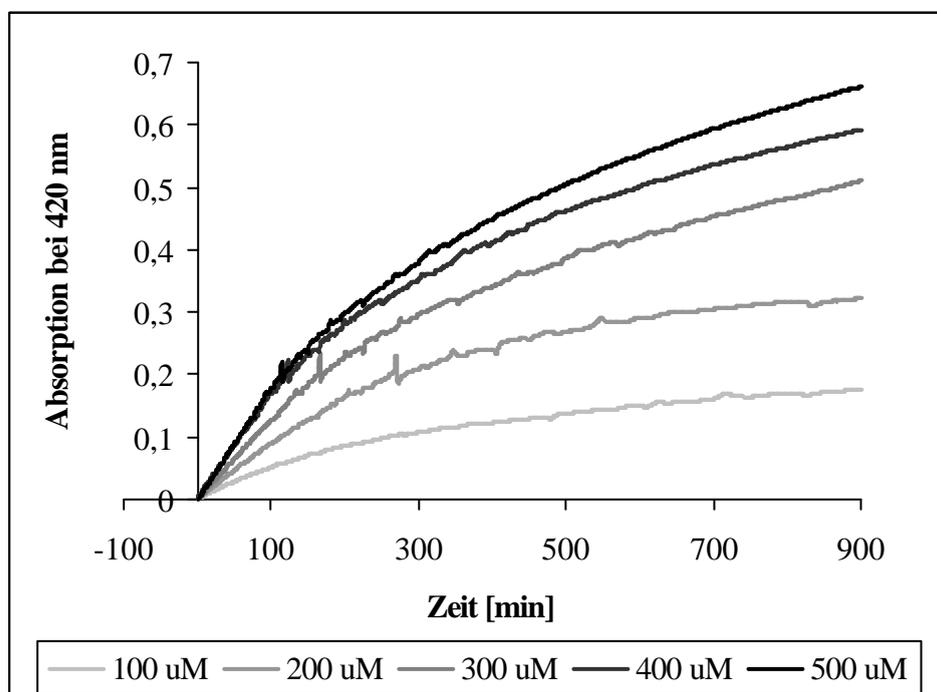


Abb. 58: Proteolytische Aktivität der α I-Tryptase

Über einen Zeitraum von 900 Minuten wurden verschiedene Konzentrationen Gly-Pro-Lys-pNA mit α I-Tryptase inkubiert. Gezeigt ist die Quantifizierung der zunehmenden Gelbfärbung des Reaktionsgemisches.

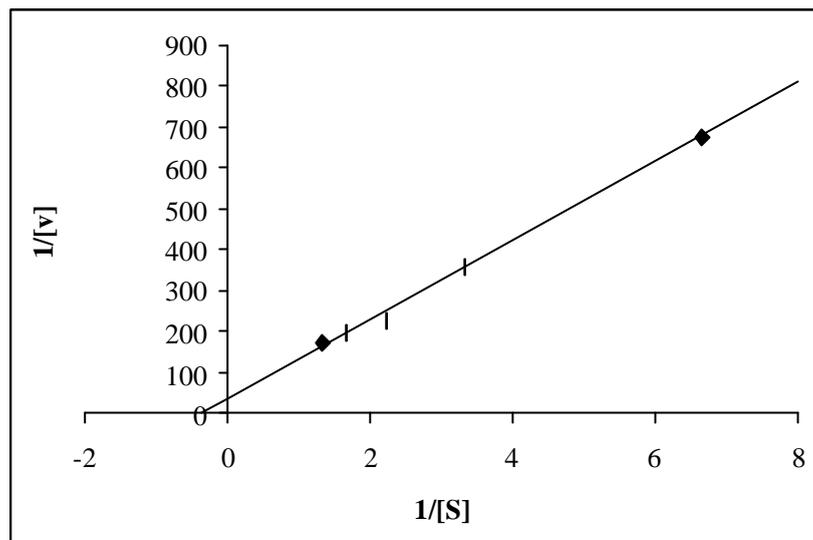


Abb. 59: Michaelis-Menten-Plot

Mit Hilfe von linearer Regression sind in diesem Graphen die oben erlangten kinetischen Daten analysiert und nach der Michealis-Menten-Methode ausgewertet worden.

Für das Substrat-Analog Gly-Pro-Lys-*p*NA ergab sich ein K_M -Wert von 180 μM und für Gly-Pro-Arg-*p*NA ein K_M -Wert von 80 μM . Die k_{cat} -Werte waren in beiden Fällen extrem niedrig und lagen im Bereich von 1 h^{-1} . Im Vergleich dazu haben β -Tryptasen bei gleichen Substraten k_{cat} -Werte von etwa 21 s^{-1} . Insgesamt besitzt 1 μM αI -Tryptase gegen die Substrat-Analoga Gly-Pro-Lys-*p*NA und Gly-Pro-Arg-*p*NA die gleiche Aktivität wie 10 pM β -Tryptase. Trotzdem ist eine proteolytische Aktivität der αI -Tryptase klar erkennbar und quantifizierbar.

4.3.12 Aktivierungsmechanismus der α -Tryptase

Diese experimentellen Ergebnisse zeigen unzweifelhaft, daß αI -Tryptase eine schwache, aber distinkte proteolytische Aktivität sowohl gegen peptidische als auch gegen gewisse Protein-Substrate besitzt. Diese Aussage steht scheinbar im diametralen Gegensatz zu der gelösten Kristallstruktur, die in dieser Konformation nicht kompatibel mit irgendeiner proteolytischen Aktivität ist.

Es ist deshalb unzweifelhaft, daß jede katalytische Aktivität der α I-Tryptase eine Umordnung des inaktivierten aktiven Zentrums in eine höchstwahrscheinlich β -Tryptase-artige Konformation voraussetzt.

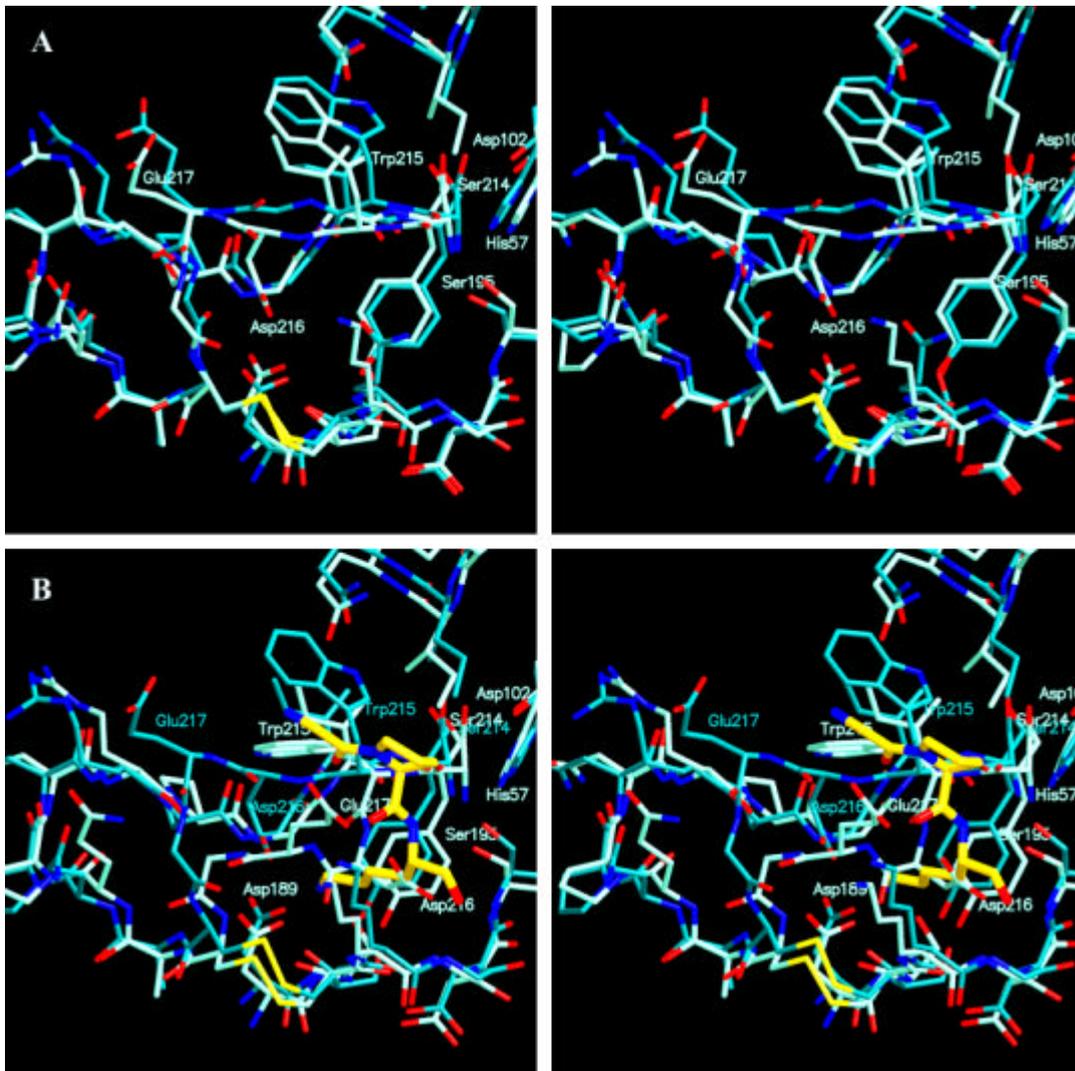


Abb. 60: Strukturelle Basis der α I-Tryptase-Aktivierung

Teilbild A zeigt eine Überlagerung der Struktur der β III-Tryptase (cyan) mit der aktivierten Form der α I-Tryptase als Stereoabbildung. Im Teilbild B ist gelb das identifizierte Substrat N-Gly-Pro-Lys-C in das aktive Zentrum der modellierten aktivierten α I-Tryptase (cyan) gebunden. Die überlagerte inaktive Form der α I-Tryptase (hellblau) zeigt die Unmöglichkeit der Substratbindung in diesem Zustand. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997) erstellt

Abbildung 60 zeigt eine Überlagerung der nativen α I-Tryptase-Struktur mit einer hypothetischen aktivierten α I-Tryptase-Struktur. Modellierungs-Experimente zeigen, daß

aufgrund der β -Tryptase-ähnlichen Umgebung um die S1-Tasche, der abgeknickte Ser214-Gly219-„loop“ sich relativ einfach in eine der β -Tryptasen-ähnliche Konformation umlagern könnte. Dies würde hauptsächlich durch Rotationen um die N-C $^{\alpha}$ -Bindungen des Tryptophans 215, des Aspartats 216, des Glutamats 217 und des Glycins 219 zu bewerkstelligen sein. Die Konformation des Glycins und damit die Richtung, in die die für die Koordination des Substrates wichtige Carbonyl-Gruppe zeigt, scheint in einem Modell mit unbesetzter S1-Tasche variabel zu sein. Diese Rückfaltung könnte fast vollständig ohne Bewegung der umgebenden Aminosäuren und deren Seitenketten erfolgen. Das Resultat wäre die Erstellung einer Substratbindungsstelle durch das ausgestreckte Segment Ser 214- Glu 217. Die S2-, S3- und S4-Taschen wären vollständig zugänglich. Nur das Ausmaß der S1-Spezifitätstasche ist in dieser aktivierten Form der α I-Tryptase etwas eingeschränkt. Dies liegt hauptsächlich darin begründet, daß die Seitenkette des Aspartats 216 in dieser Konformation sich von der Rückseite in die S1-Tasche erstrecken würde. Auf diese Weise blockiert sie teilweise, ähnlich wie die Seitenkette des Valins 216 in leukozytischer und pankreatischer Elastase (Bode *et al.*, 1989), eine Annäherung des Substrates an Die Asparaginsäure 189 am Boden der S1-Tasche. Die Carboxylat-Gruppe des Aspartats 216 würde hierbei etwa zwischen der Carboxylat-Gruppe des Aspartats 189 und Glycin 219 stehen. Dabei zeigt die Carbonyl-Gruppe des Glycins unter Vermeidung des Zusammentreffens mit Asparaginsäure 216 in die S1-Spezifitätstasche, nimmt also eine Konformation ähnlich der α I-Tryptase-Struktur ein und stellt so gleichzeitig einen Bindungspartner für etwaige Wasserstoffbrückenbindungen dar.

Dieses elektrostatisch sicherlich unvorteilhafte Arrangement der Seitenketten der Aspartate 216 und 189 sowie der Carbonyl-Gruppe des Glycins 219 verursacht eine Instabilisierung dieser „aktiven“ Konformation. Dies könnte ein möglicher Grund sein, warum native α I-Tryptase *in vivo* in der beobachteten inaktiven Form vorliegt. Molekulardynamische Rechnungen zeigen, daß eine aktivierte α I-Tryptase - trotz der räumlich etwas beengten Ausmaße der S1-Tasche - in der Lage ist, größere basische Seitenketten wie die des Lysins oder des Arginins aufzunehmen. Abbildung 61 zeigt das Ergebnis der entsprechenden Modellierungs-Experimente. Die Substratbindung erfordert hierbei lediglich leichte Umordnungen im Bereich der Spezifitätstasche und eine geringe Verschiebung des Serins 190. Die Einlagerung eines basischen P1-Restes in die S1-Tasche stabilisiert die aktive Konformation zusätzlich durch den auftretenden Ladungsausgleich.

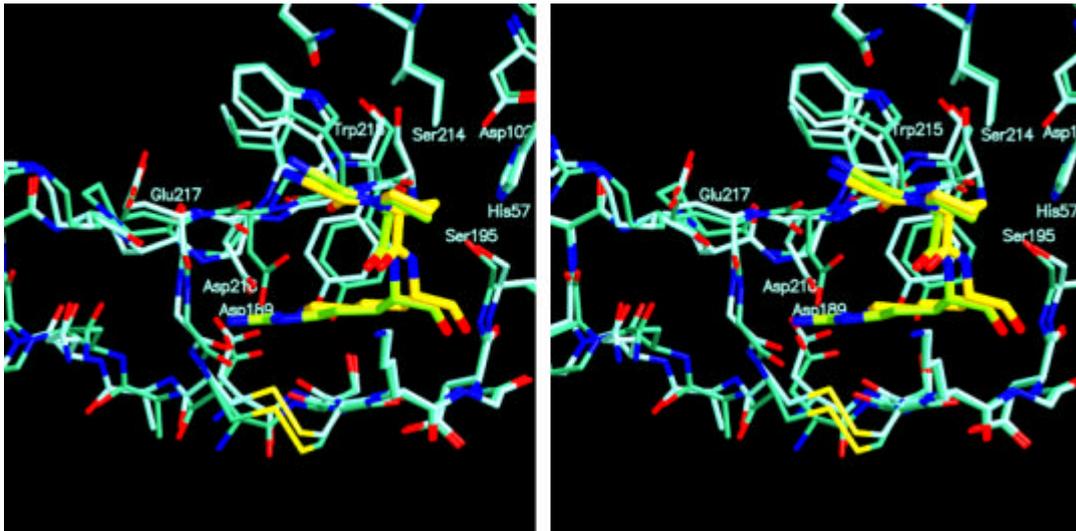


Abb. 61: N-Gly-Pro-Lys-C und N-Gly-Pro-Arg-C im Vergleich

Die beiden untersuchten Substrate N-Gly-Pro-Lys-C (gelb) und N-Gly-Pro-Arg-C (grün) wurden jeweils in das aktivierte aktive Zentrum der α I-Tryptase energetisch hineinmodelliert. Die hellgrüne Struktur ergibt sich hierbei für N-Gly-Pro-Arg-C und die hellblaue Struktur ergibt sich für N-Gly-Pro-Lys-C. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT/Raster3D (Kraulis, 1991) (Merritt and Bacon, 1997) erstellt

Die kinetischen Experimente haben ergeben, daß Arginin verglichen mit Lysin der optimalere P1-Rest ist, obwohl der räumlich größere Arginin-Rest schwerer in der S1-Tasche unterzubringen ist. Strukturell drückt sich dies im Ausweichen der Seitenkette der Asparaginsäure 216 - induziert durch die Substratbindung - aus.

Auf der anderen Seite wäre Lysin geradezu ideal geeignet, in die Spezifitätstasche zu binden, ohne daß dies Ausweichbewegungen anderer Seitenketten zur Folge hätte. Daß Arginin trotzdem das präferierte Substrat darstellt, mag an der erhöhten Basizität sowie der sterischen Anordnung der Guanidyl-Gruppe der Seitenkette liegen, die sich so besser zum Ladungsausgleich eignet. Der Nachteil der räumlichen Enge scheint durch diesen Einfluß mehr als aufgewogen zu werden.

Für die durch Isoleucin 79 und Histidin 57 geformte S2-Tasche ergibt sich aus den Modellierungs-Experimenten, daß sie ausgezeichnet zur Aufnahme eines Prolins geeignet ist. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit der biochemisch bestimmten Substratspezifität.

4.3.13 Inhibition durch Zn^{2+} -Bindung

Geringe Mengen an Zn^{2+} sind in der Lage, die katalytische Aktivität von α I-Tryptase drastisch zu reduzieren. Unter Verwendung desselben experimentellen Aufbaus wie bereits für die kinetische Charakterisierung der α -Tryptasen verwendet, wurde die inhibitorische Wirkung von 1mM ZnCl_2 auf die α I-Tryptase-Aktivität quantifiziert. Abbildung 62 zeigt den entsprechenden Reaktionsverlauf mit 500 μM Gly-Pro-Lys-*p*NA mit und ohne Zn^{2+} .

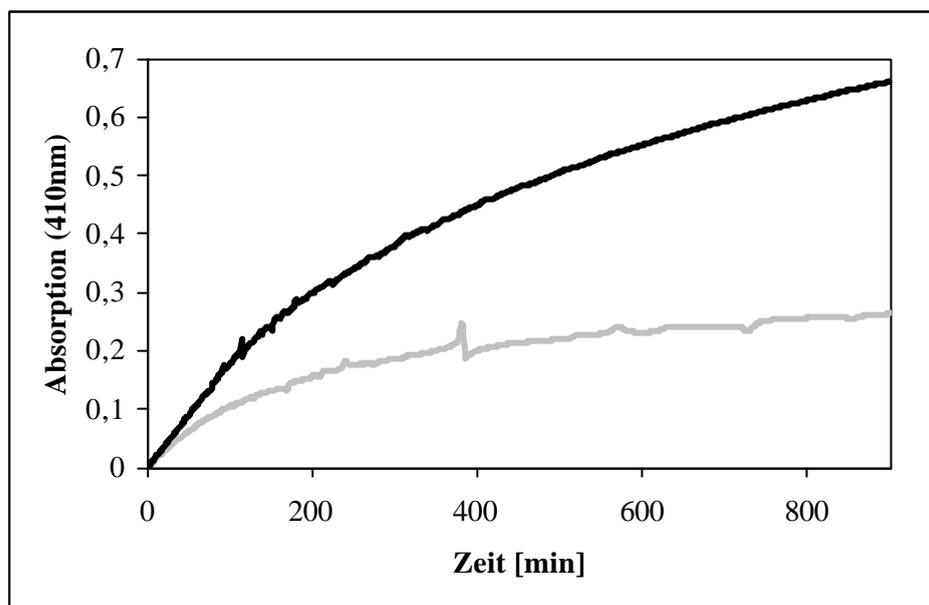


Abb. 62: α I-Tryptase-Aktivität wird durch Zn^{2+} gehemmt

Dargestellt ist der Verlauf der Proteolyse von 500 μM Gly-Pro-Lys-*p*NA durch Inkubation mit α I-Tryptase bei Raumtemperatur (schwarz) alleine und in Gegenwart von 1 mM Zn^{2+} (grau)

Um den Modus der α -Tryptase-Inhibition durch Zn^{2+} -Kationen zu ergründen, ist die Struktur des α I-Tryptase- Zn^{2+} -Komplexes gelöst worden. Während die Struktur des α I-Tryptase-Tetramers durch das Einwirken des Zn^{2+} nicht beeinflusst wird, kann ein einzelnes Zn^{2+} -Kation direkt am inaktivierten aktiven Zentrum lokalisiert werden (Abbildung 61).

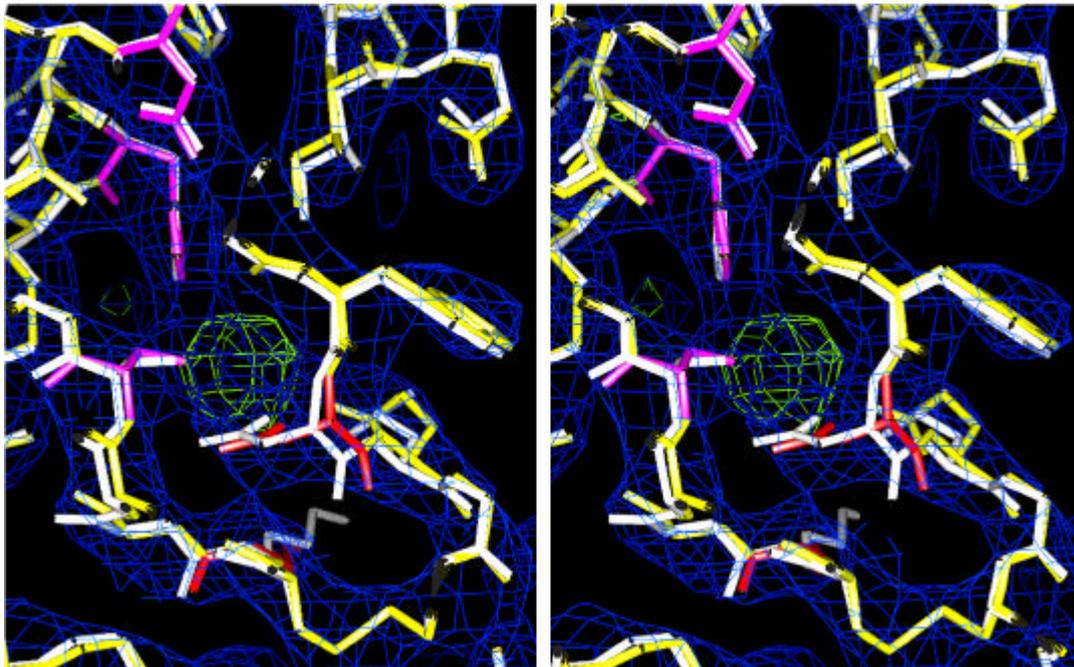


Abb. 63: Strukturelle Basis für die Inhibition von α I-Trypsase durch Zn^{2+}

Abgebildet ist das „aktive“ Zentrum der α I-Trypsase. Die native Struktur (weiß) ist überlagert mit der Zn^{2+} -Komplexstruktur gelb. Die katalytische Triade ist violett und die sich zwischen α - und β -Trypsase unterscheidenden Aminosäuren sind rot dargestellt. Grün zeigt die $F_{obs}-F_{calc}$ -Elektronendichte, konturiert bei 5σ , die Position des Zn^{2+} -Kations an, während die blaue, bei 1σ konturierte, $2F_{obs}-F_{calc}$ -Elektronendichte die Positionen der Aminosäuren eindeutig vorgibt. Die Abbildung wurde erstellt mit MAIN (Turk, 1992).

Die α I-Trypsase-Struktur in weiß ist überlagert mit der farbig dargestellten Komplexstruktur abgebildet. In violett ist die katalytische Triade und in rot die sich von β -Trypsasen unterscheidenden Reste Lysin 192 und Asparaginsäure 216 gezeigt. Das Zn^{2+} -Kation ist eindeutig in der Elektronendichte definiert und wird durch den Imidazol-Ring des Histidins 57, die Hydroxylgruppe des Serins 195, die Carboxylgruppe des Aspartats 216 und wahrscheinlich durch ein Wasser vierfach koordiniert. Allerdings ist diese Koordination nicht vollständig tetraedisch, wie es sonst häufig bei Komplexierungen von Zn^{2+} , beispielsweise durch EDTA oder durch BABIM in Trypsin-artigen Serinproteinasen gefunden wird. Um die Aufnahme des Kations zu bewerkstelligen, weicht die Asparaginsäure etwas aus, ohne dabei selbst in eine energetisch ungünstige Umgebung zu gelangen.

Das Zn^{2+} -Kation scheint durch seine Position und seine Koordination die ungewöhnliche Konformation des 214-220-„loops“ zu manifestieren und so die Inhibition zu verursachen.

4.4 Diskussion

Gleichermaßen mit β -Tryptasen und im Gegensatz zu den kürzlich identifizierten γ -Tryptasen (Caughey *et al.*, 2000), die monomerisch vorliegen und einen zusätzlichen Membrananker besitzen, bilden auch α -Tryptasen *in vivo* ein tetrametrisches Arrangement aus. Dieses Tetramer ist in seiner Topologie den β -Tryptase-Tetrameren eng verwandt.

Der Faltungstyp der α I-Tryptase-Monomere ähnelt dem der β -Tryptasen und insgesamt den Trypsin-artigen Serinproteinasen. Das N-terminale Ile 16-Val 17-Segment ist in α -Tryptasen in die Ile 16-Spalte inseriert, wo es eine interne Salzbrücke zur Seitenkette der Asparaginsäure 194 bildet. Die hierdurch ausgelöste interne Bewegung der Asparaginsäure 194-Seitenkette geht einher mit der Maturation des Asp189-Asp194-Bodens der S1-Tasche und des „oxyanion hole“ (Bode, 1979a). Dieser Vorgang beschreibt den Mechanismus der Aktivierung der α I-Tryptase nach Abspaltung des pro-Peptides und ist ebenfalls den Aktivierungsmechanismen anderer Serinproteinasen eng verwandt. In starkem Kontrast zu anderen Proteinasen ist eine so aktivierte α I-Tryptase aber immer noch nicht proteolytisch aktiv.

In Übereinstimmung mit Homologie-Modellierungs Experimenten (Bergner, A., 1998, unpubliziert) wurde für α -Tryptasen eine grundsätzlich den β -Tryptasen ähnelnde Umgebung des aktiven Zentrums angenommen. Hierbei würde die Seitenkette des Aspartats in die S1-Tasche vordringen und diese in ihren Ausmaßen, ähnlich wie durch Val 216 in pankreatischer und leukozytischer Elastase (Bode *et al.*, 1989), räumlich begrenzen. Für die Akkomodation von Lysin- oder Arginin-Seitenketten müßte sich die S1-Tasche unter Aufwendung von freier Energie weiten, was bisher als Grund für die anscheinende Inaktivität dieses Enzyms angenommen wurde.

Die Röntgenstrukturanalyse der α -I-Tryptase eröffnet nun eine einfache und dennoch überraschende Erklärung für die Inaktivität dieses Isoenzym: Die gesamte „nonprimed“ Substrat-Bindungs-Region der α I-Tryptase wird durch einen Knick in der Konformation des an der Oberfläche liegenden Ser 214-Cys 220-Segments zerstört. In β -Tryptasen ermöglicht diese Sequenz das optimale Binden sich annähernder Substrate und ist weiterhin ein wichtiges Konstruktionselement der S1-Spezifitätstasche. In α -Tryptasen hingegen blockiert die Proteinhauptkette in diesem Teil der Struktur den Eingang zur vorgeformten S1-Tasche, verhindert die Bindung und Annäherung von Substraten - insbesondere durch die Seitenketten

der Reste Trp 215, Asp 216, und Glu 217 - und involviert ein Mitglied der katalytischen Triade, Ser 195, in Wasserstoffbrücken-Interaktionen. Eine Serinproteinase mit einem derartig deformierten aktiven Zentrum ist zweifelsfrei inaktiv.

Diese Umordnung des Ser 214-Cys 220-Segmentes in α -Trypsasen resultiert teilweise aus der Vermeidung der energetisch ungünstigen Zusammenlagerung der Seitenketten der Asparaginsäuren 216 und 189 sowie der Carbonyl-Gruppe des Glycins 219, die sie in einer β -Trypsase-ähnlichen Konformation einzunehmen hätten.

Eine weitere Triebkraft für diese unübliche Konformation ergibt sich ebenfalls aus der Präsenz der Asparaginsäure anstelle eines Glycins an Position 216. Die Seitenkette dieser Asparaginsäure scheint hierbei im "oxyanion hole" durch die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung zum Serin 195 festgehalten zu sein, was das beobachtete Abknicken des Ser 214-Cys 220-Segmentes zur Folge hat.

Die teilweise Wiedergewinnung an enzymatischer Aktivität der α -Trypsase, wie sie durch Rückmutation des Aspartats 216 in ein Glycin erreicht werden kann (Huang *et al.*, 1999), unterstützt diese Einschätzung. Die Wichtigkeit der genauen Beschaffenheit der Aminosäure 216 in Bezug auf Ladung und Länge der Seitenkette für ihre Funktion als Schalter, der zwischen inaktiviertem und aktivem katalytischen Zentrum der α -Trypsasen umschaltet, soll in der Zukunft durch weitere Mutationsstudien verbunden mit der Kristallisation der einzelnen Mutanten ergründet werden.

Die immer noch auf 1/25 reduzierte Aktivität der D216G-Mutante der α -Trypsase - verglichen mit β -Trypsasen gegen Substrate wie etwa tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA - zeigt jedoch, daß andere, der zwischen α - und β -Trypsasen unterschiedlichen Aminosäuren, die Aktivität der mutierten α -Trypsase ebenfalls erheblich beeinflussen.

Außer Asparaginsäure 216 und Lysin 192 befinden sich keinerlei Sequenzveränderungen in der Umgebung des "aktiven" Zentrums. Auffälligerweise sind aber die Hälfte aller im Vergleich zu β -Trypsasen veränderten Aminosäuren in den oder nahe der charakteristischen Oberflächen-"loops" zu finden, die für die Tetramerbildung verantwortlich sind. Gemeinsam betrachtet bewirken diese im Ergebnisteil genauer beschriebenen Austausch eine Stabilisierung insbesondere der räumlich spektakulär kleinen Interaktionsfläche von $\sim 500 \text{ \AA}^2$ zwischen den Monomeren A und B sowie C und D. Zusätzlich sind die ladungsbedingten Abstoßungseffekte entlang der A-B- und C-D-

Oberfläche im α -Tryptase-Tetramer verringert. Die beobachtete Kompression des Tetramers entlang seiner A-B-Achse ist daher möglicherweise ein Ausdruck dieser synergistischen Effekte und ihrer stabilisierenden Wirkung in dem von hydrophobischen Wechselwirkungen dominierten A-B-Interface. Die Tetramer-Stabilität könnte zusätzlich durch eine inhärente Tendenz der einzelnen Monomere, eine für die Tetramer-Bildung idealere Konformation anzunehmen, erhöht werden.

Die aus den beschriebenen Einflüssen resultierende Tetramer-Stabilität des α I-Tryptase-Tetramers ist so hoch, daß sie zur Erhaltung des Komplexes der Bindung von Proteoglykanen nicht bedarf. Sogar die Behandlung mit SDS scheint das α I-Tryptase Tetramer zu überstehen. Die Tatsache, daß die proteolytisch aktiven Tryptasen aus Maus und Ratte, mMCP-7, rMCP-6 und rMCP-7 (Lutzelschwab *et al.*, 1997) ebenfalls der Stabilisation durch Heparin nicht bedürfen, zeigt, daß proteolytische Inaktivität und Tetramer-Stabilität nicht zusammenhängen, sondern getrennt voneinander zu betrachten sind.

Die A-B und C-D Peripherie erfüllt alle Voraussetzungen, um eine aus bis zu 20 Gliedern bestehende Heparinkette zu binden. Die verglichen mit β -Tryptasen etwas reduzierte positive Ladung der Oberfläche zusammen mit der möglicherweise störenden Zuckerkette an der Moleküloberfläche könnte eine etwas geringere Heparinaffinität zur Folge haben. Physiologisch ist die Heparin-Unabhängigkeit des α -Tryptase eventuell von großer Wichtigkeit, da sie die Existenz des α I-Tryptase-Tetramers weit entfernt von den Granula der Mastzellen und den Basophilen ermöglicht. Diese Erkenntnis befindet sich in guter Übereinstimmung mit der Präsenz von α I-Tryptase-Tetrameren im Blut, wo sie eine bisher unbekannt Rolle im Immunsystem spielen könnten. Ob die Bindung von Proteoglykanen für die initiale Bildung des α I-Tryptase-Tetramers vonnöten ist oder nicht, konnte im Rahmen der beschriebenen Studien nicht ermittelt werden.

Eine proteolytische Aktivität der nativen α I-Tryptase steht im grundsätzlichen Widerspruch zu ihrer Struktur und ist nur bei einer den β -Tryptasen ähnlichen Konformation des aktiven Zentrums vorstellbar. Dies würde eine Reorganisation des inaktivierten "aktiven" Zentrums voraussetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, daß α I-Tryptase sehr wohl eine, wenn auch geringe, so doch klar definierte und quantifizierbare proteolytische Aktivität nicht nur gegen kleine peptidische Substrate sondern auch gegen große, teilweise denaturierte Proteine

wie Casein und gegen große, globuläre Proteine wie BSA zeigt. Im BSA wurde eine klar definierte Spaltstelle in einem exponierten und sehr mobilen „loop“ gefunden. Dieser „loop“ erfüllt alle Voraussetzungen, um sich in die innere Pore des Tryptase Tetramers zu erstrecken und bis zu den „aktiven“ Zentren vorzudringen.

Das N-Pro^{P2}-Lys^{P1}-C-Segment an dieser Spaltstelle legt nahe, daß α I-Tryptase eine Präferenz für diese Aminosäuren an den Positionen P1 und P2 in einem peptidischen Substrat zeigt. Zumindest in der Besetzung der Position P1 mit einer basischen Aminosäure, die letztendlich durch die Asparaginsäure 189 in der S1-Spezifitätstasche koordiniert wird, zeigt sich die Verwandtschaft zu anderen Trypsin-artigen Serinproteinasen. Die gefundene Aminosäuresequenz, die für die Existenz einer Spaltstelle für α -Tryptasen offenbar Voraussetzung ist, befindet sich in guter Übereinstimmung mit den Modellierungs-Experimenten.

Diese haben eine dem aktiven Zentrum der β -Tryptasen angepaßte Konformation der α I-Tryptase-S1-Spezifitätstasche und deren unmittelbarer Umgebung zur Grundlage. Hieraus resultieren zugängliche S1-S4-Taschen sowie ein ausgestrecktes Ser 214-Glu 217-Segment, das die initiale Substratbindung ermöglicht. Wie gezeigt, erfordert die Bildung einer solchen wahrhaft aktiven Konformation der α I-Tryptase lediglich eine einfache Rückfaltung des „abgeknickten“ Ser 214-Cys 220-„loops“. Molekulardynamische Berechnungen zeigen, daß eine so ausgebildete Struktur ebenfalls stabil wäre und daß ein Lysin^{P1}-Rest in der Spezifitätstasche trotz der durch die Präsenz des Aspartats 216 verursachten zusätzlichen Enge aufgenommen werden kann. Eine mögliche Überfüllung der S1-Tasche kann durch die Auswärtsorientierung der Carbonyl-Gruppe des Glycins 219 hierbei vermieden werden. Obwohl diese räumliche Begrenztheit mit einem Arginin an P1-Position noch ausgeprägter wäre, so scheint Arginin trotzdem der bevorzugte P1-Rest zu sein. Dies reflektiert möglicherweise die bessere Fähigkeit des Arginins, einen Ladungsausgleich in der ansonsten sehr mit einem elektrostatisch negativen Potential behafteten S1-Tasche zu bewirken.

Diese Interpretation wird durch die kinetischen Daten gestützt, in denen α -Tryptase ebenfalls eine leichte Präferenz für Arginin an der P1-Position zu haben scheint. Während β II-Tryptase bei diesen Substraten einen k_{cat}/K_M -Wert von $0.43 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ besitzt und die D216G-Mutante der α I-Tryptase noch auf einen k_{cat}/K_M -Wert von $0.016 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ kommt, erreicht die α I-Tryptase lediglich einen k_{cat}/K_M -Wert von $2.1 \times 10^{-6} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Dieser sehr niedrige Wert kann darin begründet liegen, daß die reine Interaktion des Substrates mit dem

inaktivierten aktiven Zentrum bei der α I-Tryptase für die Generierung einer erheblichen proteolytischen Aktivität nicht ausreicht und *nativ* möglicherweise durch eine zusätzliche Wechselwirkung mit einer Exosite ergänzt wird.

α I-Tryptase kann durch die Komplexierung von Zn^{2+} , wie viele andere Enzyme auch, inhibiert werden. Die strukturellen Grundlagen für diesen Effekt sind hierbei ähnlich wie bei der Inhibition von Trypsin-artigen Serinproteinasen durch BABIM. In α -Tryptasen übernimmt hierbei die Seitenkette des Aspartats 216 die Funktion des BABIMs und koordiniert das Zn^{2+} -Kation zweifach. Hierbei entsteht allerdings keine perfekte tetraedrische Umgebung des Zinks, was zur Folge hat, daß Zn^{2+} α -Tryptasen bei weitem nicht so effizient hemmt wie BABIM/ Zn^{2+} Trypsin.

Prinzipiell sind zwei Modelle denkbar, die die proteolytische Aktivität der α I-Tryptase beschreiben.

Einerseits könnte die aktive Konformation, die für die proteolytische Aktivität verantwortlich ist, in einer geringen, kristallographisch nicht detektierbaren Population vorliegen, die im Gleichgewicht mit der überwiegenden inaktiven Konformation - wie in der Kristallstruktur gefunden - steht. In einem solchen „Gleichgewichtsmodell“ würde die Bindung von Substraten aktive α I-Tryptase-Tetramere aus dem Gleichgewicht entfernen, was dann wieder zu einer Neueinstellung des ursprünglichen Gleichgewichtes führen würde.

Alternativ hierzu könnte diese aktive α I-Tryptase-Konformation durch ein sich annäherndes Substrat induziert werden („induced fit model“). Dies würde unter gleichzeitiger Reorganisation des Ser 214-Cys 220-Segmentes, Ausbildung des ausgestreckten Ser 214-Glu 217-Segmentes zur Substratbindung und darauffolgender Insertion der P1-Seitenkette in die nun geöffnete S1-Spezifitätstasche erfolgen.

Die bisher bekannten Proteinase-Regulationssysteme sind in einer Arbeit von W. Bode und R. Huber kurz zusammengefaßt (Bode and Huber, 2000). Zusätzlich zur Regulation, bedingt durch ihre grundsätzliche Aktivierung, die als eine Art allosterischer Interaktion aufgefaßt werden kann, werden die reifen Proteinaseformen meistens *in vivo* durch koexprimierte Inhibitoren kontrolliert. Diese interagieren häufig substratartig mit dem aktiven Zentrum der Proteinase. Ein Beispiel für diesen Regulationstyp ist die kanonische Inhibition der Trypsin-artigen Serinproteinasen. Die Inhibition von Papain-artigen Proteinase durch Cystatine ist ein Beispiel für die Inhibition durch die Bindung an Exosites, die in der näheren

Umgebung des aktiven Zentrums liegen. Für größere Substrate wird hierdurch die Annäherung an das aktive Zentrum unmöglich gemacht. Einen Extremfall in dieser Inhibitionsklasse stellt sicherlich die Inhibition von Thrombin durch Triabin dar. Hier liegt die Bindungsstelle des Inhibitors sehr weit vom aktiven Zentrum entfernt, so daß nur die Interaktion mit extrem großen Substraten - wie Fibrinogen - die über eine ausgedehnte Fläche auf der Moleküloberfläche mit der Proteinase wechselwirken, behindert wird. β -Tryptasen, gemeinsam mit allen anderen kompartimentalisierten Proteinase zeigen eine weitere Regulationsart auf. Hier wird der Zugang zum aktiven Zentrum der Proteinase durch die ganz spezifische Architektur der zumeist sehr großen Proteine, unter denen Tryptase das mit Abstand kleinste Beispiel darstellt, reguliert.

Neben der für Tryptasen typischen Regulation durch Kompartimentalisierung besitzen α -Tryptasen einen zusätzlichen, bisher für Proteinase noch nicht bekannten Regulationsmechanismus. Ein selbst nach vollständiger Maturierung und Tetramerisierung im inaktiven Zustand befindliches aktives Zentrum kann erst durch die Erkennung eines Substrates aktiviert werden. An die Spezifität eines solchen Substrates werden hohe Anforderungen gestellt. Der Versuch, typische Serinproteinase-Inhibitoren, wie beispielsweise APPA oder BABIM, in α -Tryptase-Kristalle einzudiffundieren, blieb erfolglos, was die hohe Stabilität der Konformation des umgeordneten 214-220-„loops“ belegt. Ein solcher „induced-fit“ Mechanismus ist daher eine zusätzliche Strategie, eine hohe Selektivität von α -Tryptasen zu fördern.

Es ist also gelungen, die viel gestellte Frage nach einer möglichen Aktivität der α -Tryptasen dahingehend zu beantworten, daß dieses Enzym eine hochregulierte und sehr spezifische aber grundsätzliche aktive Proteinase ist, die möglicherweise durch einen „induced-fit“-Mechanismus aktiviert wird. Diese Beobachtung ist sehr konsistent mit der Beobachtung, daß α -Tryptasen frei im Blutstrom nachweisbar sind. Die Unabhängigkeit von Heparin ermöglicht dort die Existenz der α -Tryptase-Tetramere und verlangt gleichzeitig nach einer strengen Regulation, da aktive Proteinase unkontrolliert durch Inhibitoren frei im Blutstrom sonst erheblichen Schaden anrichten könnten. Gegenstand der zukünftigen Forschung ist die Identifikation der Substrate der α -Tryptasen *in vivo*.

Zwei weitere mögliche Funktionen der α -Tryptasen sollen hier ebenfalls genannt werden, die keine eigene proteolytische Aktivität voraussetzen. So könnte α -Tryptase mit den β -Tryptasen im Wettbewerb um die Heparinbindung stehen. Auch wenn α -Tryptasen kein

Heparin für die eigene Stabilität brauchen, so können sie doch den β -Tryptasen dieses entziehen, damit die Lebensdauer der β -Tryptase Tetramere verkürzen und deren Aktivität so regulieren. Desweiteren könnten α -Tryptasen die Funktion von Boten-Molekülen ausüben, die beispielsweise Basophile aus der Blutbahn nach einer allergischen Reaktion anlocken können.

5 Weitergehende Experimente und Ausblick

Die zentrale Rolle des Aspartats 216 bei der Selbstinhibition der humanen α I-Tryptase ist im vorherigen Kapitel ausführlich diskutiert worden. Die gelöste Kristallstruktur läßt vermuten, daß diese Asparaginsäure hauptverantwortlich für die spektakuläre Umordnung des aktiven Zentrums der α -Tryptasen in ihrem substratlosen Zustand ist. So entsteht die Triebkraft für diese spektakuläre Konformation einerseits aus der Formation einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carboxylat des Aspartats und der Hydroxyl-Gruppe des Serins 195. Gleichzeitig wird durch die Asparaginsäure 189 anstelle des normalerweise vorhandenen Glycins 216 im substratlosen, aktivierten Zustand am Boden der S1-Spezifitätstasche mit der ebenfalls sauren Seitenkette des Aspartats 216 und der Carbonyl-Gruppe des Glycins 219 ein stark negativer Ladungsschwerpunkt erzeugt. Dieser benachteiligt die normale Serinproteinase-Konformation energetisch gegenüber der inaktiven Form. Dem Asparaginsäure 216 kommt hierbei im Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Konformation die Funktion eines Schalters zu, der ohne Substrateinwirkung auf „inaktiv“ steht. Hierbei sind die äußeren Dimensionen dieser Seitenkette ideal für diese Aufgaben bemessen. Mutationen der Asparaginsäure 216 zu einem Glutamat, einem Serin und einem Lysin verbunden mit der Strukturaufklärung und kinetischen Charakterisierung dieser Mutanten, sollen die zentrale Rolle des Aspartats genauer bestimmen.

Mutiert man dieses Asparaginsäure 216 zu einem Glycin - wie in voll aktiven β -Tryptasen vorhanden - so wird trotzdem lediglich 1/20 der gesamten β -Tryptase-Aktivität zurückerlangt (Huang *et al.*, 1999). Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, daß auch die anderen, sich zwischen den Tryptase-Isoformen unterscheidenden Aminosäuren, zum Teil erheblichen Einfluß auf die enzymatische Aktivität der α -Tryptase haben. Um diesen Einfluß im einzelnen genauer zu erforschen habe, sind die in Abbildung 64 gezeigten α -Tryptase Mutanten bereits kloniert worden. Zusätzlich zu der „active site“-Mutante Asp 216 \rightarrow Gly ist schrittweise jeweils eine weitere Aminosäure neu mutiert worden, so daß der Vergleich der kinetischen Daten der einzelnen Mutanten genauen Aufschluß über den Beitrag der ausgetauschten Reste zur Proteinase-Aktivität geben wird.

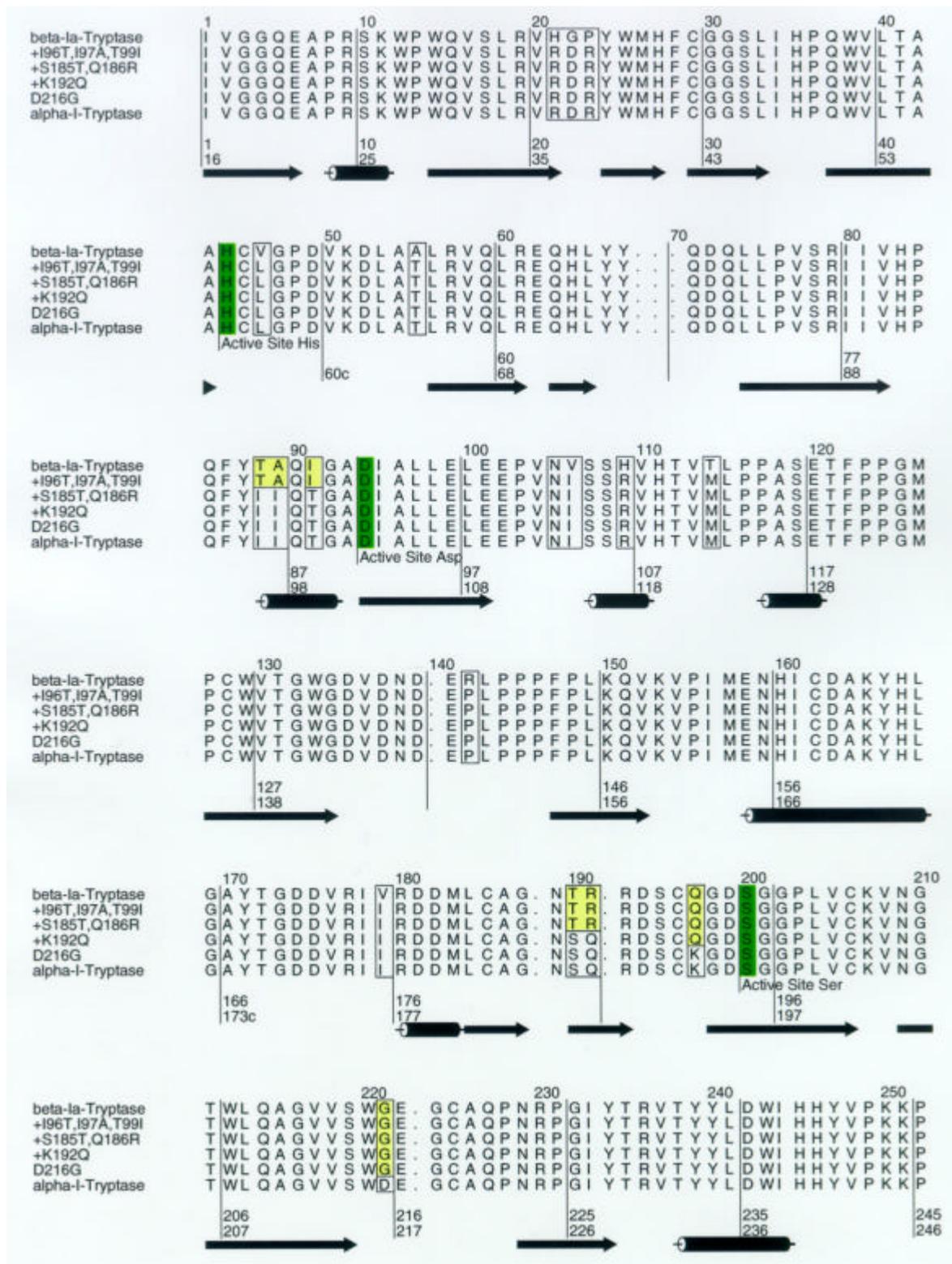


Abb. 64: Bereits klonierte α I-Tryptase-Mutanten

Dieser Sequenzvergleich ist gleich strukturiert wie Abbildung 29. Die an der katalytischen Triade beteiligten Aminosäuren sind grün unterlegt. Gelb hervorgehoben sind die Aminosäuren, die sich in der entsprechenden Mutante von der Sequenz der nativen α I-Tryptase unterscheiden.

Ausgesprochen problematisch bei der Röntgenstrukturanalyse von β -Tryptasen ist die schlechte Qualität der erhältlichen Kristalle. Sie besitzen häufig nur eine äußerst geringe Streuleistung und überstehen das Einfrieren trotz extrem schonender Behandlung nie vollständig schadlos. Im Ergebnis ist mit einem sehr hohen Aufwand lediglich eine nur geringe Datenqualität erzielbar, was Probleme bei der Verfeinerung des Modells bereitet und letztendlich auch bei einer fertiggestellten Struktur in relativ hohen R -Faktoren und R_{free} -Werten Ausdruck findet. Interessanterweise treten diese Probleme bei der fast sequenzidentischen α I-Tryptase nicht auf. Diese Kristalle sind relativ einfach zu behandeln, und die resultierenden Datensätze sind problemlos auswertbar. Für die weitere Entwicklung von auf β -Tryptase-hemmender Wirkung basierenden Antiallergika werden die Kristallstrukturanalysen vieler weiterer β -Tryptase-Inhibitor-Komplexe vonnöten sein. α I-Tryptase-Kristalle gehören zur relativ symmetrischen kristallographischen Raumgruppe $P2_12_12_1$, während die β -Tryptase-Kristalle der ungünstigen niedrig symmetrischen Raumgruppe $P1$ zuzuordnen sind. Die Kristallkontakte in beiden Fällen entstehen durch Interaktionen zwischen den Peripherien der beteiligten Monomere. Die aktiven Zentren befinden sich im Gegensatz dazu im Inneren der Tetramere. Es müßte also möglich sein, unter Beibehaltung des Kristallaufbaus der α -Tryptase-Kristalle durch Angleichung des Tetramer-Inneren an die β -Tryptasen per Mutation der sich unterscheidenden Aminosäuren, eine Modellproteinase zu erschaffen, die die Peripherie und damit das Kristallisationsverhalten der α -Tryptasen und das aktive Zentrum und damit die Aktivität der β -Tryptasen besitzt. Dieses Modell würde sich ideal für die problemlose Co-Kristallisation mit verschiedenen β -Tryptase Inhibitoren eignen. Ein entsprechendes genetisches Konstrukt, wie in Abbildung 64 gezeigt, wurde von mir bereits erstellt und erste Expressionstests waren erfolgreich. Es sollte bemerkt werden, daß aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Trypsin-artigen Serinproteinasen diese im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode, das aktive Zentrum und dessen Umgebung einer schwer zu kristallisierenden Proteinase in die Peripherie einer leicht kristallisierbaren Proteinase einzufügen, und so die Kristallstrukturanalyse zu ermöglichen, generelle Anwendbarkeit besitzt.

Jedoch nicht nur für die Co-Kristallisation von Inhibitoren, sondern auch zu einem weiteren Zweck kann diese Kombination von α I-Tryptase-Peripherie mit dem Inneren der β -Tryptasen dienen. Viele potentielle Substrate für die Isoformen der β -Tryptasen sind, wie vorstehend bereits aufgeführt, bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt identifiziert worden. Was aber genau die nativ relevanten β -Tryptase-Substrate sind, ist bis heute unbekannt. Ein

generell häufig angewandter Weg, nach Interaktionspartnern eines zu untersuchenden Proteins zu forschen, ist es, dieses Protein an beispielsweise CNBr-aktivierte Sepharose als Säulenmaterial zu binden und ein der natürlichen Umgebung des Proteins entsprechendes Medium über diese Säule zu geben. Mit dem zu untersuchenden Protein interagierende Substanzen bleiben an der Säule haften und sind im Elutionsprofil identifizierbar. Für Trypsasen ist dieser beschriebene Weg bisher nicht gangbar gewesen, da die relativ instabilen β -Trypsase-Tetramere innerhalb kurzer Zeit zu Monomeren zerfallen und diese enzymatisch inaktiv sind. Auch durch den Einsatz hoher Heparinkonzentrationen ließ sich dieser Prozeß nur geringfügig verzögern. Im Gegensatz zu β -Trypsasen sind α -Trypsase-Tetramere auch ohne Heparin über einen längeren Zeitraum stabil. Diese erhöhte Stabilität ist durch Mutationen in den sechs charakteristischen Oberflächen-„loops“ bedingt. Diese „loop“-Regionen sind in der beschriebenen Mutante identisch zu reinen α -Trypsasen, was auch hier eine erhöhte Stabilität erwarten läßt. Ein solches Konstrukt wäre daher sehr wohl erfolgreich an ein Säulenmedium koppelbar und zur Suche nach natürlichen Substraten der verschiedenen β -Trypsase-Isoformen verwendbar. Da diese potentiellen Substrate aber durch ihre Bindung an β -Trypsasen und nicht durch deren Trypsase-katalysierte Hydrolyse identifiziert werden sollen, ist es notwendig, unter Beibehaltung der Konformation des aktiven Zentrums der Mutante, dessen proteolytische Aktivität zu eliminieren. Dieses kann leicht durch eine Serin 195 \rightarrow Ala Mutation erreicht werden.

β -Trypsase-Aktivität ist in Ermangelung eines proteinogenen Inhibitors streng reguliert durch das Heparin-abhängige Monomer-Tetramer Gleichgewicht, in dem das Monomer, obwohl es vollständig maturiert ist, die inaktive Spezies darstellt. Das entsprechende Gleichgewicht ist in verschiedenen Arbeiten charakterisiert worden und in Abbildung 8 bildlich dargestellt (Schechter *et al.*, 1993) (Schechter *et al.*, 1995) (Addington and Johnson, 1996). Die strukturellen Veränderungen in den beteiligten Komponenten, die mit der Tetramerformation, beziehungsweise dem Zerfall zu inaktiven Monomeren einhergehen, sind jedoch bis heute unverstanden. Der Zerfall des Tetramers zu Monomeren muß jedoch mit konformationellen Umfaltungen in eine Zymogen-artige Struktur verbunden sein, die die beobachtete proteolytische Inaktivität erklären kann. Fluoreszenz-Studien haben tatsächlich belegt, daß im Laufe des Tetramer-Zerfalls Umfaltungen in den Monomeren stattfinden (Selwood *et al.*, 1998). Da es sich bei den Monomeren um vollständig prozessierte Proteinase handelt, ist es sehr wahrscheinlich, daß der Zymogenstatus der β -Trypsase Monomere auf einer bisher unbekanntem strukturellen Veränderung beruht. Um dieses β -

Tryptase-Monomer-Tetramer-Gleichgewicht im Detail zu verstehen und insbesondere die Rolle des Heparins darin zu ergründen, ist die Röntgenstrukturanalyse an β -Tryptase Monomer-Kristallen unumgänglich. β Ia-Tryptase Monomere wurden deshalb in *pichia pastoris* exprimiert, in Analogie zu den Tetrameren aufgereinigt und kristallisiert.

Abbildung 65 zeigt den bisherigen Fortschritt bei den Kristallisationsversuchen.

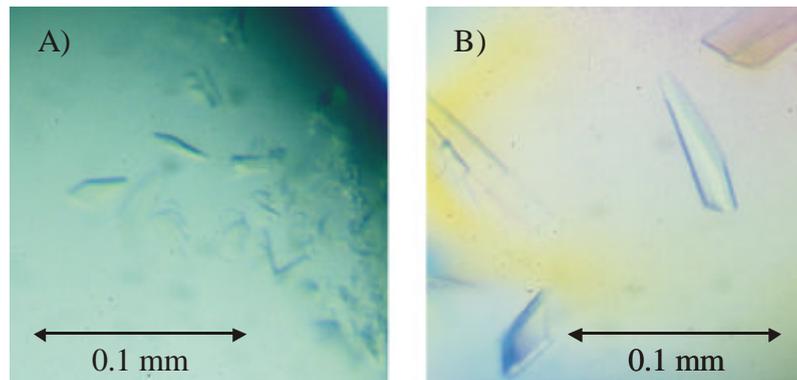


Abb. 65: Fortschritte bei der Kristallisation von β III-Tryptase-Monomeren

Die in den Photos ersichtlichen Kristalle entstanden durch Optimierung der Kristallisationsbedingungen. Teilbild A) zeigt die anfänglich erschienenen, stark verwachsenen Kristalle. Teilbild B) repräsentiert den momentanen Status der Kristallisationsexperimente.

Literaturverzeichnis

- Abbe, E. (1873) Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, **9**, 413-468.
- Adams, P.D., Pannu, N.S., Read, R.J. and Brünger, A.T. (1997) Cross-validated maximum likelihood enhances crystallographic simulated annealing refinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **94**, 5018-5023.
- Adcock, J.J. and Garland, L.G. (1982) Modification of human airway smooth muscle reactivity by drugs, that interfere with arachidonic acid metabolism. *British Journal of Pharmacology*, **77**, 570.
- Addington, A.K. and Johnson, D.A. (1996) Inactivation of human lung trypsin: evidence for a re-activatable tetrameric intermediate and active monomers. *Biochemistry*, **35**, 13511-8.
- Alter, S.C., Kramps, J.A., Janoff, A. and Schwartz, L.B. (1990) Interactions of human mast cell trypsin with biological protease inhibitors. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **276**, 26-31.
- Alter, S.C., Metcalfe, D.D., Bradford, T.R. and Schwartz, L.B. (1987) Regulation of human mast cell trypsin. Effects of enzyme concentration, ionic strength and the structure and negative charge density of polysaccharides. *Biochemical Journal*, **248**, 821-7.
- Baker, D., Bystroff, C., Fletterick, R.J. and Agard, D.A. (1993) PRISM: Topologically constrained phase refinement for macromolecular crystallography. *Acta Crystallography*, **D49**, 429-439.
- Baumgärtner, K.H. (1830) Beobachtungen über die Nerven und das Blut, Grosse: Freiburg.
- Benatar, S.R. (1986) Medical Progress: Fatal Asthma. *New England Journal of Medicine*, **314**, 423.
- Bernal, J.D. and Crowford, D. (1934) X-ray photograph of crystallized pepsin. *Nature (London)*, **133**, 794-795.
- Blair, R.J., Meng, H., Marchese, M.J., Ren, S., Schwartz, L.B., Tonnesen, M.G. and Gruber, B.L. (1997) Human mast cells stimulate vascular tube formation. Trypsin is a novel, potent angiogenic factor. *Journal of Clinical Investigation*, **99**, 2691-700.
- Blessing, R.H. (1987) Data reduction and error analysis for accurate single crystal diffraction analysis. *Crystallographic Reviews*, **1**, 3-58.
- Bode, W. (1979a) [Activation, activity and inhibition of bovine trypsin]. *Naturwissenschaften*, **66**, 251-8.

- Bode, W. (1979b) The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. II. The binding of the pancreatic trypsin inhibitor and of isoleucine-valine and of sequentially related peptides to trypsinogen and to p-guanidinobenzoate-trypsinogen. *Journal of Molecular Biology*, **127**, 357-74.
- Bode, W. and Huber, R. (2000) Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1477**, 241-52.
- Bode, W., Meyer, E., Jr. and Powers, J.C. (1989) Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry*, **28**, 1951-63.
- Bode, W. and Schwager, P. (1975a) The refined crystal structure of bovine beta-trypsin at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. *Journal of Molecular Biology*, **98**, 693-717.
- Bode, W. and Schwager, P. (1975b) The single calcium-binding site of crystallin bovin beta-trypsin. *FEBS Letters*, **56**, 139-43.
- Bode, W., Schwager, P. and Huber, R. (1978) The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **118**, 99-112.
- Bourenkov, G. (2001) Personal Communication.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Bragg, W.L. (1913) The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X-rays. *Proceedings of the Royal Society*, **A89**, 248-277.
- Bravais, A. (1849) Note on polyhedra with symmetric forms. *Journal de Mathematique (Liouville)*, **14**, 137-180.
- Bricogne, G. (1974) Geometric sources of redundancy in intensity data and their use for phase determination. *Acta Crystallography*, **A30**, 395-405.
- Broide, D.H., Eisman, S., Ramsdell, J.W., Ferguson, P., Schwartz, L.B. and Wasserman, S.I. (1990) Airway levels of mast cell-derived mediators in exercise-induced asthma. *American Review of Respiratory Disease*, **141**, 563-8.
- Broide, D.H., Gleich, G.J., Cuomo, A.J., Coburn, D.A., Federman, E.C., Schwartz, L.B. and Wasserman, S.I. (1991) Evidence of ongoing mast cell and eosinophil degranulation in symptomatic asthma airway. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, **88**, 637-48.
- Brown, J.K., Jones, C.A., Tyler, C.L., Ruoss, S.J., Hartmann, T. and Caughey, G.H. (1995) Trypsin-induced mitogenesis in airway smooth muscle cells. Potency, mechanisms, and interactions with other mast cell mediators. *Chest*, **107**, 95S-96S.

- Brünger, A.T. (1992) The Free R Value: a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures. *Nature*, **355**, 462-474.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grossekunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998) Crystallography and NMR system- a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica*, 906-921.
- Brünger, A.T., Krukowski, A. and Erickson, J. (1990) Slow-Cooling Protocols for Crystallographic Refinement by Simulated Annealing. *Acta Crystallographica*, **A46**, 585-593.
- Buckley, M.G., Walters, C., Wong, W.M., Cawley, M.I., Ren, S., Schwartz, L.B. and Walls, A.F. (1997) Mast cell activation in arthritis: detection of alpha- and beta-tryptase, histamine and eosinophil cationic protein in synovial fluid. *Clinical Science*, **93**, 363-70.
- Buisseret, P.D. (1982) Allergy. *Scientific American*, **247**, 86-95.
- Burgess, L.E., Newhouse, B.J., Ibrahim, P., Rizzi, J., Kashem, M.A., Hartman, A., Brandhuber, B.J., Wright, C.D., Thomson, D.S., Vigers, G.P. and Koch, K. (1999) Potent selective nonpeptidic inhibitors of human lung tryptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 8348-52.
- Cairns, J.A. and Walls, A.F. (1996) Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *Journal of Immunology*, **156**, 275-83.
- Castells, M.C., Irani, A.M. and Schwartz, L.B. (1987) Evaluation of human peripheral blood leukocytes for mast cell tryptase. *Journal of Immunology*, **138**, 2184-9.
- Caughey, G.H., Raymond, W.W., Bacci, E., Lombardy, R.J. and Tidwell, R.R. (1993) Bis(5-amidino-2-benzimidazolyl)methane and related amidines are potent, reversible inhibitors of mast cell tryptases. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, **264**, 676-82.
- Caughey, G.H., Raymond, W.W., Blount, J.L., Hau, L.W., Pallaoro, M., Wolters, P.J. and Verghese, G.M. (2000) Characterization of human gamma-tryptases, novel members of the chromosome 16p mast cell tryptase and prostatic gene families. *Journal of Immunology*, **164**, 6566-75.
- Chung, K.F., Aizawa, H. and Leikauf, G.D. (1986) Airway hyperresponsiveness induced by platelet-activating-factor: role of thromboxane generation. *Journal of Pharmacological Experimental Therapy*, **236**, 580.
- Clark, J.M., Abraham, W.M., Fishman, C.E., Forteza, R., Ahmed, A., Cortes, A., Warne, R.L., Moore, W.R. and Tanaka, R.D. (1995) Tryptase inhibitors block allergen-induced airway and inflammatory responses in allergic sheep. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, **152**, 2076-83.

- Clark, J.M., Moore, W.R. and Tanaka, R.D. (1996) Trypsin inhibitors: a new class of inflammatory drugs. *Drugs Future*, **21**, 811-816.
- Collaborative Computational Project, N. (1994) The CCP4 suite: programs for crystallography. *Acta Crystallography*, **D 50**, 157-163.
- Combrink, K.D., Gulgeze, H.B., Meanwell, N.A., Pearce, B.C., Zulan, P., Bisacchi, G.S., Roberts, D.G., Stanley, P. and Seiler, S.M. (1998) 1,2-Benzisothiazol-3-one 1,1-dioxide inhibitors of human mast cell tryptase. *Journal of Medicinal Chemistry*, **41**, 4854-60.
- Cregar, L., Elrod, K.C., Putnam, D. and Moore, W.R. (1999) Neutrophil myeloperoxidase is a potent and selective inhibitor of mast cell tryptase. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **366**, 125-30.
- Cromlish, J.A., Seidah, N.G., Marcinkiewicz, M., Hamelin, J., Johnson, D.A. and Chretien, M. (1987) Human pituitary tryptase: molecular forms, NH₂-terminal sequence, immunocytochemical localization, and specificity with prohormone and fluorogenic substrates. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 1363-73.
- Crothers, D.M. and Metzger, H. (1972) The influence of polyvalency on the binding properties of antibodies. *Immunochemistry*, **9**, 341-357.
- Crowford, D. (1935) X-ray single photographs of insulin. *Nature (London)*, **135**, 591-592.
- Dery, O. and Bunnett, N.W. (1999) Proteinase-activated receptors: a growing family of heptahelical receptors for thrombin, trypsin and tryptase. *Biochemical Society Transactions*, **27**, 246-54.
- Doublet, S. (1997) Preparation of Selenomethionyl proteins for phase determination. *Methods Enzymology*, **276**, 523-530.
- Drenth, J. (1999) Principles of Protein X-ray Crystallography. 2. Auflage, Springer-Verlag, New York.
- Dvorak, A.M., Dvorak, H.F. and Galli, S.J. (1983) Ultrastructural criteria for identification of mast cells and basophils in humans, guinea pigs and mice. *American Reviews of Respiratory Disorders*, **128**, 49.
- Dvorak, A.M., Monahan, R.A., Osage, J.E. and Dickersin, G.R. (1980a) Crohn's disease: transmission electron microscope studies. II. Immunologic inflammatory response. Alteration of mast cells, basophils, eosinophils and the microvasculature. *Human Pathology*, **11**, 606.
- Dvorak, A.M., Newball, H.H., Dvorak, H.F. and Lichtenstein, L.M. (1980b) Antigen-induced IgE-mediated degranulation of human basophils. *Laboratory Investigations*, **43**, 126.
- Edman, P. and Begg, G. (1967) A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry*, **1**, 80-91.

- Ehrlich, P. (1878) Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. *Doktorarbeit, Universität Leipzig*.
- Ehrlich, P. (1879) Über die spezifischen Granulationen des Blutes. *Archives Anatomie Physiologie*, **Abt.**, 571.
- Elrod, K.C., Moore, W.R., Abraham, W.M. and Tanaka, R.D. (1997) Lactoferrin, a potent tryptase inhibitor, abolishes late-phase airway responses in allergic sheep. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, **156**, 375-81.
- Engh, R. and Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallography A*, **47**.
- Erba, F., Fiorucci, L., Pascarella, S., Menegatti, E., Ascenzi, P. and Ascoli, F. (2001) Selective inhibition of human mast cell tryptase by gabexate mesylate, an antiproteinase drug. *Biochemical Pharmacology*, **61**, 271-6.
- Esnouf, R. (2000) Robert Esnouf's extension to *MolScript* version 1.4. <http://lmb.biop.ox.ac.uk/bobscript/index.html>.
- Ewald, P.P. (1913) Zur Theorie der Interferenzen der Röntgenstrahlen in Kristallen. *Physikalische Zeitung*, **14**, 465-472.
- Finzel, B.C. (1993) Software for macromolecular crystallography: a user's overview. *Current Opinion in Structural Biology*, **3**.
- Fiorucci, L., Erba, F. and Ascoli, F. (1992) Bovine tryptase: purification and characterization. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **373**, 483-90.
- Fiorucci, L., Erba, F., Falasca, L., Dini, L. and Ascoli, F. (1995) Localization and interaction of bovine pancreatic trypsin inhibitor and tryptase in the granules of bovine mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1243**, 407-13.
- Friedrich, W., Knipping, P. and Laue, M. (1912) Interferenz-Erscheinungen bei Röntgenstrahlungen. *Sitzungsberichte der mathematisch-physikalischen Klasse der königlich bayerischen Akademien der Wissenschaften zu München*, 302-322.
- Galli, J.G. and Lichtenstein, L.M. (1988) Biology of mast cells and basophils. in *Allergy, Principles and Practice*, The C.V. Mosby Company, Middleton, E. Jr., editor, **1**, 106-134.
- Galli, S.J., Dvorak, A.M. and Dvorak, H.F. (1983) Morphology, biochemistry and function of basophils. In *Williams, W.J., Beutle, E., Erslev, A.J. and Lichtmann, M.A., editors : Haematology 3, ed. 3, New York, McGraw-Hill Book Co.*, 820.
- Galli, S.J., Dvorak, A.M. and Dvorak, H.F. (1984) Basophils and mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns and function. *Progress in Allergy*, **34**, 1.
- Goldstein, S.M., Leong, J., Schwartz, L.B. and Cooke, D. (1992) Protease composition of exocytosed human skin mast cell protease-proteoglycan complexes. Tryptase resides

- in a complex distinct from chymase and carboxypeptidase. *Journal of Immunology*, **148**, 2475-82.
- Green, D.W., Ingram, V.M. and Perutz, M.F. (1954) The structure of hemoglobin, IV. Sign detection by the isomorphous replacement method. *Proceedings of the Royal Society London*, **A225**, 287-307.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. and Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature (London)*, **386**, 463-471.
- Gruber, B.L., Marchese, M.J., Suzuki, K., Schwartz, L.B., Okada, Y., Nagase, H. and Ramamurthy, N.S. (1989) Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *Journal of Clinical Investigation*, **84**, 1657-62.
- Gruber, B.L., Schwartz, L.B., Ramamurthy, N.S., Irani, A.M. and Marchese, M.J. (1988) Activation of latent rheumatoid synovial collagenase by human mast cell tryptase. *Journal of Immunology*, **140**, 3936-42.
- Harvima, I.T., Schechter, N.M., Harvima, R.J. and Fraki, J.E. (1988) Human skin tryptase: purification, partial characterization and comparison with human lung tryptase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **957**, 71-80.
- He, S., Gaca, M.D. and Walls, A.F. (1998) A role for tryptase in the activation of human mast cells: modulation of histamine release by tryptase and inhibitors of tryptase. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, **286**, 289-97.
- He, S., Peng, Q. and Walls, A.F. (1997) Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *Journal of Immunology*, **159**, 6216-25.
- He, S. and Walls, A.F. (1997) Human mast cell tryptase: a stimulus of microvascular leakage and mast cell activation. *European Journal of Pharmacology*, **328**, 89-97.
- Hensch, P.S., Kendall, E.C., Slocumb, C.H. and Polley, H.F. (1949) The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocortisone; compound E) and of pituitary adenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic*, **28**, 181.
- Hessel, J.F.C. (1830) Krystallometrie oder Krystallonomie und Krystallographie. *Gehler's Physikalisches Wörterbuch*, **5**, 1023-1360.
- Hoppe, W. (1957) Die Faltmolekülmethode: Eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen. *Acta Crystallographica*, **10**, 750-751.
- Hoppe-Seyler. (1877) Physiologische Chemie. *Zeitschrift für physiologische Chemie*, Berlin.
- Hopsu, V.K. and Glenner, G.G. (1963) *Journal of Cellular Biology*, **17**, 503.

- Huang, C., Li, L., Krilis, S.A., Chanasyk, K., Tang, Y., Li, Z., Hunt, J.E. and Stevens, R.L. (1999) Human tryptases alpha and beta/II are functionally distinct due, in part, to a single amino acid difference in one of the surface loops that forms the substrate-binding cleft. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 19670-6.
- Huang, C., Morales, G., Vagi, A., Chanasyk, K., Ferrazzi, M., Burklow, C., Qiu, W.T., Feyfant, E., Sali, A. and Stevens, R.L. (2000) Formation of enzymatically active, homotypic, and heterotypic tetramers of mouse mast cell tryptases. Dependence on a conserved Trp-rich domain on the surface. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 351-8.
- Huang, R., Abrink, M., Gobl, A.E., Nilsson, G., Aveskogh, M., Larsson, L.G., Nilsson, K. and Hellman, L. (1993) Expression of a mast cell tryptase in the human monocytic cell lines U-937 and Mono Mac 6. *Scandinavian Journal of Immunology*, **38**, 359-67.
- Huber, R. (1965) Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Crystallographica*, **19**, 353-356.
- Huber, R., Epp, O. and Formanek, H. (1969) The 2.8 Å resolution fourier synthesis of the insect hemoglobin erythrocrucorin. *Acta Crystallographica*, **A25**, 15-28.
- Huber, R., Formanek, H. and Epp, O. (1968) Die Kristallstrukturanalyse von erythrocrucorin (Chironomus Thummi). *Naturwissenschaften*, **55**, 75-77.
- Humphries, D.E., Wong, G.W., Friend, D.S., Gurish, M.F., Qiu, W.T., Huang, C., Sharpe, A.H. and Stevens, R.L. (1999) Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature*, **400**, 769-72.
- Jencks, W.P. (1980) The utilization of binding energy in coupled vectorial processes. *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology*, **51**, 75-106.
- Jencks, W.P. (1981) On the attribution and additivity of binding energies. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78**, 4046-4050.
- Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V. and Mann, M. (1997) Delayed extraction improves specificity in database searches by MALDI peptide maps. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, **68**, 850-858.
- Johnson, P.R., Ammit, A.J., Carlin, S.M., Armour, C.L., Caughey, G.H. and Black, J.L. (1997) Mast cell tryptase potentiates histamine-induced contraction in human sensitized bronchus. *European Respiratory Journal*, **10**, 38-43.
- Jones, T.A., Zou, J.Y. and Cowan, S.W. (1991) Improved Method for Building Protein Models in Electron Density Maps and the Location of Errors in these Models. *Acta Crystallography*, **A47**, 110-119.
- Juhlin, L. (1963) Basophil leukocyte differential in blood and bone marrow. *Acta Haematology*, **29**, 89.

- Jung, K.-S., Cairns, J.A., Church, M.K., Shute, J.K. and Walls A.F. (1994) Clin. Exp. Allergy 24, A. (1994) Human mast cell tryptase can induce eosinophil chemotaxis and secretion. *Clin. Exp. Allergy*, **24**, 988A.
- Kawanami, O., Ferrans, V.J., Fulmer, J.D. and Crystal, R.G. (1979) Ultrastructure of pulmonary mast cells in patients with fibrotic lung disease. *Laboratory Investigations*, **49**.
- Kendrew, J.C., Dickerson, R.E., Strandberg, B.E., Hart, R.C. and Davies, D.R. (1960) Structure of myoglobin; a three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, **185**, 422-427.
- Kepler, J. (1611) *Strena seu de Nive Sexangula*, English translation in Silverman, J.S.A. : A New Year's present in hexagonal snow (1977). *Crystal Form and Structure*, 16-17.
- Kido, H., Fukusen, N., Katunuma, N., Morita, T. and Iwanaga, S. (1985) Tryptase from rat mast cells converts bovine prothrombin to thrombin. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **132**, 613-9.
- Kido, H., Yokogoshi, Y. and Katunuma, N. (1988) Kunitz-type protease inhibitor found in rat mast cells. Purification, properties, and amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 18104-7.
- Kircher, A. (1646) *Ars magna lucis et umbrae*.
- Kleiner, D.E. and Stetler Stevenson, W.G. (1994) Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases. *Analytical Biochemistry*, **218**.
- Kleywegt, G.J. and Read, R.J. (1997) Not your average density. *Structure*, **5**, 1557-1569.
- Koch, R. (1891) Fortsetzung der Mittheilungen über ein Heilmittel gegen Tuberculose. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, **9**, 101-102.
- Kozik, A., Moore, R.B., Potempa, J., Imamura, T., Rapala-Kozik, M. and Travis, J. (1998) A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites. Diverse effects of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikreins on native and oxidized kininogens. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 33224-9.
- Kraulis, P.J. (1991) MOLSCRIPT: A Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography*, **24**, 946-950.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamzin, V.S. and Wilson, K.S. (1997) Automated Refinement for Protein Crystallography. *Methods Enzymology*, **277**, 269-305.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W. and Thornton, J.M. (1998) Validation of protein models derived from experiment. *Current Opinion in Structural Biology*, **8**, 631-639.
- Leslie, A.G.W. (1991) MOSFLM (SERC Laboratory, Daresbury, Warrington, U.K.). .

- Li, L., Li, Y., Reddel, S.W., Cherrian, M., Friend, D.S., Stevens, R.L. and Krilis, S.A. (1998) Identification of basophilic cells that express mast cell granule proteases in the peripheral blood of asthma, allergy, and drug-reactive patients. *Journal of Immunology*, **161**, 5079-86.
- Lichtenstein, L.M. (1988) Allergie und Immunsystem. *Spektrum der Wissenschaft, Immunabwehr*, 110-119.
- Lilja, H. (1997) Prostate-specific antigen: molecular forms and the human kallikrein gene family. *British Journal of Urology*, **79**, 44-8.
- Lindstedt, K.A., Kokkonen, J.O. and Kovanen, P.T. (1998) Regulation of the activity of secreted human lung mast cell tryptase by mast cell proteoglycans. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1425**, 617-27.
- Loeffler, F. (1884) Untersuchungen über die Bedeutung von Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie beim Menschen, bei der Taube und beim Kalbe. *Mittheilungen an das Kaiserliche Gesundheitsamte*, **2**, 421-499.
- Lutzelschwab, C., Pejler, G., Aveskogh, M. and Hellman, L. (1997) Secretory granule proteases in rat mast cells. Cloning of 10 different serine proteases and a carboxypeptidase A from various rat mast cell populations. *Journal of Experimental Medicine*, **185**, 13-29.
- Mammen, M., Choi, S.-K. and Whitesides, G.M. (1998) Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition English*, **37**, 2755-2794.
- Matschiner, G. (1998) Dissertation, Ludwig-Maximilians Universität München. .
- Matsumoto, R., Sali, A., Ghildyal, N., Karplus, M. and Stevens, R.L. (1995) Packaging of proteases and proteoglycans in the granules of mast cells and other hematopoietic cells. A cluster of histidines on mouse mast cell protease 7 regulates its binding to heparin serglycin proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 19524-31.
- Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology*, **33**, 491-497.
- McEuen, A.R., He, S., Brander, M.L. and Walls, A.F. (1996) Guinea pig lung tryptase. Localisation to mast cells and characterisation of the partially purified enzyme. *Biochemical Pharmacology*, **52**, 331-40.
- McNeil, H.P., Austen, K.F., Somerville, L.L., Gurish, M.F. and Stevens, R.L. (1991) Molecular cloning of the mouse mast cell protease-5 gene. A novel secretory granule protease expressed early in the differentiation of serosal mast cells. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 20316-22.
- McNeil, H.P., Reynolds, D.S., Schiller, V., Ghildyal, N., Gurley, D.S., Austen, K.F. and Stevens, R.L. (1992) Isolation, characterization, and transcription of the gene encoding mouse mast cell protease 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 11174-8.

- McPherson. (1991) Preparation and Analysis of Crystal Growth. *John Wiley Co., New York*.
- McRee, D.E. (1993) Practical Protein Crystallography. *Academic press, San Diego*.
- Merritt, E.A. and Bacon, D.J. (1997) Raster3D Photorealistic Molecular Graphics. *Methods in Enzymology*, **277**, 505-527.
- Metcalf, D.D., Kaliner, M. and Donlon, M.A. (1981) The mast cell. *CRC Critical Reviews Immunology*, **2**, 23.
- Michel, H. (1990) Crystallization of Membrane Proteins. *CRC Press, Orlando*.
- Mirza, H., Schmidt, V.A., Derian, C.K., Jesty, J. and Bahou, W.F. (1997) Mitogenic responses mediated through the proteinase-activated receptor-2 are induced by expressed forms of mast cell alpha- or beta-tryptases. *Blood*, **90**, 3914-22.
- Molinari, J.F., Scuri, M., Moore, W.R., Clark, J., Tanaka, R. and Abraham, W.M. (1996) Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, **154**, 649-53.
- Murakumo, Y., Ide, H., Itoh, H., Tomita, M., Kobayashi, T., Maruyama, H., Horii, Y. and Nawa, Y. (1995) Cloning of the cDNA encoding mast cell tryptase of Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*, and its preferential expression in the intestinal mucosa. *Biochemical Journal*, **309**, 921-6.
- Navaza, J., Panepucci, E.H. and Martin, C. (1998) On the use of strong Patterson function signals in many-body molecular replacement. *Acta Crystallography, Biological Crystallography*, **D 54**, 817-821.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. and Honig, B. (1993) Grasp: graphical representation and analysis of surface properties. *Biophysical Journal*, **64**.
- Ono, S., Kuwahara, S., Takeuchi, M., Sakashita, H., Naito, Y. and Kondo, T. (1999) Syntheses and evaluation of amidinobenzofuran derivatives as tryptase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **9**, 3285-90.
- Page, M.I. and Jencks, W.P. (1971) Entropic contributions to rate accelerations in enzymic and intramolecular reactions and the chelate effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **68**, 1678-83.
- Pallaoro, M., Fejzo, M.S., Shayesteh, L., Blount, J.L. and Caughey, G.H. (1999) Characterization of genes encoding known and novel human mast cell tryptases on chromosome 16p13.3. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 3355-62.
- Patterson, A.L. (1934) A Fourier Series Method for the determination of the Components of Interatomic Distances in Crystals. *Physical Reviews*, **46**, 372-376.
- Pemberton, A.D., McAleese, S.M., Huntley, J.F., Collie, D.D., Scudamore, C.L., McEuen, A.R., Walls, A.F. and Miller, H.R. (2000) cDNA sequence of two sheep mast cell

- tryptases and the differential expression of tryptase and sheep mast cell proteinase-1 in lung, dermis and gastrointestinal tract. *Clinical & Experimental Allergy*, **30**, 818-32.
- Pereira, P.J., Bergner, A., Macedo-Ribeiro, S., Huber, R., Matschiner, G., Fritz, H., Sommerhoff, C.P. and Bode, W. (1998) Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore. *Nature*, **392**, 306-11.
- Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G. and North, A. (1960) Structure of hemoglobin; a three dimensional fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, **185**, 416-422.
- Piechottka, G. (2001) Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Plugrath, J.W. (1992) Development in X-ray detectors. *Current Opinion in Structural Biology*, **2**, 811-815.
- Porter, A.B. (1906) On the diffraction theory of microscopic vision. *Phil. Mag.*, **11**, 154-166.
- Portier, P. and Richet, C. (1902) De l'action anaphylactique de certains venins. *Comptes Rendus la Societe de Biologie*, **54**, 170-172.
- Proud, D., Siekierski, E.S. and Bailey, G.S. (1988) Identification of human lung mast cell kininogenase as tryptase and relevance of tryptase kininogenase activity. *Biochemical Pharmacology*, **37**, 1473-80.
- Ramachandran, G.N. and Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, **23**, 283-437.
- Reichert, E.T. and Brown, A.P. (1909) The Differentiation and Specificity of Corresponding Proteins and other vital substances in Relation to Biological Classification and Organic Evolution: The Crystallography of Hemoglobin. *Publication No. 116. Carnegie Institute of Washington, Washington D.C.*
- Ren, S., Sakai, K. and Schwartz, L.B. (1998) Regulation of human mast cell beta-tryptase: conversion of inactive monomer to active tetramer at acid pH. *Journal of Immunology*, **160**, 4561-9.
- Renatus, M., Engh, R.A., Stubbs, M.T., Huber, R., Fischer, S., Kohnert, U. and Bode, W. (1997) Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *EMBO Journal*, **16**, 4797-805.
- Renoux, M., Hilliquin, P., Galoppin, L., Florentin, I. and Menkes, C.J. (1996) Release of mast cell mediators and nitrites into knee joint fluid in osteoarthritis--comparison with articular chondrocalcinosis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis & Cartilage*, **4**, 175-9.
- Rhodes, G. (1993) Crystallography made crystal clear: A guide for users of macromolecular models. *Academic Press, San Diego*.
- Rice, K.D., Gangloff, A.R., Kuo, E.Y., Dener, J.M., Wang, V.R., Lum, R., Newcomb, W.S., Havel, C., Putnam, D., Cregar, L., Wong, M. and Warne, R.L. (2000a) Dibasic

- inhibitors of human mast cell tryptase. Part 1: synthesis and optimization of a novel class of inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **10**, 2357-60.
- Rice, K.D., Tanaka, R.D., Katz, B.A., Numerof, R.P. and Moore, W.R. (1998) Inhibitors of tryptase for the treatment of mast cell-mediated diseases. *Current Pharmaceutical Design*, **4**, 381-96.
- Rice, K.D., Wang, V.R., Gangloff, A.R., Kuo, E.Y., Dener, J.M., Newcomb, W.S., Young, W.B., Putnam, D., Cregar, L., Wong, M. and Simpson, P.J. (2000b) Dibasic inhibitors of human mast cell tryptase. Part 2: structure-activity relationships and requirements for potent activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **10**, 2361-6.
- Röntgen, W.C. (1895) Über eine neue Art von Strahlen. *Sitzungsberichte der Physikalisch-Medizinischen Gesellschaft zu Würzburg*, 132-141.
- Rossi, G.L. and Olivieri, D. (1997) Does the mast cell still have a key role in asthma? *Chest*, **112**, 523-9.
- Rossmann, M.G. and Blow, D.M. (1962) The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallographica*, **15**, 24-31.
- Ruoss, S.J., Hartmann, T. and Caughey, G.H. (1991) Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation*, **88**, 493-9.
- Sakaguchi, M., Takai, S., Jin, D., Yamada, M. and Miyazaki, M. (2000) Characteristics of monkey tryptase purified from cheek pouch vascular tissues. *Japanese Journal of Pharmacology*, **84**, 375-80.
- Sakai, K., Ren, S. and Schwartz, L.B. (1996) A novel heparin-dependent processing pathway for human tryptase. Autocatalysis followed by activation with dipeptidyl peptidase I. *Journal of Clinical Investigation*, **97**, 988-95.
- Sayre, D. (1974) Least-squares refinement. *Acta Crystallography*, **A30**, 180-184.
- Schaschke, N., Assfalg-Machleidt, I., Machleidt, W., Lassleben, T., Sommerhoff, C.P. and Moroder, L. (2000) Beta-cyclodextrin/epoxysuccinyl peptide conjugates: a new drug targeting system for tumor cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **10**, 677-80.
- Schaschke, N., Matschiner, G., Zettl, F., Marquardt, U., Bergner, A., Bode, W., Sommerhoff, C.P. and Moroder, L. (2001) Bivalent inhibition of human beta-tryptase. *Chemistry & Biology*, **8**, 313-327.
- Schechter, N.M., Eng, G.Y. and McCaslin, D.R. (1993) Human skin tryptase: kinetic characterization of its spontaneous inactivation. *Biochemistry*, **32**, 2617-25.
- Schechter, N.M., Eng, G.Y., Selwood, T. and McCaslin, D.R. (1995) Structural changes associated with the spontaneous inactivation of the serine proteinase human tryptase. *Biochemistry*, **34**, 10628-38.

- Schechter, N.M., Slavin, D., Fetter, R.D., Lazarus, G.S. and Fraki, J.E. (1988) Purification and identification of two serine class proteinases from dog mast biochemically and immunologically similar to human proteinases tryptase and chymase. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **262**, 232-44.
- Schleimer, R.P., Schulman, E.S. and MacGlashan, D.W. (1983) Effects of dexamethasone on mediator release from human lung fragments and purified human lung mast cells. *Journal of Clinical Investigation*, **71**, 1830.
- Schwartz, L.B. (1990) Tryptase from human mast cells: biochemistry, biology and clinical utility. *Monographs in Allergy*, **27**, 90-113.
- Schwartz, L.B. (1995) *Mast cell tryptase: properties and roles in human allergic responses. In: Caughey G.M. editor. Mast cell proteases in immunology and biology, New York: Marcel Dekker, 9-23.*
- Schwartz, L.B. and Austen, K.F. (1980) Enzymes of the mast cell granule. *Journal of Investigative Dermatology*, **74**, 349-53.
- Schwartz, L.B. and Bradford, T.R. (1986) Regulation of tryptase from human lung mast cells by heparin. Stabilization of the active tetramer. *Journal of Biological Chemistry*, **261**, 7372-9.
- Schwartz, L.B., Lewis, R.A. and Austen, K.F. (1981) Tryptase from human pulmonary mast cells. Purification and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, **256**, 11939-43.
- Schwartz, L.B., Sakai, K., Bradford, T.R., Ren, S., Zweiman, B., Worobec, A.S. and Metcalfe, D.D. (1995) The alpha form of human tryptase is the predominant type present in blood at baseline in normal subjects and is elevated in those with systemic mastocytosis. *Journal of Clinical Investigation*, **96**, 2702-10.
- Selwood, T., McCaslin, D.R. and Schechter, N.M. (1998) Spontaneous inactivation of human tryptase involves conformational changes consistent with conversion of the active site to a zymogen-like structure. *Biochemistry*, **37**, 13174-83.
- Selye, H. (1965) The mast cells. *Buttersworth, Washington*.
- Sherwood, D. (1976) Crystals, X-rays and Proteins. *Longman Group Limited*.
- Smith, K.A. (1980) T-Cell Growth Factor. *Immunological Reviews*, **51**, 337.
- Smith, T.J., Hougland, M.W. and Johnson, D.A. (1984) Human lung tryptase. Purification and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 11046-51.
- Sommerhoff, C.P., Bode, W., Matschiner, G., Bergner, A. and Fritz, H. (2000) The human mast cell tryptase tetramer: a fascinating riddle solved by structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1477**, 75-89.
- Sommerhoff, C.P., Sollner, C., Mentele, R., Piechottka, G.P., Auerswald, E.A. and Fritz, H. (1994) A Kazal-type inhibitor of human mast cell tryptase: isolation from the medical

- leech *Hirudo medicinalis*, characterization, and sequence analysis. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **375**, 685-94.
- Spike, C.G. and Parry, R.W. (1953) Thermodynamics of chelation: 1. The statistical factor in chelate ring formation. *Journal of the American Chemical Society*, **75**, 2726-2729.
- Stout, G.H. and Jensen, L.H. (1989) X-ray Structure Determination. *John Wiley & Sons, New York*.
- Stubbs, M.T., Morenweiser, R., Sturzebecher, J., Bauer, M., Bode, W., Huber, R., Piechotka, G.P., Matschiner, G., Sommerhoff, C.P., Fritz, H. and Auerswald, E.A. (1997) The three-dimensional structure of recombinant leech-derived tryptase inhibitor in complex with trypsin. Implications for the structure of human mast cell tryptase and its inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 19931-7.
- Sturzebecher, J., Prasa, D. and Sommerhoff, C.P. (1992) Inhibition of human mast cell tryptase by benzamidine derivatives. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **373**, 1025-30.
- Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M. and Kobayashi, K. (1999) Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering*, **12**, 439-446.
- Sumner, J.B. (1926) The isolation and crystallization of the enzyme urease. *Journal of Biological Chemistry*, **69**, 435-441.
- Survey, N.H.I. (1996) *National Center for Health Statistics*.
- Swanson, S.M. (1994) Core tracing: Depicting connections between features in electron density. *Acta Crystallographica*, **D50**, 695-708.
- Tam, E.K. and Caughey, G.H. (1990) Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology*, **3**, 27-32.
- Thomas, V.A., Wheelless, C.J., Stack, M.S. and Johnson, D.A. (1998) Human mast cell tryptase fibrinogenolysis: kinetics, anticoagulation mechanism, and cell adhesion disruption. *Biochemistry*, **37**, 2291-8.
- Travis, J. (1986) Target enzymes for plasma proteinase inhibitors. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, **24**, 117-24.
- Travis, J. and Salvesen, G.S. (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*, **52**, 655-709.
- Turk, D. (1992) Weiterentwicklung eines Programmes für Molekülgrafik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. *Ph.D. Thesis, Technische Universität München, Germany*.
- Walls, A.F. (2000) Structure and function of human mast cell tryptase. *Marone, G., Editor, Mast Cells and Basophils, Academic Press, New York*, 291-309.

- Walls, A.F., Brain, S.D., Desai, A., Jose, P.J., Hawkins, E., Church, M.K. and Williams, T.J. (1992) Human mast cell tryptase attenuates the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide. *Biochemical Pharmacology*, **43**, 1243-8.
- Walls, A.F., He, S., Teran, L.M., Buckley, M.G., Jung, K.S., Holgate, S.T., Shute, J.K. and Cairns, J.A. (1995) Granulocyte recruitment by human mast cell tryptase. *International Archives of Allergy & Immunology*, **107**, 372-3.
- Wang, B.C. (1985) Resolution of Phase Ambiguity in Macromolecular Crystallography. *Methods enzymology*, **115**, 492-500.
- Welle, M.M., Audige, L. and Belz, J.P. (1997) The equine endometrial mast cell during the puerperal period: evaluation of mast cell numbers and types in comparison to other inflammatory changes. *Veterinary Pathology*, **34**, 23-30.
- Wenzel, S.E., Fowler, A.A., 3rd and Schwartz, L.B. (1988) Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. In vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma. *American Review of Respiratory Disease*, **137**, 1002-8.
- Wong, G.W., Tang, Y., Feyfant, E., Sali, A., Li, L., Li, Y., Huang, C., Friend, D.S., Krilis, S.A. and Stevens, R.L. (1999) Identification of a new member of the tryptase family of mouse and human mast cell proteases which possesses a novel COOH-terminal hydrophobic extension. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 30784-93.
- Wright, C.D., Havill, A.M., Middleton, S.C., Kashem, M.A., Dripps, D.J., Abraham, W.M., Thomson, D.S. and Burgess, L.E. (1999) Inhibition of allergen-induced pulmonary responses by the selective tryptase inhibitor 1,5-bis-[4-[(3-carbamimidoyl-benzenesulfonylamino)-methyl]-phenoxy]-pentane (AMG-126737). *Biochemical Pharmacology*, **58**, 1989-96.
- Xia, H.Z., Kepley, C.L., Sakai, K., Chelliah, J., Irani, A.M. and Schwartz, L.B. (1995) Quantitation of tryptase, chymase, Fc epsilon RI alpha, and Fc epsilon RI gamma mRNAs in human mast cells and basophils by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Immunology*, **154**, 5472-80.
- Xu, L.R., Carr, M.M., Bland, A.P. and Hall, G.A. (1993) Histochemistry and morphology of porcine mast cells. *Histochemical Journal*, **25**, 516-22.
- Yarush, A.Y. and Dzantiev, B. (1990) *Molecular Immunology*, **27**, 965-971.
- Yong, L.C. (1997) The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. *Experimental & Toxicologic Pathology*, **49**, 409-24.
- Zhang, K.Y.J. and Main, P. (1990) The use of Sayre's equation with solvent flattening and histogram matching for phase extension and refinement of protein structures. *Acta Crystallography*, **A46**, 377-381.
- Zhang, M.Q. and Timmerman, H., p. 311. (1997) Mast cell tryptase and asthma. *Mediators of Inflammation* **6**, 311.