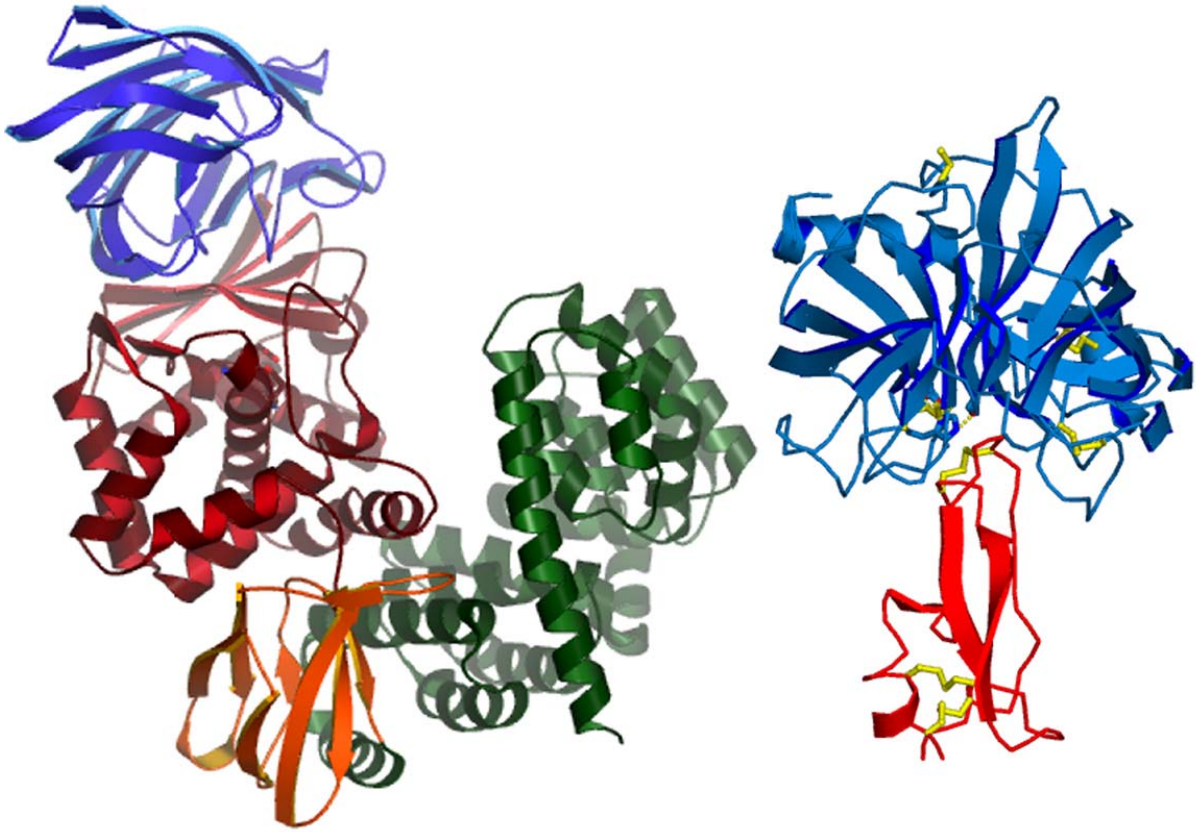
Röntgenstrukturanalyse der humanen Serinprotease DESC-1 und der Zink-Aminopeptidase F3 aus *Thermoplasma acidophilum*



Otto Kyrieleis

Max-Planck-Institut für Biochemie

Abteilung Strukturforschung

82152 Martinsried

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

Röntgenstrukturanalyse der humanen Serinprotease DESC-1 und der Zink-Aminopeptidase F3 aus *Thermoplasma acidophilum*

Otto Kyrieleis

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. Steffen J. Glaser

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. Robert Huber
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher

Die Dissertation wurde am 15.12.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 25.01.2005 angenommen.

Für meine Eltern

Abkürzungverzeichnis

Å	Ångstroem, 1 Å = 10^{-10}m
ACE	*Angiotensin converting enzyme*
ADAM	*a disintegrin-like and metalloproteinase*
APS	Ammoniumproxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	*basical local alignment search tool*
BPTI	basischer Pankreas Trypsin Inhibitor
ClpP	*caseinolytic Clp protease*
CUB	*Cls/Clr, urchin embryonic growth factor and bone m orphogenic protein*
Da	Dalton
ddH_2O	*aqua bidestilata*
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DESC-1	*Differential Expressed in Squamous cell Carcinoma*
ECM	*extra cellular Matrix*
GAG	Glukosaminoglykane
HAT	*Human Airway Trypsin*
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid
LB	Luria Bertani
LDL	*Low density lipoprotein*
LTA4H	Leukotrien A4 Hydrolase
MAD	*Multiple Anomalous Dispersion*
MAM	*meprin, A5 antigen, and receptor protein phosphatase μ*
min	Minute
MIR	multipler isomorpher Ersatz
MMP	Matrixmetalloprotease
MR	*Molecular Replacement*
MT-MMP	*Membrane type Metalloproteases*
Nm	Nanometer
NMR	*Nuclear magnetic Resonance*
OD_x	Optische Dichte bei der Wellenlänge λ = x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	*Plasminogen Activator Receptor*
PEG	Polyethylenglykol
R.m.s.d	*Root mean square Deviation*
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	*rounds per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SEA	*Sea urchin sperm protein-Enterokinase-Agrin*
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRCR	*Scavenger Receptor Cystein-Rich*
TMRSS	*Transmembrane Proteinase Serin*
tPA	*Tissue type Plasminogen Activator*
Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TT-SP	*Type II Transmembrane Serine Protease*
uPA	*Urokinase-type Plasminogen Activator*
VAT	*valosine containing protein-like ATPase from Thermoplasma acidophilum*
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung…… 1
1.1 DESC-1…….. 1
1.2 Der Tricorn Interagierende Faktor F3…… 2
2. Einleitung…….. 4
2.1 Die Bedeutung der Proteasen…… 4
2.2 Die Serinproteasen und deren Inhibitoren……. 6
2.3 Die transmembranen Serinproteasen……. 10
2.4 Die extrazelluläre Matrix……... 15
2.5 DESC-1……. 17
2.6 Die Metalloproteasen…… 18
2.7 Die Gluzinkine…….. 19
2.8 Die proteolytische Kaskade im Modell-Organismus *Thermoplasma acidophilum*……... 20
3. Röntgenstrukturanalyse von Proteinen……. 25
3.1 Überblick……... 25
3.2 Kristallisation von Proteinen……. 25
3.3 Röntgenstrahlung……... 27
3.4 Beugung von Röntgenstrahlen an Einkristallen…… 28
3.5 Datenprozessierung…… 31
3.6 Das Phasenproblem……... 32
3.7 Die Pattersonfunktion…… 32
3.8 Molekularer Ersatz…… 33
3.9 Multiple Anomale Dispersion…… 34
3.10 Modellbau……. 35
3.11 Verfeinerung des Modells……. 35
4. Material und Methoden…….. 37
4.1 Mikrobiologische Methoden……. 37
4.1.1 Medien……... 37
4.1.2 Bakterien…… 38
4.1.3 Transformation von *E. coli* Zellen……. 38
4.1.4 Bakterienkulturen…….. 38
4.1.5 Heterologe Expression von F3……... 39
4.1.6 Aufschluss von *E. coli* Zellen…… 39
4.2 Proteinchemische Methoden…….. 39
4.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen……. 39
4.2.2 Umpufferung…….. 40
4.2.3 Aufkonzentration von Proteinlösungen……. 40
4.2.4 Polyacrylamid Gelelektrophporese ……... 40
4.2.5 Coomassie-Färbung……... 41
4.3 Proteinpräparation…….. 42
4.3.1 Vorbereitung des DESC-1-Benzamidin-Komplexes zur Kristallisation... 42
4.3.2 Herstellung des DESC-1-BPTI-Komplexes…….. 42
4.3.3 Proteineinigung von F3……. 43
4.4 Kristallographische Methoden……... 44
4.4.1 Kristallisation……. 44
4.4.2 Datensammlung……. 44
4.4.3 Transformation der F3-Kristalle…… 45

4.4.4 Auswertung und Datenreduktion…….. 46
4.4.5 Strukturlösung…… 47
4.4.6 Modellbau und Verfeinerung…… 47
4.4.7 Elektronendichtemodifikation……... 48
4.4.8 Modellanalyse und graphische Darstellung……... 48
5. Ergebnisse…… 49
5.1 Kristallstruktur der Serinprotease DESC-1……... 49
5.1.1 Kristallisation von DESC-1 mit Benzamidin und mit BPTI……. 49
5.1.2 Datenaufnahme…….. 49
5.1.3 Phasenbestimmung, Modellbau und Verfeinerung…… 50
5.1.4 Qualität der DESC-1-Strukturen…… 51
5.1.5 Beschreibung der Struktur von DESC-1 mit Benzamidin……. 53
5.1.6 Gesamtstruktur……... 53
5.1.7 Architektur des aktiven Zentrums……. 54
5.1.8 Das aktive Zentrum von DESC-1 und die Substratbindungstaschen…… 56
5.1.9 Beschreibung der Struktur von DESC-1 in Komplex mit BPTI…… 60
5.1.10 Oberflächenanalyse von DESC-1…….. 63
5.2 Diskussion…….. 64
5.2.1 Vergleich der katalytischen Domäne von DESC-1 mit den strukturell bekannten TT-SPs Matriptase, Hepsin und Enteropeptidase…… 64
6. Ergebnisse…… 75
6.1 Kristallstruktur des Tricorn Interagierenden Faktors F3……... 75
6.1.1 Reinigung von F3…….. 75
6.1.2 Kristallisation von F3…… 75
6.1.3 Datenaufnahme und Phasenbestimmung……... 76
6.1.4 Modellbau, Dichtemodifizierung und Verfeinerung……. 78
6.2 Strukturbeschreibung des Tricorn Interagierenden Faktors F3……. 80
6.2.1 BLAST Homologie Suche……. 80
6.2.2 Gesamtstruktur von F3…….. 83
6.2.3 N-terminale Domäne……. 84
6.2.4 Katalytische Domäne II……. 85
6.2.5 Domäne III……. 86
6.2.6 C-terminale Domäne IV…… 87
6.2.7 Das aktive Zentrum von F3……... 91
6.2.8 Vergleich von F3 mit der humanen Aminopeptidase Leukotrien A4 Hydrolase und mit Thermolysin…… 94
6.3 Diskussion…….. 99
7. Literaturverzeichnis…… 109
8. Danksagung……... 115

1. Zusammenfassung

1.1 DESC-1

Die humane Serinprotease DESC-1 gehört zu der Gruppe der transmembranen Serinproteasen des Typs II (TT-SPs). Bei den TT-SPs handelt es sich um Multidomänen-Proteasen, die neben der C-terminalen trypsinartigen Serinprotease-Domäne eine stark variierende Stammregion, eine kurze transmembrane Domäne und eine N-terminale, cytoplasmatische Domäne aufweisen und die in den letzten Jahren aufgrund ihrer Assoziation mit unterschiedlichen Tumorzellen stark an Bedeutung zugenommen haben. DESC-1 wurde zuerst bei der Suche nach neuen Genen entdeckt, die in normalem Epithelium exprimiert werden, aber in wuchernden Karzinomen dieser Zellen im Kopf- und Nackenbereich nicht vorhanden sind. DESC-1-RNA wird nur in gesunden Epithelzellen der Prostata, der Haut, der Hoden und des Kopf- und Nackenbereiches detektiert, während sie in den Zellen von wuchernden Karzinomen im Kopf- und Nackenbereich herunterreguliert oder nicht vorhanden ist. Durch die Herunterregulierung oder vollständige Abwesenheit von DESC-1 in den Zellen dieser Karzinome kann DESC-1 als möglicher, neuer Tumormarker für diese Art von Karzinomen angesehen werden.

Die Röntgenstrukturen der katalytischen Domäne von DESC-1 in Komplex mit Benzamidin und BPTI wurden mit Hilfe der Methode des Molekularen Ersatzes in den Auflösungen von jeweils 1.6 Å und 3.0 Å gelöst.

Wie in allen trypsinartigen Serinproteasen besteht die katalytische Domäne von DESC-1 aus zwei *β-barrel*-Faltblattstrukturen, zwischen denen sich das aktive Zentrum mit den Resten der katalytischen Triade Histidine, Serin und Aspartat befindet. Die S1-Tasche von DESC-1 ähnelt der von Thrombin. Ein Aspartat am Boden dieser Tasche generiert Spezifität für die basischen Seitenketten Lysin und Asparagin wird. Die S2-Tasche von DESC-1 ist strukturell ähnlich ausgestattet wie die von uPa und weist Präferenz für kleine hydrophobe Reste wie Glycin oder maximal Alanin auf. Darüber hinaus besitzt DESC-1 eine weit geöffnete, hydrophobe S3/S4-Tasche, die perfekt geformt ist, um große hydrophobe Reste zu binden. Der Vergleich mit den bisher strukturell bekannten TT-SPs Matriptase, Hepsin und Enteropeptidase zeigt, dass sich DESC-1 deutlich bezüglich seiner Substratspezifität von den anderen TT-SPs unterscheidet, was die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren für die einzelnen TT-SPs zulässt. Die Struktur von DESC-1 in Komplex mit BPTI zeigt, dass das aktive Zentrum von DESC-1 sehr flexibel ist und dass es zugänglich für Kunitz-artige Inhibitoren wie BPTI ist, die möglicherweise auch die proteolytische Aktivität von DESC-1 regulieren. Die Oberflächenanalyse von DESC-1 und

der Vergleich mit der an Hepsin gebundene SRCR-Domäne lassen außerdem den Schluss zu, dass die N-terminale, zur Stammregion gehörende SEA-Domäne von DESC-1 auf der Rückseite der Proteasedomäne starr über eine hydrophobe Oberflächenregion mit ihr verbunden ist und dass die mögliche Funktion dieser Domäne die Positionierung der katalytischen Domäne in der extrazellulären Matrix ist.

1.2 Der Tricorn interagierende Faktor F3

Der Tricorn interagierende Faktor F3 ist eine Zink-Aminopeptidase vom Archaeon *Thermoplasma acidophilum*, die eine molekulare Masse von 89 kDa aufweist. Zusammen mit den Protease-Faktoren F1 und F2 ist F3 für Degradierung der von der Tricornprotease generierten Di-, Tri- und Tetrapetide zu den freien Aminosäuren zuständig und schließt somit den proteolytischen Abbauweg in *Thermoplasma acidophilum* ab.

Die Röntgenstruktur der Aminopeptidase F3 wurde mit der Methode der multiplen anormalen Dispersion (MAD) bei der Auflösung von 2,3 Å gelöst.

F3 ist aus vier Domänen aufgebaut: eine N-terminale, sattelartige geformte Domäne, die hauptsächlich aus β-Faltblättern aufgebaut ist, eine thermolysinartige katalytische Domäne, eine kleine fassartige ebenfalls aus β-Faltblättern bestehende Domäne und eine C-terminale ausschließlich aus α-Helices aufgebaute Domäne. Die relative Anordnung der vier Domänen führt zu der Ausbildung einer tiefen Kluft vor dem aktiven Zentrum von F3 aus.

Aufgrund von drei unterschiedlichen Kristallpackungen war es möglich, F3 in drei unterschiedlichen Konformationen zu erhalten, die sich nur in der Konformation der C-terminalen Domäne unterscheiden, während die anderen drei Domänen nahezu unverändert vorliegen. Die drei unterschiedlichen Konformationen von F3 können als Schnappschüsse der molekularen Dynamik von F3 angesehen werden. Die α-Helices der C-terminalen Domäne, die in einer Superhelix organisiert sind, können unterschiedliche Konformationen einnehmen, so dass eine offene, eine intermediäre und eine fast geschlossenen Konformation von F3 zu beobachten ist.

Die zinkbindenden Liganden von F3 befinden sich in den Motiven <u>H</u>EXX<u>H</u> und N<u>E</u>XFA, die einen Abstand von 18 Aminosäuren zu einander aufweisen und die F3 direkt als Mitglied der Gluzinkine-Familie charakterisiert. Darüber hinaus trägt F3 im aktiven Zentrum zwei Glutamate, deren Funktion die Bindung des Substrat-N-Terminus ist. Der Vergleich mit Thermolysin, insbesondere bezüglich der mechanistisch relevanten Reste,

lässt den Schluss zu, dass F3 für die proteolytische Spaltung seiner Substrate einem ähnlichen Mechanismus verwendet, wie er in Thermolysin zu beobachten ist.
Weiterhin lassen die drei Strukturen von F3 Aussagen darüber zu, wie ein supermolkularer Komplex zwischen der Tricornprotease und F3 zur Substratübergabe aussehen könnte. Die geometrischen Abmessungen des als Substratausgang vermuteten, N-terminalen β6-Propellers der Tricornprotease passen recht gut zu denen der offenen Konformation von F3, so dass eine Substratübergabe von der Tricornprotease in diese Konformation von F3 erfolgen könnte.

2. Einleitung

2.1 Die Bedeutung der Proteasen

In biologischen Systemen katalysieren Enzyme fast alle Reaktionen. Unter den Enzymen nehmen die Proteasen, die Peptidbindungen hydrolisieren und auch als Proteinasen, Peptidasen oder proteolytische Enzyme bezeichnet werden, die größte funktionelle Gruppe ein. Sie machen etwa 2% aller Genprodukte aus, was die Analyse von kompletten Sequenzen einiger Genome ergeben hat. Bisher sind um die 600 Proteasen bekannt, von denen 200 in Säugetieren exprimiert werden, und die Anzahl der neu entdeckten wächst fast täglich (Turk 1999).

Bei ähnlichen Reaktionsmechanismen können die Proteasen die vielfältigsten Funktionen ausführen. Neben der nichtspezifischen Protein-Hydrolyse, wie sie zum Beispiel im Fall der Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin auftritt, können Proteasen auch hoch selektiv und effizient spezifische Substrate hydrolisieren, die zu irreversiblen Entscheidungen auf der post-translatorischen Ebene führen und so viele biologische Prozesse beeinflussen. So spielen z. B. bei der Zell-Zyklus-Regulation, bei der Antigen-Präsentation, bei der Wundheilung, bei der Angiogenese oder bei der Apoptose proteolytische Prozesse eine fundamentale Rolle. Veränderungen sowohl der Struktur als auch des Expressionsmusters der Proteasen liegen vielen pathogenen Prozessen, wie zum Beispiel Krebs, Arthritis, Osteoporose, Alzheimer oder Herz- und Gefäßkrankheiten, zugrunde (Puente et al. 2003).

Die Klassifizierung der Proteasen erfolgt nach ihrem katalytischen Mechanismus. Man unterteilt die Proteasen in fünf Klassen (Vertreter in Klammern): Serinproteasen (Trypsin, Thrombin), Metalloproteasen (MMPs), Aspartatproteasen (CathepsinD, HIV-Protease), Cysteinproteasen (Papain, Caspase 2-9) und Threoninproteasen (Proteasom). Die Namengebung der einzelnen Proteasegruppen ergibt sich aus dem reaktiven Rest im aktiven Zentrum, der für die Reaktion maßgeblich ist. Auf der Basis ihrer primären und tertiären Strukturelemente sowie Ähnlichkeiten im Reaktionsmechanismus erfolgt die Unterteilung der Proteasen in unterschiedliche Familien und Klassen.

Aufgrund der potentiell zerstörerischen Wirkung der Proteasen auf ihre natürliche Umgebung ist es notwendig, dass ihre proteolytische Aktivität sowohl von der Zelle als auch vom gesamten Organismus sorgfältig kontrolliert wird. Die Kontrolle der proteolytischen Aktivität wird durch die Regulation von Expression und Sekretion der

Proteasen, durch die Aktivierung von Proformen der Enzyme (Zymogene) und durch die Blockierung ihrer proteolytischen Aktivität durch Inhibitoren erreicht. Bei der Aktivierung der Proformen wird ein Teil der Peptidkette spezifisch hydrolisiert, um so die aktive Form des Enzyms einzunehmen. Die Anreicherung und die oft sehr hohen Konzentrationen von natürlichen Inhibitoren in Körperflüssigkeiten zeigen, dass die Regulation über Inhibition eine Schlüsselrolle in Zellen, Geweben und Organismen einnimmt. Bei den natürlich vorkommenden Inhibitoren handelt es sich in der Regel um Proteine, von denen viele deutlich größer sind als die Zielproteasen, die sie inhibieren. In den meisten Fällen können die Mitglieder einer spezifischen Inhibitorfamilie Zielproteasen inhibieren, die bezüglich ihres Katalysemechanismus zur gleichen Klasse gehören (Bode and Huber 2000).

Mittlerweile gibt es eine Reihe erfolgreicher Therapien, die auf der spezifischen Bindung von Proteasen an deren Inhibitoren oder an andere Bindungspartner beruhen. So werden zum Beispiel Warfarin und Heparin zur Kontrolle von Blutgerinnseln und Streptokinase und gewebespezifischer Plasminogenaktivator (tPA) zur Beschleunigung der Blutgerinnselauflösung eingesetzt. Ein anderes interessantes Beispiel ist der Einsatz von ACE-Inhibitoren (ACE = angiotensin converting enzyme) zur Behandlung von Bluthochdruck. Die oben aufgeführten Beispiele für erfolgreiche Therapien betreffen die Proteasen der Gerinnungskaskade, aber auch in anderen Protease abhängigen Systemen ist die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien von größter Wichtigkeit. Während die Proteasen abhängigen Systeme der Gerinnung und der Entzündung schon seit längerer Zeit Gegenstand der pharmakologischen Forschung sind, sind in den letzten Jahren weitere interessante und aussichtsreiche Proteasensysteme in den Mittelpunkt der pharmazeutischen Industrie gerückt. Zu diesen gehören zum Beispiel die Proteasen, die an der Umwandlung von Zellen in bösartige Tumorzellen beteiligt sind. Diese Proteasen (Metallo- und Serinproteasen) sind dafür verantwortlich, dass bösartige Tumorzellen die Grenzen des Bindegewebes, das ihr Wachstum begrenzt, übertreten können, um gesundes Gewebe zu befallen und damit zu metastatsieren (Cheronis JC 1993).

Die vorangegangenen Ausführungen zeigen, dass die Forschung an proteolytischen Enzymen auch heute noch zur Grundlagenforschung gezählt werden kann. Die vielfältigen Funktionen der proteolytischen Enzyme in den unterschiedlichsten Organismen zeigen das große Potential dieser größten funktionellen Gruppe von Enzymen bezüglich des Verständnisses der proteolytischen Prozesse sowohl unter normalen physiologischen Bedingungen als auch unter einer Vielzahl von pathologischen Bedingungen. Darüber

hinaus ermöglicht das Verständnis über proteolytische Prozesse der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien und neuer spezifischer Inhibitoren gegen eine Vielzahl von menschlichen Krankheiten.

2.2 Die Serinproteasen und deren Inhibitoren

Fast ein Drittel aller Proteasen können als Serinproteasen klassifiziert werden. Die Serinproteasen tragen ihren Namen aufgrund des nukleophilen Serins im katalytischen Zentrum des Proteins, das die zu spaltende Peptidbindung angreift. Allen Serinproteasen ist darüber hinaus gemein, dass sie die katalytische Tríade aufweisen, die aus Serin, Histidin und Apartat besteht.

Um eine bessere Unterscheidung der großen Anzahl an bekannten Serinproteasen zu ermöglichen, werden die Serinproteasen in einzelne Clans unterteilt. Für die Zuordnung der Serinproteasen zu unterschiedlichen Clans sind sowohl die tertiäre Struktur als auch die Anordnung und die Art der Reste, die die katalytische Triade bilden, ausschlaggebend. Bezüglich der Faltung und der katalytischen Triade sind bisher fünf unterschiedliche Clans bekannt: 1) Serincarboxypeptidase II aus Weizen 2) Serinprotease des humanen Cytomegalovirus 3) ATP-anhängige Serinprotease ClpP 4) Chymotrypsin und 5) Subtilisin. Die angegebenen Serinproteasen sind die Vertreter ihrer Clans, bei denen zum ersten Mal die spezielle Faltung und die Anordnung der katalytischen Triade aufgeklärt wurden. Den mit Abstand größten Clan bilden die trypsinartigen Serinproteasen. Daher beziehen sich auch die folgenden Ausführungen auf diesen Clan. In Abbildung 1a sind der Katalysemechanismus und die Funktion der katalytischen Triade der trypsinartigen Serinproteasen schematisch dargestellt. Histidin übernimmt bei der Katalyse die Funktion eines Wasserstoffdonors, während das Aspartat den Imidazolring des Histidins in der richtigen Orientierung stabilisiert. Die katalytische Triade ist Teil eines Netzwerks von Wasserstoffbrücken, das die Reste der katalytischen Triade so zueinander orientiert, dass die Hydrolisierung der Peptidbindung optimal ablaufen kann (siehe Abbildung 1b). In der ersten Hälfte der Reaktion greift die Hydroxygruppe von Ser^{195} (Chymotrypsin-Nummerierung nach Bode *et al* 1992) (Bode et al. 1992) die Carbonylgruppe des Substrats nukleophil an unter Bildung eines tetraedrischen Zwischenprodukts **2**. Unterstützt wird dieser Angriff durch His^{57}, das als Base das abgespaltene Proton des $Serins^{195}$ aufnimmt. Durch die Ausbildung des tetraedrischen Zwischenprodukts der damit verbundenen Konformationsänderung kann das entstandene Oxyanion eine Position im aktiven Zentrum

des Enzyms besetzen, die als Oxyanion-Loch bezeichnet wird. Das Oxyanion-Loch wird durch die Hauptketten NH-Gruppen von Ser^{195} und Gly^{193} gebildet. Diese Atome formen eine positiv geladene Tasche, welche die Carbonylgruppe des zu spaltenden Peptids aktiviert und die negative Ladung des Oxyanions durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken stabilisiert. Das Imidazolium-Ion, was durch die Protonenaufnahme von Ser^{195} entstanden ist, wird von Asp_{102} über Wasserstoffbrücken stabilisiert. Das tetraedrische Zwischenprodukt zerfällt unter Deprotonierung des Imidazolium-Ions in das Acyl-Enzym-Zwischenprodukt **3**. Die austretende Aminogruppe $R'NH_2$ bildet das neue N-terminale Ende des geschnittenen Peptids und wird durch Wasser aus dem Lösungsmittel ersetzt. Im zweiten Teil der Hydrolyse greift das Wasser das Acyl-Enzym unter Bildung eines weiteren tetraedrischen Zwischenprodukts nukleophil an. Auch dieses Zwischenprodukt zerfällt, wobei zum einen Ser^{195} und zum anderen die Carbonsäure entstehen, die das neue C-terminale Ende des geschnittenen Peptids bildet. Die Protease liegt jetzt wieder im aktiven Zustand vor und kann einen weiteren Hydrolyse-Zyklus durchlaufen.

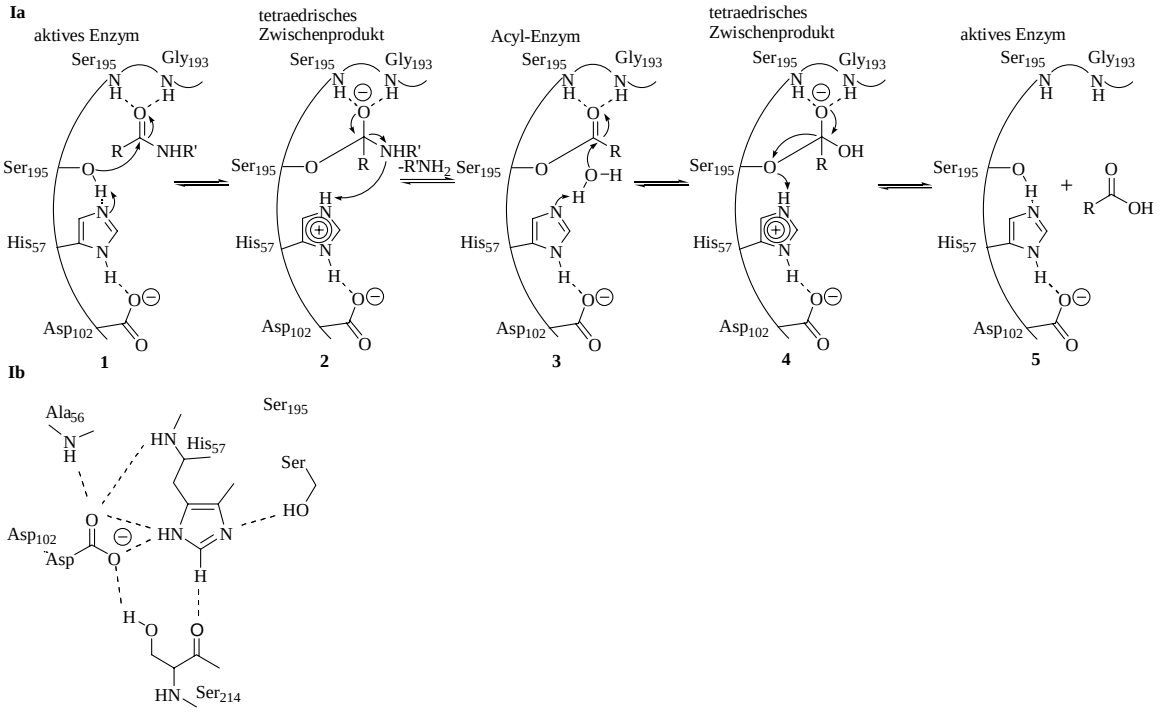


Abbildung 1: **Katalysemechanismus der trypsinartigen Serinproteasen**

a) zeigt den Katalysemechanismus der trypsinartigen Serinproteasen.

b) zeigt das Netzwerk der Wasserstoffbrücken, das die Reste der katalytischen Triade stabilisiert und orientiert, am Beispiel des Chymotrypsin-Eglin-C-Komplexes. Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt.

Die Substratspezifität der trypsinartigen Serinproteasen wird durch die *Substrate Recognition Site*, durch die *Polypeptide Binding Site* und durch die Bindungstaschen für die Seitenketten des polypeptidischen Substrats bestimmt. Ausgehend von der Nomenklatur nach Schlechter und Bergner (Schlechter I 1967) wird die Substratspezifität in erster Linie über die S1/P1 Wechselwirkung bestimmt, wobei Sn die Bindungstaschen der Protease, die sich auf der Acyl-Seite der zu spaltenden Bindung befinden, und Sn´ die Bindungstaschen, die sich auf der Seite der Abgangsgruppe befinden, bezeichnet. Die Nummerierung der Proteinbindungstaschen erfolgt von innen nach außen, ausgehend von der zu spaltenden Peptidbindung. Pn und Pn´ dagegen bezeichnen die korrespondierenden Reste, die in die jeweiligen Proteintaschen binden. Die Unterteilung der Substratspezifität bei den trypsinartigen Serinproteasen erfolgt aufgrund der S1-P1-Wechslwirkung. Die *S1-Site* ist eine Tasche, die direkt an Ser^{195} angrenzt und welche die Reste 189-192, 214-216 und 224-228 formen. Die Reste an den Positionen 189, 216 und 226 bestimmen die Substratspezifität (Perona and Craik 1995; Czapinska and Otlewski 1999). Die trypsinartigen Serinproteasen lassen sich bezüglich ihrer Spezifität in drei Gruppen unterteilen. Die Kombination von Ser^{189}, Gly^{216} und Gly^{226}, wie sie in Chymotrypsin zu finden ist, formt eine tiefe hydrophobe Tasche, die in erster Linie große hydrophobe Reste, wie zum Beispiel Phe, akzeptiert (Blow DM 1971). Bei Trypsin dagegen findet man in der Position 189 ein Aspartat, so dass eine negativ geladene S1-Tasche entsteht, in der vorzugsweise Arg und Lys in der P1-Position gebunden werden. In Elastase befinden sich auf den Positionen 216 und 226 Val und Thr, die zu einer deutlichen Verkleinerung der S1-Tasche im Vergleich zu Trypsin und Chymotrypsin führt und so die Vorliebe der Elastase zu kleinen aliphatischen Resten in Position P1 erklärt (Shotton and Watson 1970).

Die Substratbindung der trypsinartigen Serinproteasen erfolgt über die Hauptkette der Reste 214-217 des Enzyms unter Ausbildung eines antiparallelen β-Faltblatts mit der Hauptkette der P1-P3-Reste des peptidischen Substrats, wie man in Abbildung 2 am Beispiel der humanen Leukozyten-Elastase deutlich sehen kann. Wasserstoffbrücken bilden sich zwischen dem Carbonylsauerstoff von Ser^{214} und der NH-Gruppe des P1-Restes aus, zwischen der NH-Gruppe von Trp^{215} und der Carbonylgruppe des P3-Restes und zwischen der Carbonylgruppe von Val^{216} und der NH-Gruppe des P3-Restes. Diese Wechselwirkungen sind ein generelles Merkmal in allen trypsinartigen Serinproteasen und sind wichtig für die effiziente Hydrolyse von peptidischen Substraten.

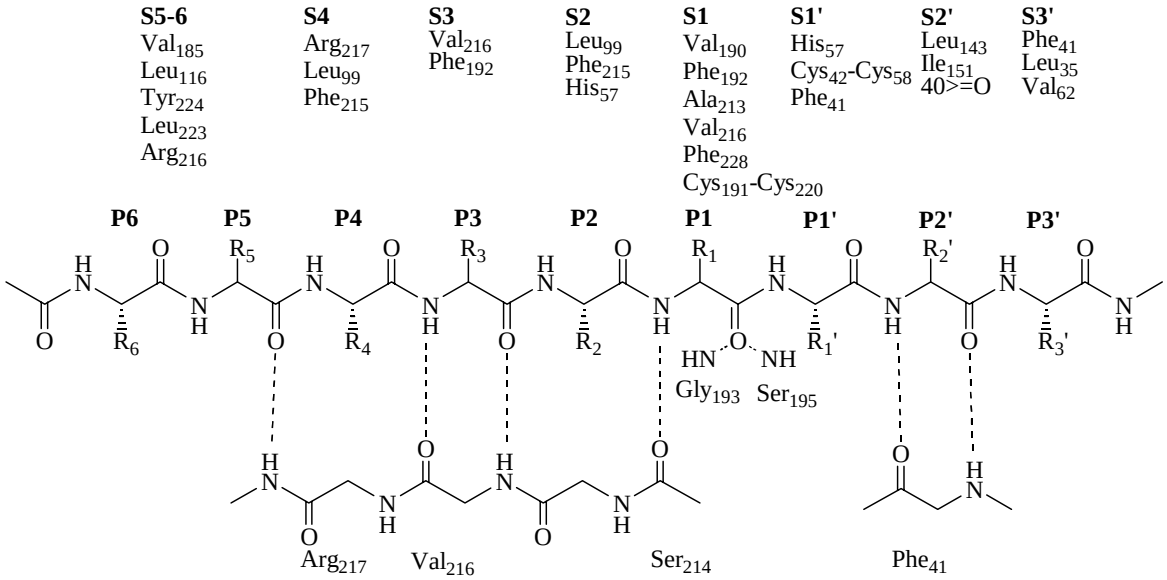


Abbildung 2: **Darstellung der Substratbindung am Beispiel der humanen Leukozyten Elastase.**
Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Reste des Enzyms, die die jeweiligen Substratbindungsseiten bilden, sind darunter aufgelistet (Bode et al. 1989).

Ein weiteres Kennzeichen der trypsinartigen Serinproteasen ist, dass sie als nicht aktive Proenzyme (Zymogene) exprimiert werden, die sich von den aktiven Proteasen dadurch unterscheiden, dass sie am N-Terminus ein zusätzliches Propeptid tragen, das man auch als *Activation domain* bezeichnet. Dieses zusätzliche N-terminale Propeptid führt zu einer Deformation der S1-Seite und des Oxyanion-Lochs, was die geringe Aktivität der Zymogene erklärt. Die Aktivierung der Zymogene erfolgt nach proteolytischer Prozessierung, nach der Ile_{16} als neuer N-Terminus freigesetzt wird. Der neue N-Terminus bildet mit Asp_{194} eine Salzbrücke, die den Konformationswechsel induziert und die aktive Protease generiert (Hedstrom J 2002). Viele Serinproteasen, wie zum Beispiel Chymotrypsin und Trypsin, können sich auch selbst aktivieren, sind also autokatalytisch wirksam.

Bei den Inhibitoren der Serinproteasen lassen sich generell drei unterschiedliche Arten von Inhibitoren unterscheiden: Die erste große Gruppe der Inhibitoren bilden mit Ser^{195} stabile Addukte, die dem tetraedrischen Übergangszustand in der Protease-Reaktion ähneln. Zu diesen gehören z. B. Diisopropylfluorophosphat (DFP), Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), peptidische Chloromethylketone, peptidische Aldehyde, Trifluormethylketone und Boronsäure-Derivate. In Abbildung 3 sind die Reaktionen der oben angegebenen Inhibitoren dargestellt. Die peptidischen Aldehyde, Trifluormethylketone und Boronsäure-Derivate formen zwar kovalente tetraedrische Addukte, die aber im Gleichgewicht mit dem

freien Enzym und mit dem freien Inhibitor stehen, also reversibel sind, während die Addukte mit DFP, PMSF und mit den peptidischen Chloromethylketonen irreversibel sind. Bei den peptidischen Chloromethylketonen erfolgt neben der Bildung der irreversiblen Addukte noch zusätzlich die Alkylierung des His[57] der katalytischen Triade.

Die zweite große Gruppe der Inhibitoren umfasst Inhibitoren, die durch die Bildung von stabilen Acyl-Enzymen mit Ser[195] die Serinproteasen inaktivieren. Zu diesen gehören zum Beispiel p-Nitrophenyl-Guanidinobenzoesäureester, Azapeptidester, Arylacrylsäureester und Peptidphosphonate. In Abbildung 3 sind die Reaktionen dieser Inhibitoren mit Serinproteasen dargestellt (Cheronis JC 1993).

Darüber hinaus gibt es eine dritte große Gruppe von reversiblen Inhibitoren, die keine kovalente Bindung mit dem Protein eingehen, sondern die S1-Tasche besetzen und so als Substrat-Analoga die Bindung des Substrats und dessen Hydrolyse verhindern. Zu diesen gehören zum Beispiel die Benzamidin-Inhibitoren.

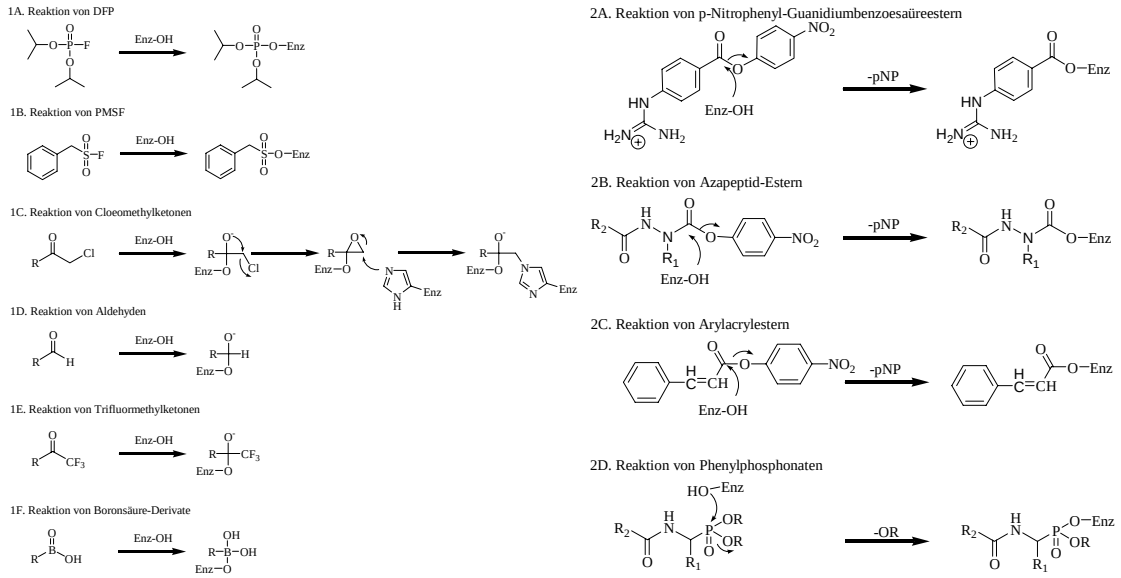


Abbildung 3: **Darstellung der Inhibitionsmechanismen verschiedener Inhibitoren**

1A-1F) Mechanismen von Inhibitoren, die tetraedrische Addukte bilden.

2A-2D) Mechanismen von Inhibitoren, die stabile Acylenzyme bilden

2.3 Die transmembranen Serinproteasen

Die Proteolyse auf der Zelloberfläche ist ein wichtiger Mechanismus zur Freisetzung von biologisch aktiven Proteinen, die dann eine Vielzahl von zellulären Funktionen ausführen können. Während die weitaus meisten Mitglieder der Serinprotease-Familie entweder direkt an ihrem Wirkungsort sezerniert werden oder bis zu ihrer signalregulierten

Freisetzung in cytoplasmatischen Speicherorganellen gelagert werden, sind die transmembranen Serinproteasen in der Cytoplasmamembran verankert. Sie sind somit ideal positioniert, um sowohl mit anderen Proteinen der Zelloberfläche gleicher oder benachbarter Zellen als auch mit löslichen Proteinen oder mit Komponenten der extrazellulären Matrix zu interagieren. Die in der Plasmamembran verankerten Serineprotasen, die sich in den letzten Jahren zu einer schnell expandierenden Untergruppe der S1-Serinproteasen entwickelt haben, lassen sich in drei Gruppen aufteilen, die sich zum einen in der Art der Verankerung in der Plasmamembran und zum anderen in der Lokalisation der membrandurchspannenden Domäne (am C- oder am N-Terminus) unterteilen lassen (Netzel-Arnett et al. 2003; Szabo et al. 2003). Die membranverankerten Serinproteasen des Typs I tragen die transmembrane Domäne am C-Teminus. Cytoplasmatische Domänen finden sich in dieser Gruppe nicht. Von dieser Gruppe ist bisher nur ein einziger Vertreter bekannt, die Tryptase Gamma I. Die zweite Gruppe der transmembranen Serinproteasen tragen die transmembrane Domäne ebenfalls am C-terminalen Ende. Die Verankerung dieser Serinproteasen in der Plasmamembran erfolgt aber über einen glycosyl-phosphatidylinositol Linker (GPI anchored SPs). Von dieser Gruppe sind bisher 15 Vertreter in Säugetieren bekannt. Die letzte und größte Gruppe der transmembranen Serinproteasen ist die Gruppe vom Typ II (TT-SPs). Als einzige Gruppe tragen diese Serinproteasen die transmembrane, stark hydrophobe Domäne am N-terminalen Ende. Darüber hinaus zeigen alle Vertreter dieser Gruppe eine zusätzliche cytoplasmatische Domäne. Prominentester Vertreter der TT-SPs ist die Enteropeptidase, die aufgrund ihrer essentiellen Rolle in der Verdauung als erste transmembrane Serinprotease des Typs II vor mehr als hundert Jahren entdeckt wurde (Pavlov 1904). Bisher sind 30 Mitglieder dieser Familie identifiziert, von denen 15 im Menschen exprimiert werden (Hooper et al. 2001). In Tabelle 1 sind die bisher bekannten humanen Vertreter und die entsprechenden Vertreter in der Maus mit Angabe der Sequenzidentität zum humanen Vertreter aufgelistet.

Name	Organismus	Identität zum humanen Vertreter in %
Matriptase	Mensch	100
Epithin	Maus	81
Matriptase 2 (TMPRSS6)	Mensch	100
AA035 Peptidase	Maus	84
Matriptase 3	Mensch	100
	Maus	68
Enteropeptidase	Mensch	100
	Maus	75
Corin	Mensch	100
LRP4	Maus	82
Hepsin (TMPRSS1)	Mensch	100
	Maus	88
TMPRSS2	Mensch	100
Epitheliasin	Maus	77
TMPRSS3	Mensch	100
	Maus	88
TMPRSS4	Mensch	100
mCAP2	Maus	77
Spinesin (TMPRSS5)	Mensch	100
	Maus	77
DESC-1 (Endotheliase 1)	Mensch	100
	Maus	73
DESC-2	Mensch	100
DESC-3	Mensch	100
	Mensch	56
HAT	Mensch	100
MAT	Maus	66
MSPL (Endotheliase 2)	Mensch	100
	Maus	88

Tabelle 1: Vertreter der transmembranen Serinproteasen des Typs II (Hooper et al. 2001).

Bezüglich ihrer Sequenzähnlichkeit lassen sich die TT-SPs in vier Unterfamilien zusammenfassen:

1. DESC-1/HAT-Unterfamilie (DESC1-3, HAT)
2. Matriptase-Unterfamilie (Matriptase1-3)
3. Hepsin/Enteropeptidase-Unterfamilie (Hepsin, Enteropeptidase, TMPRSS1)
4. Corin-Unterfamilie (Corin)

Bei den TT-SPs handelt es sich um Multidomänen-Proteine, welche die extrazelluläre Serinproteasen-Domäne am C-terminalen Ende tragen. Ein Merkmal, das allen TT-SPs gemein ist, ist die Domänenorganisation. Neben der hochkonservierten, trypsinartige Serinprotease-Domäne gehören die transmembrane Domäne, eine kurze, N-terminale Domäne und die bezüglich der Länge von Vertreter zu Vertreter stark variierende Stamm-Region dazu. Die letztere setzt sich aus unterschiedlichen Domänen zusammen und verbindet die transmembrane mit der katalytischen Domäne verbindet (Szabo et al. 2003).

Die proteolytische Domäne weist bei allen Mitgliedern dieser Familie die trypsinartige Faltung auf. Die katalytische Triade besteht aus Histidin, Aspartat und Serin, die über die gesamte Familie konserviert sind. TT-SPs werden als einkettige Zymogene synthetisiert. Die Aktivierung erfolgt durch die Spaltung nach den basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin. Auch dieses Motiv tritt in der gesamten Familie auf. Die Verknüpfung der Prodomäne und der katalytischen Domäne über Disulfidbrücken kann bei allen TT-SPs festgestellt werden und hat die Konsequenz, dass die Proteasedomäne auch nach der Aktivierung mit der Zelloberfläche verbunden bleibt. Allerdings lassen sich von einigen Vertretern, wie beispielsweise von Enteropeptidase (Louvard et al. 1973; Fonseca and Light 1983), von HAT (Yasuoka et al. 1997) und von MT-SP1 (Lin et al. 1999), auch lösliche Formen isolieren, was den Schluss zulässt, dass zumindest bei einigen Vertretern eine Ablösung der katalytischen Domäne von der Zelloberfläche erfolgt. Bezüglich der Substratspezifität lässt sich bei allen TT-SPs feststellen, dass aufgrund eines Aspartats am Boden der S1 Substratbindungstasche die Substrate bevorzugt prozessiert werden, die an der P1-Position entweder Lysin oder Arginin tragen. Aufgrund der Substratspezifität für basische Aminosäuren an P1-Position ist zumindest für einen Teil der TT-SPs eine autokatalytische Aktivität vorstellbar.

Jede der TT-SPs weist in der Nähe des N-Terminus eine kurze stark hydrophobe Domäne auf, welche die cytoplasmatische Domäne mit der Stamm-Region und der katalytischen

Domäne verbindet und die als Anker in der cytoplasmatischen Membran angesehen werden kann.

Am N-Terminus der TT-SPs befindet sich die cytoplasmatische Domäne, deren Funktion bisher noch nicht geklärt ist. Die Länge dieser Domäne variiert von 12 Aminosäuren für HAT bis 112 Aminosäuren für Mauscorin. Als Funktion dieser Domäne wird die Wechselwirkung mit Komponenten des Cytoskeletts oder mit Signalmolekülen angenommen, was aber bisher noch nicht experimentell nachgewiesen werden konnte. Ein Teil der TT-SPs, wie zum Beispiel Corin, Matriptase und TMPRSS2 (Transmembrane Protease Serine 2) tragen Sequenzen in diesem Bereich, die eine Phosphorylierung mit Proteinkinase C und/oder Caseinkinase II zulassen, was die Vermutung unterstützt, dass diese Domäne in der Signal-Transduktion eine Rolle spielt (Netzel-Arnett et al. 2003; Szabo et al. 2003).

Der Teil, in dem sich die einzelnen Vertreter der TT-SPs am meisten unterscheiden, ist die Stammregion. In dieser Region lassen sich 11 unterschiedliche Domänen in der Familie der TT-SPs nachweisen, zu denen sowohl regulatorische als auch bindende Domänen gehören. Dazu gehören zum Beispiel LDL-Rezeptor-Domänen, SR-Domänen, *frizzeled*-Domänen, CUB-Domänen, SEA-Domänen und MAM-Domänen. Die LDL-Rezeptor-Domänen sind die mit Abstand am weitesten verbreiteten Strukturelemente in der Familie der TT-SPs. Die generelle Funktion der LDL-Rezeptor-Domänen ist die Aufnahme von Makromolekülen in die Zelle, wie zum Beispiel Komplexe von Serinproteasen mit deren Inhibitoren oder Lipoproteine. Bei den TT-SPs ist die Funktion dieser Domäne bisher jedoch noch nicht geklärt (Kounnas et al. 1996; Brown et al. 1997; Nykjaer et al. 1997).

Bezüglich des Expressionsmusters zeigen die TT-SPs eine relativ eng begrenzte, stark gewebespezifische Expression, so dass man annehmen kann, dass auch die Funktion der einzelnen Vertreter stark von dem Gewebe abhängen, in dem sie exprimiert werden. Die zelluläre Expression von vielen TT-SPs scheint während des Tumorwachstums dereguliert zu sein. Insbesondere Hepsin, Matriptase und TMPRSS2-4 werden von unterschiedlichen Krebszellen stark überexprimiert und der Expressionslevel dieser TT-SPs in den Krebszellen korreliert umgekehrt proportional zur Überlebensprognose des Patienten.

Ähnlich wie die MT-MMPs und die ADAMs ist die Funktion der TT-SPs die Regulierung von Zell-Signal-Vorgängen auf der Plasmamembran. Wie oben schon angesprochen sind die TT-SPs ideal positioniert, um Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) freizusetzen, um Proteine der Zelloberfläche, wie z. B. PARs, Wachstumsfaktoren, und

Cytokine proteolytisch zu aktivieren und um mit anderen Proteinen der Zelloberfläche und mit löslichen Liganden zu interagieren. Am Beispiel der Matriptase konnte gezeigt werden, dass die TT-SPs eine Rolle in der direkten und indirekten Aktivierung von MT-MMPs und von anderen Serinproteasen spielen können. Es ist daher davon auszugehen, dass auch die proteolytische Aktivität der anderen TT-SPs in das Netzwerk von sehr viel besser charakterisierten Protease-Systemen wie zum Beispiel den ADAMs, den MT-MMPs oder dem uPa/uPA-Rezeptor-System integriert ist (Hooper et al. 2001; Szabo et al. 2003).
Insgesamt kann man sagen, dass es aufgrund der ständig ansteigenden Anzahl an neu entdeckten TT-SPs und aufgrund ihrer vielfältigen Assoziation mit Krebs und anderen Krankheiten notwendig ist, sowohl die biologische als auch die physiologische Funktion der TT-SPs besser zu verstehen und somit ein besseres Bild davon zu erhalten, welche Vorgänge sich auf der Oberfläche von Zellen, sowohl von normalen Zellen als auch von pathogenen Zellen, abspielen und welche Funktionen den einzelnen TT-SPs in den unterschiedlichen Geweben zu kommt.

2.4 Die extrazelluläre Matrix

Die meisten Zellen vielzelliger Organismen sind in Zellverbänden der Gewebe organisiert. Die verschiedenen Gewebearten verbinden sich wiederum zu größeren Funktionseinheiten, den Organen. In den Geweben stehen die Zellen gewöhnlich mit einem komplexen Geflecht extrazellulärer Makromoleküle in Verbindung. Dieses komplexe Geflecht wird als extrazelluläre Matrix (ECM) bezeichnet. Die ECM hält Zellen und Gewebe zusammen und bildet bei Tieren ein geordnetes Gerüst, in dem Zellen wandern und miteinander in Kontakt treten können. Sie besteht aus folgenden Komponenten: Kollagene, Proteoglykane, Glukosaminoglycane und Glykoproteine, wie z. B. Laminin, Fibronectin, Entactin und Nidogen. Hauptbestandteil der ECM sind die Kollagene. Hierbei handelt es sich um sehr charakteristische Faserproteine, die aus drei Ketten, den so genannten α-Ketten bestehen, die sich in Form einer seilartigen Superhelix umeinanderwinden. Als Hauptbestandteile von Haut und Knochen sind sie bei Säugetieren mit 25 % des Gesamtproteins die am häufigsten vorkommende Proteinklasse. Bis heute wurden ungefähr 25 verschiedene Kollagen-α-Ketten nachgewiesen. In den einzelnen Geweben werden diese α-Ketten in unterschiedlichen Kombinationen exprimiert. Bisher wurden 12 unterschiedliche Kollagentypen identifiziert, von denen die Typen I, II, III und IV die am besten charakterisierten sind. Die Kollagene des Typs I, II und III bezeichnet man als

fibrilläre Kollagene, da sie sich bei Sezernierung in den extrazellulären Raum zu Fibrillen zusammenlagern und so geordnete Polymere mit einem Durchmesser von 10 - 300 nm bilden. Die Fibrillen wiederum können sich zu größeren Bündeln zusammenlagern, die man als Kollagenfasern bezeichnet. Anders als beim Typ I - III verhalten sich die Kollagene des Typs IV. Bei diesem Typ wird die tripel-helikale Struktur durch Regionen anderer Struktur unterbrochen. Anstatt Fibrillen zu bilden, lagern sie sich über ihre C-Termini zu Kopf-an-Kopf-Dimeren zusammen, um ein vielschichtiges Netzwerk aufzubauen, das durch Disulfidbrücken und andere kovalente Bindungen stabilisiert wird. Diese Kollagene bezeichnet man deshalb auch als netzbildende Kollagene. Aufgrund der oben beschriebenen Struktur und Zusammensetzung sind alle Kollagene extrem resistent gegen die meisten Proteasen. Nur spezifische Kollagenasen sind fähig, Kollagene zu degradieren, in dem sie die α-Ketten spalten, was dazu führt, dass sich die Triple-Helix auflöst, und so die einzelnen α-Ketten für weitere Degradierung durch Gelatinasen oder durch andere Proteasen zugänglich machen.

Bei den Glycoproteinen der ECM handelt es sich um Mehrdomänenproteine, die in den einzelnen Domänen jeweils spezifische Bindungsstellen für andere Makromoleküle der Matrix und für Zelloberflächen-Rezeptoren aufweisen. So können sie z. B. sowohl fibrilläres als auch netzwerk-bildendes Kollagen, aber auch Glukosaminoglykane (GAG), wie zum Beispiel Heparansulfat, und Rezeptorproteine (Integrine) der Zelloberfläche binden. Die Hauptfunktion der Glykoproteine ist zum einen die Organisation der ECM aber auch die Bindung der Zellen an die ECM.

Bei den GAGs handelt es sich um unverzweigte Polysaccharidketten, die wiederum aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten bestehen. Einer der beiden Zuckerreste in dem Disaccharid-Baustein ist stets ein Aminozucker. In den meisten Fällen ist dieser Aminozucker mit einer Sulfatgruppe verbunden. Man unterteilt vier Klassen der GAGs abhängig vom Zuckerrest und von der Anzahl und der Bindungsposition der Sulfatgruppen: 1. Hyaluronan, 2. Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, 3. Heparansulfat und Heparin und 4. Keratansulfat.

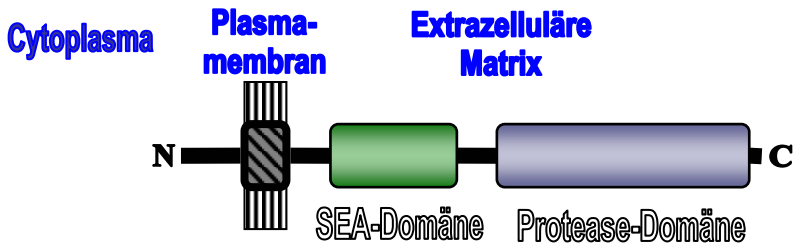
Aufgrund der Sulfat- und Carboxylatgruppen der GAGs sind diese stark hydrophil und bilden hydratisierte Gele, die einen großen Teil des extrazellulären Raums ausfüllen. Diese hydratisierten Gele bilden eine mechanische Stütze für das Gewebe und erlauben gleichzeitig die schnelle Diffusion wasserlöslicher Moleküle und die Wanderung von Zellen. Abgesehen von den Hyaluronanen sind alle GAGs kovalent an Proteine gebunden,

mit denen sie hochmolekulare Proteoglycane bilden. Der peptidische Anteil der Gesamtmasse in den Proteoglycanen beträgt 7 - 20 %. Der Rest der Gesamtmasse wird aus GAGs gebildet, deren Ketten von 1 - 100 Zuckerresten variieren (Ruoslahti 1988; Kjellen and Lindahl 1991; Hardingham and Fosang 1992). Neben der oben angesprochenen Fähigkeit ihrer GAGs, hydratisierte Gele unterschiedlicher Porengröße zu bilden und so als selektive Siebe zu dienen, die den Transport von Molekülen und Zellen je nach Größe und Ladung steuern können, haben die Proteoglycane auch noch eine wichtige Funktion bei der chemischen Signalübertragung zwischen den Zellen. Sie können eine Vielzahl sezernierter Signalmoleküle, so z. B. Wachstumsfaktoren, binden. In den meisten Fällen erfolgt die Bindung der Signalmoleküle über die Glukosaminoglykan-Ketten, aber auch die Bindung an den peptidischen Teil der Proteoglykane findet statt (Massagne J 1991; Ruoslahti and Yamaguchi 1991; Flaumenhaft and Rifkin 1992; Wight TN 1992).

2.5 DESC-1

DESC-1 wurde zuerst von Lang *et al*. im Jahr 2001 entdeckt bei der Suche nach neuen Genen, die in normalem Epithelium exprimiert werden, aber in wuchernden Karzinomen dieser Zellen im Kopf- und Nackenbereich nicht vorhanden sind. Die von Lang durchgeführte Gen-Expressions-Analyse (Lang and Schuller 2001) zwischen diesen Karzinomen und normalen Epithelzellen führte zu Identifikation von DESC-1 (Differential Expressed in Squamous cell Carcinoma gene 1). Die Analyse ergab, dass DESC-1-RNA nur in gesunden Epithelzellen der Prostata, der Haut, der Hoden und des Kopf- und Nackenbereiches detektiert werden kann, während DESC-1-RNA in den Zellen von wuchernden Karzinomen im Kopf- und Nackenbereich herunterreguliert oder nicht vorhanden ist. Durch die Herunterregulierung oder vollständige Abwesenheit von DESC-1 in den Zellen dieser Karzinome kann DESC-1 als möglicher, neuer Tumor-Marker für diese Art von Karzinomen angesehen werden. DESC-1 ist ein Multidomänenprotein, das zu der oben beschriebenen Familie der transmembranen Serinproteasen des Typs II gehört. Das *DESC1*-Gen ist auf dem humanen Chromosom 4 lokalisiert und codiert ein Genprodukt, das aus einer Polypeptidkette von 422 Aminosäuren besteht, von denen 233 Aminosäuren die extrazelluläre, proteolytische Domäne bilden. Die Masse des gesamten Proteins beträgt 47 kDa, die Masse der proteolytischen Domäne 25 kDa. Das Protein ist in vier Domänen unterteilt: eine cytoplasmatische Domäne (Reste 1 - 17), eine aus hydrophoben Resten bestehende transmembrane Domäne (Reste 18 - 37), eine SEA-

Domäne (Reste 65 - 174) und eine proteolytische Serinprotease Domäne mit der katalytischen Triade (Reste 192 - 422) (siehe unten).



Darüber hinaus weist DESC-1 im SEA-Modul zwei N-Glykolisierungsstellen und eine Substratbindungsstelle für die Cdc2-Kinase auf. Die höchste Homologie zeigt DESC-1 mit der humanen Serinprotease HAT (Human Airway Trypsin-like serine protease)(Yasuoka et al. 1997), die ebenfalls zu der Familie der transmembranen Serinproteasen des Typs II gehört. Insgesamt beträgt die Identität zwischen HAT und DESC-1 38 %. Vergleicht man nur die proteolytischen Domänen von HAT und DESC-1, so liegt die Identität noch deutlich höher, nämlich bei 51 %. Bisher unbekannt sind das natürliche Substrat von DESC-1 sowie seine Funktion in gesunden Epithelzellen und die Regulierung seiner proteolytischen Aktivität. In der nachfolgenden Gesamtsequenz von DESC-1 sind die Reste gemäß ihrer Domänenzugehörigkeit eingefärbt.

1 myrpdvvrar krvcwepwvi glvifisliv lavciglltvh yvrynqkkty nyystlsftt
61 dklyaefgre asnnftemsq rlesmvknaf yksplreefv ksqvikfsqq khgvlahmll
121 icrfhstedp etvdkivqlv lheklqdavg ppkvdphsvk ikkinktetd sylnhccgtr
181 rsktlgqslr ivggteveeg ewpwqaslqw dgshrcgatl inatwlvsaa hcfttyknpa
241 rwtasfgvti kpskmkrglr riivhekykh pshdydisla elsspvpytn avhrvclpda
301 syefqpgdvm fvtgfgalkn dgysqnhlrq aqvtlidatt cnepqaynda itprmlcags
361 legktdacqg dsggplvssd ardiwylagi vswgdecakp nkpgvytrvt alrdwitskt
421 gi

2.6 Die Metalloproteasen

Die Metalloproteasen weisen bis auf wenige Ausnahmen Zink als Metall im aktiven Zentrum auf. Das aktive Zink tritt in den Metalloproteasen in der Oxidationsstufe +2 auf und wird während biologischen Reaktionen weder oxidiert noch reduziert, was auf die vollbesetzte d-Schale zurückzuführen ist und was Zink als Metall im aktiven Zentrum von den benachbarten Metallen Kupfer oder Eisen unterscheidet (Hooper 1996). Zink kann darüber hinaus bis zu 6 Liganden in unterschiedlichen Geometrien binden, was ihm ebenfalls eine Sonderstellung in biologischen Systemen einbringt. In Metalloproteasen sind

die Zinkliganden in der Regel Histidine, Glutamate, Aspartate und deutlich seltener auch Cysteine (Auld 1997). Insgesamt kann Zink in Metalloproteasen drei unterschiedliche Funktionen ausfüllen: rein katalytische Funktion, strukturelle Funktion und regulierende Funktion. Von der katalytischen Funktion spricht man, wenn Zink essentiell ist für oder direkt involviert ist in der Katalyse der Proteasen. Die Entfernung des Zinks aus dem aktiven Zentrum würde in diesem Fall direkt den Verlust der katalytischen Aktivität bedeuten. Von der strukturellen Funktion des Zinks spricht man, wenn das Zink ausschließlich für die strukturelle Stabilisierung im Protein zuständig ist und die aktive Konformation der Protease stabilisiert, aber nicht in den Katalysemechanismus eingreift. Die letzte Funktion, die Zink in Metalloproteasen auch ausfüllen kann, ist die regulierende Funktion. Dieser Fall trifft dann zu, wenn Zink nur die katalytische Aktivität reguliert, aber nicht essentiell dafür ist. Die Funktion des regulierenden Zinks kann zum einen in der Aktivierung aber auch in der Inhibition der Metalloprotease liegen. Die weitaus meisten Metalloproteasen tragen das Zinkbindungsmotif HEXXH, was auch direkt als charakteristisches Merkmal dieser Proteasen angesehen werden kann. Man fasst diese Metalloproteasen, die das Zinkbindungsmotif HEXXH aufweisen, zu einer Superfamilie, den „Zinkinen“, zusammen (Bode et al. 1993).

2.7 Die Gluzincine

Die Zinkine wiederum können weiter unterteilt werden: in die Gluzinkine und die Metzinkine. Die Unterscheidung erfolgt hier nach der Art der zinkbindenden Liganden. Die Metzinkine weisen das deutlich erweiterte Zinkbindungsmotif HEBXHXBGBXH auf, bei dem der dritte Zinkligand auch ein Histidin ist. Darüber hinaus zeigen die Metzinkine eine Methionin-enthaltende Schleife, den „*Met-Turn*“(Bode et al. 1993; Stocker and Bode 1995), die in allen Mitgliedern ähnliche Konformation einnimmt. Im Unterschied dazu weisen die Gluzinkine das kurze HEXXH-Motif auf. Als dritten Zinkliganden tragen die Gluzinkine ein Glutamat, das auch der Namengeber dieser Unterfamilie der Zinkine ist (Hooper 1994). Die weitere Unterteilung der Gluzinkine erfolgt zum einen über den Abstand der beiden Motive, die die ersten beiden und den dritten Zinkliganden enthalten, und über die Sequenz in diesen beiden Motiven und führt zu folgenden Unterfamilien der Gluzinkine: die Thermolysin Familie, die mit Thermolysin den prominentesten Vertreter der Gluzinkine enthält, die Neprolysin-Familie, die „*Angiotensin converting enzyme*“-

Familie, die Aminopeptidase-Familie, die Thimet Oligopeptidase-Familie und die Tentoxilysin/Bontoxolysin-Familie.

Im proteolytische Mechanismus der Gluzinkine spielt ein Wassermolekül, das neben den drei Zinkliganden der Protease den vierten Zinkligand darstellt, eine zentrale Rolle (Auld 1997). Das Wassermolekül wird dabei vom Zink und einem benachbarten Rest, bei dem es sich in der Regel um ein Glutamat oder ein Aspartat handelt, ausgerichtet und polarisiert. Befindet sich das Peptid in einer geeigneten Konformation im aktiven Zentrum, kann das polarisierte Wassermolekül die zu spaltende Peptidbindung nukleophil angreifen und über einige Zwischenschritte zur Hydrolyse des Peptids führen (siehe Abbildung 4)(Hangauer et al. 1985).

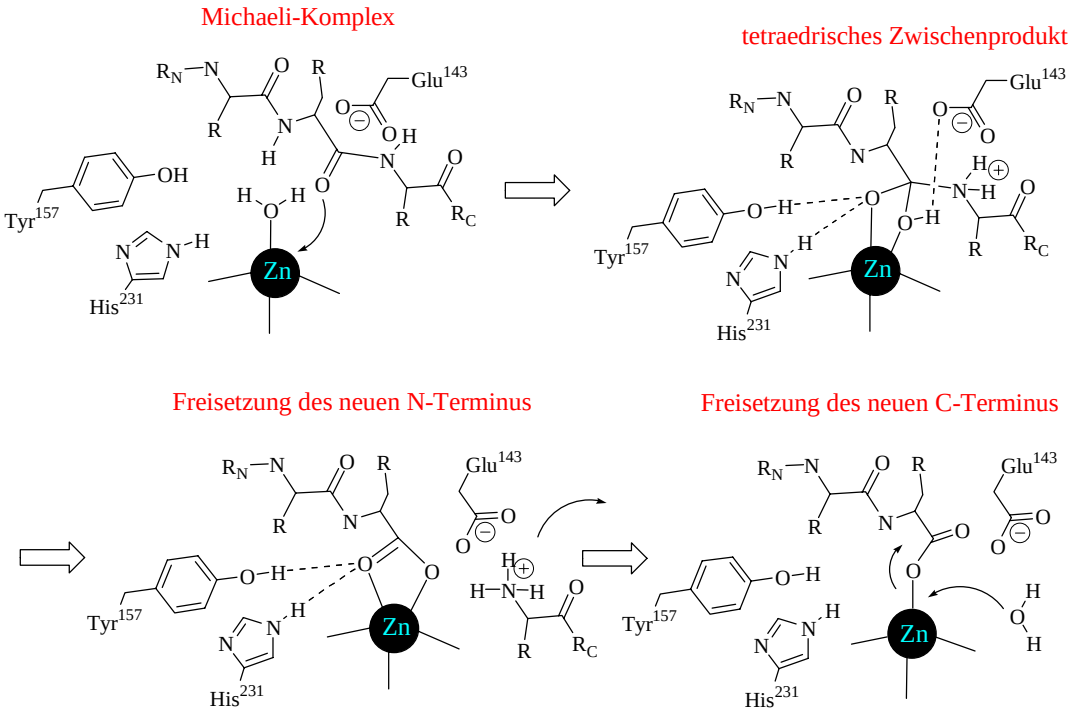


Abbildung 4: Proteolytischer Mechanismus der Gluzinkine am Beispiel von Thermolysin (Hangauer et al. 1985)

2.8 Die proteolytische Kaskade im Modell-Organismus *Thermoplasma acidophilum*

Die Degradation von Proteinen ist die Hauptaufgabe von Zellen in allen lebenden Organismen. Jede Zelle muss falsch gefaltete, nicht funktionierende Proteine abbauen, um das Gleichgewicht zwischen anabolischen und katabolischen Biosynthesewegen zu erhalten und um freie Aminosäuren für den ständigen Neu-Aufbau von zellulären Strukturen zur Verfügung zu stellen. Um Chaos in der Zelle zu vermeiden, ist es von größter Wichtigkeit, dass die proteolytische Degradation von Proteinen sorgfältig reguliert

wird. Hauptkontrollelement der Degradation ist die räumliche Abgrenzung von den übrigen Bestandteilen der Zelle. Beispiel für eine solche räumliche Abgrenzung der Protein-Degradation ist das eukaryontische Lysosom, bei dem die Entscheidung, welche Proteine degradiert werden, ausschließlich darüber getroffen wird, welche Proteine in das Lysosom transportiert werden. Hat das fehl gefaltete Protein einmal das Innere des Lysosoms erreicht, wird es mit unspezifischen Proteasen degradiert (Bohley and Seglen 1992); Mason et al. 1996). Eine andere Möglichkeit, um die proteolytische Degradation von Proteinen von der überfüllten Umgebung in der Zelle abzugrenzen, ist die Zusammenlagerung von mehreren, gleichen Proteasen, die ihrerseits aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind, zu einer fassartigen Struktur, in deren Innenraum sich die aktiven Zentren der zusammen gelagerten Proteasen befinden. Der Zugang zu diesen proteolytischen Nanokompartimenten ist auf ungefaltete Proteine limitiert. Die Entscheidung, welche Proteine degradiert werden, erfolgt bei diesen Proteasen durch die Verknüpfung mit weiteren Proteinen, die sich an den Core-Partikel dieser Proteasen anlagern und die die Möglichkeit haben, die zu degradierenden Proteine zu binden, zu erkennen, zu entfalten und sie dann den Proteasen zu zuführen. Diese Aufgaben werden in erster Linie durch ATPase-Untereinheiten dieser Proteine durchgeführt, die man auch als reverse Chaperone oder „*Unfoldases*“ bezeichnet. In *Thermoplasma acidophilum* übernimmt VAT diese Funktion (Rockel et al. 2002). Die Entscheidung, welche Proteine degradiert werden, erfolgt bei diesen selbstorganisierenden Proteasen energieabhängig. Insbesondere bei prokaryontischen Zellen, in denen membrangebundene Kompartimente, wie das Lysosom, fehlen, ist die zuletzt beschriebene Art der Protein-Degradation weit verbreitet und manifestiert sich zum Beispiel im Proteasom, in HsIV, in ClpP oder in Lon. Das 20S-Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* ist ein zylindrischer Komplex, der ein Molekulargewicht von 700 kDa aufweist. Die Abmessung des Proteasoms betragen 120Å x 160 Å (Harris 1968). Es besteht aus 28 Untereinheiten, die die fass-artige Struktur von vier aufeinander folgenden Ringen aufbauen (Hase et al. 1980). Jeder Ring wird wiederum aus 7 Untereinheiten gebildet (Peters 1994). Im Proteasom von *Thermoplasma acidophilum* findet man zwei unterschiedliche, aber verwandte Untereinheiten: die α-Untereinheit, aus der die äußeren Ringe aufgebaut sind, und die katalytisch aktive β-Untereinheit, die die beiden inneren Ringe ausbildet. Die Ringstruktur ermöglicht die Ausbildung von inneren Kammern: die zentrale Kammer, die sich zwischen den beiden β-Ringen befindet, und die beiden Vorkammern, die sich jeweils zwischen einem α- und

einem β-Ring befinden (Hegerl et al. 1991; Loewe J. 1995). Zugänglich sind alle drei Kammern nur über einen zentralen Kanal, der entlang der Längsachse des Proteasoms verläuft. Die katalytischen Zentren der β-Untereinheiten befinden sich an der Innenwand der zentralen Kammer und können von Substraten dementsprechend auch nur über den zentralen Kanal erreicht werden. Der Kanal weist einen Durchmesser von 50 Å auf, der ausschließlich den Zugang von ungefalteten Proteinen zulässt. Die peptidischen Produkte des Proteasoms zeigen eine relativ eng begrenzte Größe, die zwischen 6 und 12 Aminosäuren liegt (Wenzel and Baumeister 1995). Die Substrate des Proteasoms werden vollständig, ohne das Generieren von Zwischenprodukten, auf diese Länge abgebaut. Für die meisten Zellen sind Peptide dieser Größe für die Energieproduktion oder für die Proteinsynthese nicht zu verwenden und müssen weiter zu freien Aminosäuren degradiert werden. Im Archaeon *Thermoplasma acidophilum* ist für diese weitere Degradierung der vom Proteasom generierten Produkte eine weitere Protease, die Tricornprotease, und die dazu gehörenden Tricorn interagierenden Protease-Faktoren F1, F2 und F3 zuständig. Bei der Tricornprotease handelt es sich um eine 720 kDa Protease, die sich aus 6 Untereinheiten zusammensetzt. Jeweils drei dieser Untereinheiten lagern sich zu einem trimeren Ring zusammen, der dann wiederum in perfekt gestaffelter Konformation mit einem weiteren Trimer zusammengelagert ist. Insgesamt ergibt das für die Tricornprotease die Form eines leicht verzerrten Hexagons (Brandstetter et al. 2001; Brandstetter et al. 2002). Entlang der 3-zähnigen Achse erstreckt sich eine sehr große, innere Kammer, die die aktiven Zentren der Protease-Untereinheiten enthält und die am Eingang einen Durchmesser von 2.5 nm aufweist. Interessant ist in diesem Zusammenhang der N-terminale β6-Propeller (siehe Abbildung 35) der Tricornprotease, dessen innerer Kanal mit der inneren Kammer der Tricornprotease direkt in Verbindung steht, und von dem man vermutet, dass es sich dabei um den Produktausgang der Tricornprotease handelt.

Elektronenmikroskopisch konnte nachgewiesen werden, dass sich die Hexamere der Tricornprotease in vivo zu riesigen icosaedrischen, capsid-artigen Komplexen zusammenlagern, die 20 Kopien des Hexamers enthalten und eine molekulare Masse von 14.6 MDa aufweisen (Walz et al. 1997). Die Funktion dieser Capsid-Struktur könnte es sein, als Organisationszentrale der proteolytischen Degradation die Protease-Faktoren F1, F2 und F3 im Inneren des Capsids so zu positionieren, dass sie die Tricornprodukte übernehmen und weiter zu freien Aminosäuren umsetzten können (Tamura et al. 1998). Die Produkte der Tricornprotease sind in erster Linie Di-, Tri- und Tetrapeptide, die

vermutlich, wie oben bereits erwähnt, über den β6-Propeller an die Protease-Faktoren weitergegeben werden. Das heißt also, dass der finale Degradations-Schritt zu den freien Aminosäuren in *Thermoplasma acidophilum* durch F1, F2 und F3 durchgeführt wird, die die Produkte der Tricornprotease weiter prozessieren. Die Tricorn interagierenden Faktoren lassen sich zu zwei Familien von Proteasen zuordnen: Bei F1 handelt es sich um eine Prolyl-Imino-Peptidase mit der molekularen Masse von 33.5 kDa, die zu der Familie der α/β-Hydrolasen gehört (Tamura et al. 1996; Goettig et al. 2002). F2 und F3 dagegen sind Zink-Aminopeptidasen mit einer Größe von 89 kDa, die eine Sequenzidentität von 56 % zueinander aufweisen und keine verwandtschaftlichen Merkmale mit F1 zeigen. Bezüglich der Substratspezifität bevorzugt F1 ausschließlich hydrophobe Reste, wie zum Beispiel Alanin, Prolin, Phenylalanin und Leucin, aber auch Glycin und Tyrosin (Tamura et al. 1996; Goettig et al. 2002). F2 zeigt mit Abstand das breiteste Substratspektrum, da es sowohl neutrale als auch hydrophobe und basische Reste in P1-Position akzeptiert. Im Gegensatz zu F2 ist das Substratspektrum von F3 deutlich verengt und F3 weist eine starke Präferenz für Glutamat in P1-Position auf (Tamura et al. 1998). Insgesamt kann man sagen, dass das Gesamt-Substratspektrum der Tricorn interagierenden Faktoren F1-3 das gesamte Spektrum an Tricornprodukten abdeckt und somit alle Tricornprodukte auch in die freien Aminosäuren überführt werden können. Die ganze proteolytische Kaskade in *Thermoplasma acidophilum* verläuft in sequentieller Weise. Das bedeutet, dass die Tricornprotease auf die Produkte des Proteasoms und die Protease-Faktoren F1, F2 und F3 auf die Tricornprodukte angewiesen sind, um die proteolytische Degradation abzuschließen. Wie der Substrattransfer von der Tricornprotease zu ihren interagierenden Faktoren abläuft und vor allen Dingen, ob es zu der Ausbildung von stabilen Komplexen zwischen den beiden Komponenten kommt, ist bisher nur für F1 näher experimentell untersucht worden. Dynamische Lichtstreuungsexperimente zeigen, dass zwischen der Tricornprotease und F1 ein sehr schwacher Komplex ausgebildet wird, der hauptsächlich durch die Substratübergabe von der Tricornprotease zu F1 initiiert und stabilisiert wird. Zusammen mit der Kristallstruktur der humanen Prolyl-Oligopeptidase POP als Modell (Fülöp et al. 1998), die neben der α/β-Hydrolase-Faltung, wie sie in F1 zu beobachten ist, auch einen mit Tricorn vergleichbaren β-Propeller enthält, konnte ein Modell des Komplexes zwischen der Tricornprotease und F1 berechnet werden (Goettig et al. 2002), was gut in Übereinstimmung sowohl mit den experimentellen Daten als auch mit der nötigen funktionellen und strukturellen Ausstattung von F1 zu bringen ist. Ob ähnliche

Komplexe auch mit den anderen Protease-Faktoren F2 und F3 gebildet werden, ist bisher unklar, aber der F1-Komplex lässt vermuten, dass es schon aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität von F1, F2 und F3 einen Mechanismus geben muss, der es der Tricornprotease ermöglicht, ihre Produkte gezielt an die einzelnen Protease-Faktoren zu übergeben. Die Ausbildung von schwachen Komplexen zwischen der Tricornprotease und ihren Faktoren wäre eine Möglichkeit der gezielten Substratübergabe.

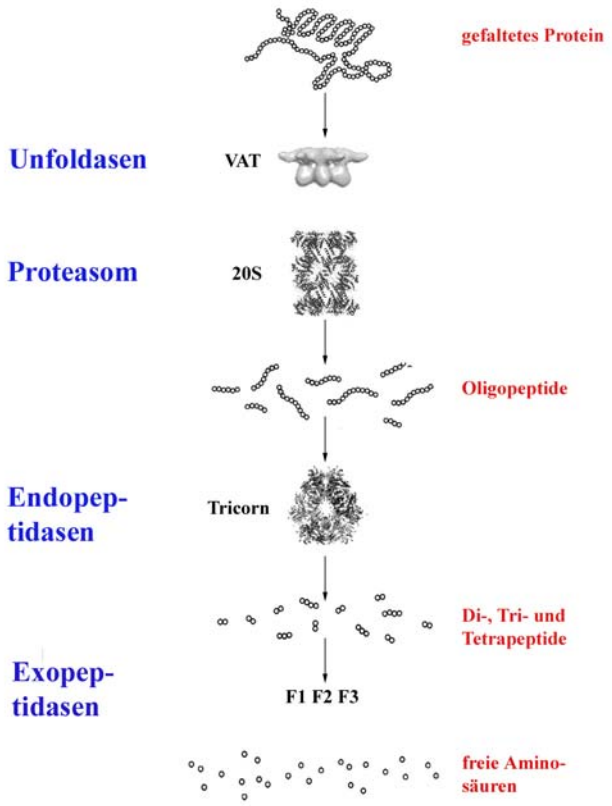


Abbildung 5: Schematische Darstellung der proteolytischen Kaskade von *Thermoplasma acidophilum*

Aus der proteolytischen Kaskade des Archaeons *Thermoplasma acidophilum* sind bisher das Proteasom (Loewe J. 1995), die Tricornprotease (Brandstetter et al. 2001) und der Protease-Faktor F1 (Goettig et al. 2002) als Kristallstruktur bekannt, während die Strukturen der Zink-Aminopeptidasen F2 und F3 nicht bekannt sind.

3. Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

3.1 Überblick

Zum besseren Verständnis der Funktion von Proteinen bei biochemischen Prozessen in der Zelle ist es wichtig, deren dreidimensionale Strukturen in atomarer Auflösung zu kennen. Für die Analyse dreidimensionaler Strukturen von Proteinen sind bisher drei Methoden etabliert:

Mit der ersten Methode, der Elektronenmikroskopie, lässt sich die Oberflächen von Proteinen darstellen.

Bei der zweiten Methode zur Bestimmung der Struktur von Makromolekülen handelt es sich um die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). Mit dieser Methode wurden bisher ungefähr 1300 Protein- und DNA-Strukturen aufgeklärt. Diese Methode ist allerdings routinemäßig auf Makromoleküle bis zu einer Masse von 35 kDa beschränkt, was bei Proteinen der Anzahl von etwa 300 Resten entspricht. Mit der NMR-Spektroskopie lassen sich die Strukturen von Proteinen in Lösung aufklären und darüber hinaus liefert sie Informationen über die Dynamik von Proteinen in Lösung. Der Vorteil der NMR-Spektroskopie gegenüber der nachfolgend beschriebenen Röntgenstrukturanalyse ist die Tatsache, dass die Proteine bei dieser Methode nicht kristallisiert werden müssen.

Die Röntgenkristallographie ist die mächtigste Methode zur Srukturaufklärung von Makromolekülen. Mit ihr wurden bisher über 8000 Protein- und DNA-Strukturen aufgeklärt und es lassen sich die Strukturen von Proteinen mit prinzipiell jeder Größe bestimmen. Voraussetzung für diese Methode sind jedoch hochqualitative Proteinkristalle, welche die Röntgenstrahlen beugen können.

Die Methode der Strukturaufklärung von Proteinen über die Röntgenkristallographie ist in verschiedenen Lehrbüchern ausführlich behandelt (Blundell TJ 1976; Strout GH 1989; Drenth J 1994; Massa W 1996).

3.2 Kristallisation von Proteinen

Wie oben erwähnt, ist die Herstellung von Einkristallen, die die Röntgenstrahlen beugen können, die Grundvoraussetzung, um die Methode der Röntgenstrukturanalyse anwenden zu können.

Die Kristallisation von Proteinen erfolgt in der Regel durch langsame, kontrollierte Präzipitation aus wässrigen Lösungen unter Bedingungen, bei denen das Protein nicht denaturiert wird. Das gelöste Protein wird durch langsame Steigerung der Konzentration des Fällungsmittels und einer damit einhergehenden Aufkonzentration des Proteins in den Zustand der Übersättigung gebracht. Dies erfolgt meist über Dampfdiffusion. Bei dieser Methode bringt man einen Tropfen einer Proteinlösung in einer luftdicht abgeschlossenen Kammer über ein Reservoir, das die Lösung von Fällungsmittel enthält. Durch den Konzentrationsausgleich über Dampfdiffusion zwischen der Fällungsmittelkonzentration im Tropfen und im Reservoir kommt es zu einer Übersättigung der Proteinlösung. Ob ein Protein dann als amorphes Präzipitat ausfällt oder ob es Kristallkeime (Nukleation) bildet, aus denen dann durch geordnete Anlagerung weiterer Proteinmoleküle makroskopische Kristalle entstehen, hängt von den Eigenschaften der verwendeten Lösungen im Tropfen und im Reservoir ab. Bei diesen Eigenschaften handelt es sich zum Beispiel um die Proteinkonzentration, um die Wahl und Konzentration des Fällungsmittels, um die Temperatur, um den pH-Wert und um die Ionenstärke der verwendeten Lösungen. Außerordentlich wichtig für eine erfolgreiche Kristallisation ist auch die Reinheit des eingesetzten Proteins. So ist es in den meisten Fällen notwendig, die Proteine in nahezu 100 %-iger Reinheit und Homogenität bereitzustellen. Um exakte Bedingungen zur Produktion guter Kristalle eines spezifischen Proteins zu finden, ist oft eine Vielzahl von Versuchen notwendig. Da die Kristallisation von Proteinen im Wesentlichen unverstanden ist, beruht das Auffinden der richtigen Kristallisationsbedingung allein auf dem Prinzip „Versuch und Irrtum“ und kann nicht mehr als deterministische Wissenschaft bezeichnet werden.

Bei Proteinkristallen handelt es sich nicht um perfekte Kristalle, sondern sie sind aus mehreren kleinen Blöcken mit idealer Ordnung aufgebaut, die im Gesamtverband geringfügig gegeneinander verkippt sind. Diese Verkippung wird als Mosaikbreite bezeichnet kann zwischen ca. 0,1° und mehreren Grad betragen. Interferenz der gebeugten Röntgenstrahlen findet nur innerhalb dieser Blöcke statt. Im Vergleich zu Kleinmolekülkristallen enthalten Proteinkristalle relativ große Mengen an ungeordnetem Lösungsmittel (30 - 70 %). Wegen des hohen Solventanteils sind die Moleküle in Proteinkristallen relativ locker gepackt, so dass sie empfindlicher gegenüber mechanischer Belastung, Verlust von Kristallwasser und gegen die Einwirkung von Röntgenstrahlung reagieren. Aus diesem Grund müssen sie während der Messung mit ihrer Mutterlauge im

Gleichgewicht gehalten werden. Dies wird so erreicht, dass die Kristalle in luftdicht verschlossenen, silikonisierte Glaskapillaren überführt und mit Mutterlauge überschichtet werden. Eine andere Möglichkeit, dies zu erreichen, ist das Schockgefrieren der Proteinkristalle mit flüssigem Stickstoff. Hierbei ist die Zugabe von geeigneten Substanzen notwendig, die die Eisbildung beim Einfrieren verhindern. Durch die zuletzt angesprochene Cryo-Technik werden die Kristalle auch deutlich unempfindlicher gegenüber Strahlungsschäden.

3.3 Röntgenstrahlung

Um Beugungsphänomene ausnutzen zu können, darf die Wellenlänge der verwendeten elektromagnetischen Strahlung nicht größer sein als die Größenordnung der aufzulösenden Abstände des untersuchten Gegenstands. Das heißt also, dass zur Auflösung atomarer Abstände elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge von 1Å oder darunter benötigt wird. Im elektromagnetischen Spektrum wird dieser Bereich (0.1 Å – 1000 Å) von der Röntgenstrahlung eingenommen. Da mit abnehmender Wellenlänge auch die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie abnimmt, was zu einer Erschwerung der Detektion der gestreuten Röntgenstrahlung führt, verwendet man in der Röntgenkristallographie vorwiegend Röntgenstrahlung mit Wellenlängen zwischen 0,6 Å und 2 Å.

Röntgenstrahlen lassen sich auf unterschiedlichen Wegen herstellen. In kristallographischen Laboren werden vorwiegend Drehanodengeneratoren verwendet. In diesen treffen die von einer Glühkathode emittierten und im elektrischen Feld beschleunigten Elektronen mit hoher kinetischer Energie auf das Anodenmaterial, bei dem es sich in der Regel um Kupfer oder Molybdän handelt. Durch Abbremsen der Elektronen an der Anode wird ein Teil der kinetischen Energie der Elektronen in Bremsstrahlung mit kontinuierlicher Energieverteilung umgewandelt. Der andere Teil der Energie der beschleunigten Elektronen verursacht das Herausschlagen von Elektronen aus den Atomen des Anodenmaterials. Die dadurch entstehenden Fehlstellen innerhalb der atomaren Energieniveaus werden unter Emission der charakteristischen Röntgenstrahlung durch Elektronen aus höheren Energieniveaus aufgefüllt. Im Falle der Standardkupferelektrode handelt es sich um Übergänge, die von der L-Schale ausgehen und auf der K-Schale des Kupfers enden. Die verwendete Wellenlänge ist eine Mischung

$K_{\alpha 1}$ (1,54051 Å) und $K_{\alpha 2}$ (1,54433 Å). Andere Anteile, wie zum Beispiel die deutlich schwächere Bremsstahlung, können über Monochromatoren herausgefiltert werden.
Eine andere Quelle zur Herstellung von Röntgenstrahlen sind Synchrotronstrahlungquellen. Hier entsteht die Röntgenstrahlung durch Bewegung von Ladungen auf einer Kreisbahn. An Geräten wie Wigglern oder Undulatoren wird durch Magnetfelder Röntgenstrahlung von hoher Intensität erzeugt. Die bei einem Synchrotron entstehende Bremsstrahlung erstreckt sich über einen großen Wellenlängenbereich. Die für das Experiment gewünschte Wellenlänge kann dann über einen durchstimmbaren Monochromator ausgewählt werden. Damit lassen sich Wellenlängen von etwa 0,9 Å bis 1,8 Å einstellen. Neben der freien Wahl der gewünschten Wellenlänge ist ein Vorteil der Synchrotronstrahlung auch die hohe Intensität, die dazu führt, dass sich die Messzeiten deutlich verkürzen.

3.4 Beugung von Röntgenstrahlen an Einkristallen

Röntgenstrahlen, die auf ein Kristallgitter aus Atomen bzw. Molekülen treffen, regen die Elektronen der im Gitter angeordneten Atome zur Schwingung an. Dabei entspricht die Frequenz dieser Schwingung der Frequenz der einfallenden elektromagnetischen Welle. Folge der Anregung ist, dass diese Elektronen ihrerseits elektromagnetische Strahlung gleicher Frequenz in alle Raumrichtungen emittieren, die im Phasenwinkel um 180 ° zum Primärstrahl verschoben ist. Die beobachtete Strahlung ist die Summe aller einzelnen von den Elektronen emittierten Wellen und wird als kohärente Streuung bezeichnet wird. Die emittierten Wellen summieren sich in den meisten Richtungen zu null (destruktive Interferenz). Nur in ausgezeichneten Richtungen kommt es zu konstruktiver Interferenz, das heißt, es entsteht eine von Null verschiedene Streustrahlung. Solange die Energie der einfallenden Röntgenstrahlung nicht mit diskreten energetischen Übergangen innerhalb der Atome übereinstimmt, was für die leichten Atome, wie Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff immer gilt, kann man die beobachteten Streueffekte als Beugung von Röntgenstrahlung an freien Elektronen behandeln.
Zur mathematischen Beschreibung dieses Sachverhalts kann in Analogie zur Beugung von sichtbarem Licht die Bragg`sche Gleichung verwendet werden:

$$2d_{hkl}\sin\theta_{hkl}=n\lambda \qquad (1)$$

d_{hkl} Abstand der Gitterebenen, θ_{hkl} Glanzwinkel, n ganze Zahl, λ Wellenlänge

Der Bragg`schen Gleichung liegt die Vorstellung zugrunde, dass Röntgenstrahlen mit der Wellenlänge λ an Gitterebenen mit dem Abstand *d* unter dem Glanzwinkel θ gespiegelt werden. Jeder Kristall enthält eine Vielzahl dieser Gitterebenen, die mit den Millerschen Indizes *hkl* bezeichnet werden. Dabei schneidet die Ebene *hkl* die a-Achse in *a/h*, die b-Achse *b/k* und die c-Achse in *c/l*. Index 0 bedeutet, dass die entsprechende Achse nicht geschnitten wird, also parallel zur Achse verläuft. Konstruktive Interferenz tritt nur dann auf, wenn der Gangunterschied ($2d\ sin\theta$) ein Vielfaches der Wellenlänge beträgt. Unter Berücksichtigung eines feststehenden Eingangsstrahls und eines sich drehenden Kristalls, lassen sich die Richtung der gestreuten Strahlen ermitteln. Sowohl *d* als auch θ hängen dabei bei gegebener Kristallorientierung von der Wahl der Gitterebene ab. Punkte mit konstruktiver Interferenz spannen ein Gitter auf, das mit dem realen Gitter im Kristall in reziprokem Verhältnis steht. Im reziproken Gitter repräsentieren dessen Gitterpunkte die Interferenzmaxima des Beugungsbilds. Die Gitter im reziprokem und im realen Raum sind durch Fouriertransformation ineinander überführbar. Aufgrund dieser Überführbarkeit lässt sich die räumliche Struktur des Moleküls in der Einheitszelle bestimmen. Eine andere Darstellung des Beugungsphänomens ist die Ewaldkonstruktion (Ewald PP 1921). In der Ewaldkonstruktion ist konstruktive Interferenz nur dann erfüllt, wenn der Gittervektor S der Gitterebene (siehe Abbildung 6) vom Ursprung des reziproken Gitters (O) aufgetragen die Ewaldkugel schneidet (P). Verbindet man P mit dem Kristall in M ergibt sich die Richtung des gestreuten Strahls s. Der eintretende Strahl s_0 wird im Winkel 2θ als Strahl s gestreut. Das reziproke Gitter dreht sich mit dem Kristall (dem realen Gitter) um den Punkt O. Durch diese Rotation erfüllen immer andere Gitterpunkte die Beugungsbedingungen. Darüber hinaus zeigt das Modell der Ewaldkonstruktion, dass die Anzahl der messbaren Reflexe nur von der Wellenlänge und von den Zellkonstanten der Einheitszelle anhängt. Da der Radius der Ewaldkugel $1/\lambda$ beträgt, können nur reziproke Gitterpunkte in einem Abstand von $2/\lambda$ vom Ursprung der Ewaldkugel durch Rotation in Kontakt mit der Ewaldkugel gebracht werden. Das bedeutet, dass sich bei Verwendung kürzerer Wellenlängen, die Anzahl an messbaren Reflexen erhöht, weil sich der Radius der Ewaldkugel vergrößert und mehr Reflexe in Kontakt mit ihr treten können. Eine große

Einheitszelle bedeutet eine kleine reziproke Zelle, was dazu führt, dass die reziproken Gitterpunkte näher zusammenrücken und die Anzahl an messbaren Reflexen ebenfalls ansteigt.

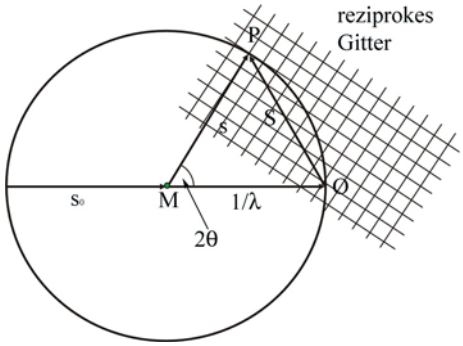


Abbildung 6: **Graphische Darstellung der Ewald-Konstruktion**

Mit der Ewaldkonstruktion läßt sich die Richtung des gestreuten Strahls bestimmen. Die Kugel um den Kristall M besitzt den Radius 1/λ. Der Ursprung des reziprokem Gitters (reciprocal lattice) liegt in O. Die Richtung des einfallenden Strahls ist s_0, die Richtung des gestreuten Strahls ist s und S ist ein reziproker Gittervektor. Die Bedingung für einen Reflex ist erfüllt, wenn sich ein Punkt (P) des reziproken Gitters auf dem Kreis befindet (aus Drenth 1994).

Die totale Streueinheit ergibt sich aus der Interferenz der Elementarwelle, die von jedem Punkt endlicher Elektronendichte ausgehen. Im Falle elastischer Streuung werden Wellen mit gleicher Wellenlänge ausgesandt. Die Resultierende der Streuung an einer Elementarzelle des Gitters ist:

$$\mathrm{F(S)} = \sum_{j=1}^{n} f_i \exp[2\pi r_j S] \qquad (2)$$

Es ist F(S) der Strukturfaktor des reziproken Gitterverktors S der gerade die Reflexbedingung erfüllt (siehe Abbildung 6). Der Vektor r_j gibt die Position des Atoms *j* an (in fraktionellen Koordinaten als Bruchteil der Zellkonstanten), der Atomformfaktor f_j berücksichtigt die endliche Ausdehnung eines Atoms und die damit aufgrund destruktiver Interferenz nachlassende Streukraft bei größeren Streuwinkeln.

Eine Elektonendichteverteilung in einem Kristall am Ort (*x*,*y*,*z*) wird durch folgende inverse Fouriertransformation über alle Stukturfaktoren berechnet:

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{\mathrm{V}} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \qquad (3)$$

Die Elektronendichteverteilung ρ an jedem Punkt (*x*,*y*,*z*) in einem Kristall lässt sich aus der Strukturfaktoramplitude F*(hkl)*, die proportional zu Quadratwurzel der gemessenen Intensität *I* für den Reflex (*hkl*) ist, der entsprechenden Phase α_{hkl} und dem Volumen V der Einheitszelle berechnen. Sie ist die primäre Information über den Kristallinhalt, die mit der Kristallographie zugänglich ist, und sie ermöglicht die Lokalisierung der Atome in der Zelle, da die beugenden Elektronen zu den Atomen in der Einheitszelle gehören. Die einzige Größe, die einer direkten Messung nicht zugänglich ist, ist die Phase α_{hkl} eines Reflexes, da aus den integrierten Reflexintensitäten nur die Strukturamplituden $|F_{hkl}|$ bestimmt werden können. Der Phasenwinkel α muss deshalb auf einem anderen Weg erhalten werden. Diesen Sachverhalt bezeichnet man als das Phasenproblem der Kristallographie.

3.5 Datenprozessierung

Um den gesamten reziproken Raum zu erfassen, wird der Kristall im Röntgenstrahl mit einer vorgegebenen Belichtungszeit pro Winkeleinheit gedreht. Die gestreuten Strahlen werden meist mit einem Flächenzähler (Bildplatte) aufgenommen. Die Bildplattendetektoren besitzen eine Platte, die mit einem röntgensensitiven Material beschichtet ist. Durch das Auftreffen von Röntgenquanten auf diese Schicht, werden Elektronen in langlebige, metastabile Zustände angehoben. Nach Ende der Belichtung wird das Bild durch das rote Licht eines Lasers örtlich aufgelöst ausgelesen. Dabei wird der Übergang der angeregten Elektronen in den Grundzustand ermöglicht, wobei die bei diesem Übergang freiwerdende Energie in Form von blauem Licht emittiert wird. Die Intensität dieser Strahlung ist proportional zur Anzahl der aufgetroffenen Röntgenquanten. Für die nächste Messung wird die gespeicherte Information durch Belichtung gelöscht. Neben der Bildplatte finden auch CCD (*Charge coupled Device)*- und Vieldrahtproportionalitätsdetektoren Verwendung.

Die Reflexpositionen werden indiziert, die Lauegruppe und die Zellkonstanten des Kristalls bestimmt. Die Reflexe werden mit vorausgesagten verglichen und deren Intensität gemittelt. Von einem Kristall wird meist ein redundanter Datensatz mit symmetrieäquivalenten Reflexen aufgenommen. Nach Integration der Reflexe folgt die

Skalierung und Reduktion der Daten, was zu einer Liste aller unabhängigen Reflexe führt, die sich aus der asymmetrischen Einheit im Kristall ergeben und die nicht durch Symmetrieoperatoren ineinander überführt werden können. Die asymmetrische Einheit ist die Menge an Atomen, mit der durch Symmetrieoperatoren die gesamte Einheitszelle beschrieben werden kann. Schraubenachsen im realen Raum führen im reziproken Raum zu systematischen Auslöschungen von Reflexen.

3.6 Das Phasenproblem

Wie in Kapitel 3.4 schon erwähnt, lassen sich aus dem Beugungsexperiment nur die Amplituden der Strukturfaktoren bestimmen. Die für eine erfolgreiche Elektronendichteverteilung im Kristall ebenfalls benötigten, zu den Strukturfaktoren gehörenden Phasen müssen über verschiedene Umwege ermittelt werden. Zur Bestimmung der Phasen stehen dem Kristallographen insgesamt vier Methoden zur Verfügung:

1) Isomorpher Ersatz (SIR und MIR)
2) Multiple anormale Dispersion (MAD)
3) Molekularer Ersatz (MR)
4) Direkte Methoden

Die in dieser Arbeit gelösten Strukturen wurden mit den Methoden des Molekularen Ersatzes (DESC-1) und der Multiplen anormalen Dispersion MAD (Tricorn interagierender Faktor F3) gelöst. Aus diesem Grund wird auf die Beschreibung der Methode des isomorphen Ersatzes MIR und der direkten Methoden verzichtet.

3.7 Die Pattersonfunktion

Wichtigstes Hilfsmittel zur Lösung des Phasenproblems ist die Pattersonfunkion. Bei der Patterson-Funktion handelt es sich um eine Fouriersummation mit quadrierten Strukturfaktoren und mit allen Phasenwinkeln $\alpha = 0$ (Patterson 1934).

$$\mathrm{P}(uvw)\frac{1}{\mathrm{V}} = \sum_{hkl} |F^2(hkl)| \cos\left[2\pi(hu + kv + lw)\right] \qquad (4)$$

Dabei sind *u*, *v* und *w* die Achsen der Pattersonzelle, die identisch mit der realen Einheitszelle *x*, *y* und *z* sind. Dadurch, dass in den quadrierten Strukturfaktoren keine Phaseninformation enthalten sind, kommt in einer Pattersonsynthese nur noch der allein in

den Intensitäten enthaltene Teil an Strukturinformation zum Tragen, nämlich der über die interatomaren Abstandsvektoren. Die Peaks in einer Pattersondichte entsprechen also den intramolekularen Abstandvektoren zwischen den Atomen einer Struktur und sind nur von der Orientierung des Moleküls in der Einheitszelle abhängig.

3.8 Molekularer Ersatz

Beim Molekularen Ersatz werden die Phasen durch ein entsprechend des nativen Proteindatensatzes korrekt positioniertes Proteinmodell mit hinreichender Ähnlichkeit zur aktuellen Struktur bestimmt. Unter Verwendung der vom Suchmodell berechneten Phasen und der gemessenen Strukturfaktoramplituden wird dann eine Elektronendichteverteilung berechnet, die bei einem hinreichend ähnlichen Suchmodell die Lösung der neuen Struktur ermöglicht. Für die Anwendung dieser Methode sollte das Suchmodell eine Sequenzidentität von mindestens 30 % aufweisen. Nachdem ein aussichtreiches Suchmodell gefunden ist, besteht die weitere Aufgabe in der korrekten Positionierung dieses Modells in der Einheitszelle. Im Allgemeinen ergeben sich drei Rotations- und drei Translations-, also insgesamt sechs Freiheitsgrade. Eine solche Suche im sechsdimensionalen Raum ist zwar im Prinzip möglich, erfordert aber meist einen nicht realisierbaren Rechenaufwand. Die Benutzung der Pattersonfunktion ermöglicht es, die Rotations- und Translationsfreiheitsgrade getrennt abzusuchen, was in zwei dreidimensionalen Suchen resultiert, deren rechnerischer Aufwand deutlich geringer ist. Das Prinzip der Pattersonsuche beruht darauf, dass das Suchmodell in einer dreidimensionalen Suche jeweils um gewisse Inkremente gedreht wird und von jeder dieser resultierenden Orientierung die Strukturfaktoren (F_{calc}) und daraus wiederum eine Pattersondichte berechnet wird. Diese wird mit der Pattersondichte des gemessenen Protein-Datensatzes (F_{obs}) verglichen und mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten $C(|F_{obs}|^2, |F_{calc}|^2)$ quantisiert.

$$C(P_{obs}, P_{calc}) = \int_u P\left(\left|F_{obs}\right|^2, u\right) x P\left(\left|F_{calc}\right|^2, u\right) du \qquad (5)$$

Stimmt die strukturelle Orientierung des Proteins in der zum gemessenen Datensatz gehörigen Einheitszelle überein, so erhält man einen Peak für den Korrelationskoeffizienten. Im zweiten Schritt wird das orientierte Suchmodell durch die Einheitszelle geschoben. Die Bewertung der korrekten Lage kann hier sowohl über den

kristallographischen R-Faktor (siehe Abschnitt 3.11) als auch über den Korrelationskoeffizient erfolgen.

3.9 Multiple Anomale Dispersion (MAD)

Die Methode der Multiplen Anormalen Dispersion (MAD) beruht auf der Eigenschaft von Schwermetallatomen, Röntgenstrahlung spezifischer Wellenlänge zu absorbieren. Für die multiple anomale Dispersion sind zum einen Röntgenstrahlung von frei wählbarer Wellenlänge und zum anderen das Vorhandensein von anomal streuenden Atomen im Kristall erforderlich. Die anomal streuenden Atome können entweder im entsprechenden Protein natürlich vorkommen oder als Schwermetallderivate präpariert werden. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, das gewünschte Protein in einem Selenomethionin enthaltenden Medium zu exprimieren, was zum biologischen Einbau dieser Selenverbindung anstelle der natürlichen Aminosäure Methionin führt. Die Änderung des realen Streubetrags, hier als dispersive Differenz bezeichnet, wird durch die Messung bei verschiedenen Wellenlängen, von denen eine genau der Absorptionskante des anomal streuenden Atoms entspricht, realisiert. Für die Phasenbestimmung wird die in der Nähe der Absorptionskante auftretende Differenz zwischen F_{hkl} und F_{-h-k-l} verwendet.

Der atomare Formfaktor eines anomal streuenden Atoms ist eine komplexe Größe und lässt sich unter Beachtung der von der Wellenlänge anhängigen $f(\lambda)$ und unabhängigen f_0 Anteile darstellen. Die von der Wellenlänge abhängigen Anteile führen aufgrund von Absorptionseffekten sowohl zur Verringerung der Streukraft ($f'(\lambda)$ als auch zu einer Phasenverschiebung ($if''(\lambda)$).

$$F_{anom} = f_0 + f(\lambda) = f_0 + f'(\lambda) + if''(\lambda) \qquad (6)$$

Sowohl die dispersive Differenz, die auf unterschiedlichen Werten von $f'(\lambda)$ bei verschiedenen Wellenlängen beruht, als auch die anomale Differenz, die in Abhängigkeit von der Größe $if''(\lambda)$ das Friedelsche Gesetz innerhalb eines Datensatzes aufhebt, sind proportional zu den Strukturfaktoramplituden des Schweratom-Teilmodells. Das Friedlsche Gesetz besagt, dass die symmetrieäquivalenten Reflexe F_{hkl} und F_{-h-k-l} die gleichen Intensitäten und die gleichen Phasen aufweisen. Im Fall der anomalen Dispersion sind die symmetrieäquivalenten Reflexe nicht mehr gleich und mit Hilfe der daraus resultierenden Differenzen lassen sich das Schweratom-Teilmodell und damit auch das

Phasenproblem lösen. Zu diesem Zweck würde die Aufnahme von zwei Datensätzen des gleichen Kristalls theoretisch ausreichen. Um beide Differenzen zu maximieren, wird in der Regel ein Datensatz bei maximalem *f''* (Absorbtionskante), ein Datensatz bei minimalem *f'* (*Inflection Point*) und ein dritter Datensatz bei einer von der Absorptionskante weit entfernten Wellenlänge (*Remote*) aufgenommen. Der dritte Datensatz, bei dem keine Absorptionseffekte auftreten und *f'* nahe Null ist, erlaubt es, die dispersive Differenz zu maximieren

3.10 Modellbau

Die Interpretation der Elektronendichteverteilung erfolgt mit Hilfe dreidimensionaler Darstellung auf Graphikstationen mit Stereodarstellung. Dazu gibt es verschiedene Programme, mit denen die Elektronendichteverteilung als Konturlinie erscheint. Zum Modellbau werden dann Aminosäurenmodelle eingepasst und diese relativ zur Elektronendichteverteilung bewegt. Es ist sinnvoll in der Elektronendichteverteilung zuerst nach Sekundär-strukturelementen (Helices und Faltblätter) zu suchen. Danach wird ein Polyalaninmodell in die Elektonendichteverteilung gelegt, um den globalen Verlauf der Polypeptidkette zu folgen. Das Erkennen von Seitenketten ermöglicht es, nach Motiven der Polypeptidsequenz zu suchen und in das Modell einzupassen. Mit einem Teilmodell kann eine neuerliche Phasierung zur Verbesserung der Elektronendichteverteilung vorgenommen werden, um damit etwaige undeutliche Bereiche in der Elektronendichteverteilung zu verbessern. Nach Fertigstellung des Proteinmodells erfolgt der Einbau von kristallographisch definierten Wassermolekülen. Das Modell wird dann in mehreren Verfeinerungszyklen fertig gestellt.

3.11 Verfeinerung des Modells

Wenn ein atomares Modell vorliegt, gilt es, dieses mit Verfeinerungsalgorithmen an die experimentell ermittelten Strukturfaktoren anzupassen. Dazu sind die aus dem Modell berechneten Strukturfaktoren mit den beobachteten Strukturfaktoren in optimale Übereinstimmung zu bringen. Dabei gilt es wegen der begrenzten Anzahl an Messungen, die Bindungslängen und -winkel vom Modell durch geometrische Einschränkungen (Engh and Huber 1991) aus „idealen“ Werten von Kleinmolekülstrukturen vorzugeben. Das Maß für die Übereinstimmung ist der kristallographische R-Faktor.

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

F_{obs} sind die aus den gemessenen Intensitäten stammenden Strukturamplituden, F_{calc} sind aus dem Modell berechnet. Der Faktor k bringt beide auf eine einheitliche Skala. Nach der Anpassung der gemessenen mit den berechneten Strukturfaktoren erfolgt die Minimierung der Differenzen nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Das Modell gilt als „richtig“, wenn der R-Faktor bei etwa 0.2 (oder 20 %) liegt. Neben dem kristallographischen R-Faktor gibt es auch noch den freien R-Faktor (Brunger et al. 1998), bei dem unter Ausschluss eines Anteils zufällig ausgewählter Reflexe verfeinert wird. Aus Reflexen ohne Einbeziehung des Modells kann so eine eventuelle Überanpassung des Modells erkannt werden. Die Geometrie gilt als akzeptabel, wenn die *r.m.s.*-Abweichungen der Bindungslängen etwa 0.01 Å und die Abweichung bei den Bindungslängen 2 ° nicht übersteigen.

4. Material und Methoden

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma, Bachem, Fluka, Aldrich, Merck und Roche Diagnostics bezogen. Das Enzym DESC-1 wurde von Dr. Edwin L. Madison (Dendreon, 3030 Sience Park Road, San Diego, CA 92121, USA) und Mitarbeitern kloniert, exprimiert, isoliert, gereinigt, gegen 50 mM HEPES (pH=5,5), 300 mM NaCl, 10 mM Benzamidin dialysiert und freundlicherweise zu Verfügung gestellt.

4.1 Mikrobiologische Methoden

Bei allen Arbeiten mit Bakterien wurde sorgfältig auf die Sterilität der verwendeten Arbeitsgeräte, Medien und Lösungen geachtet. Medien und Lösungen wurden autoklaviert oder sterilfiltriert.

4.1.1 Medien

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium): 1% Trypton
0,5% Hefeextrakt
1% NaCl

Für LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium noch 15 g/l Agar-Agar zugesetzt.

Minimal-Medium: 7,5 mM $(NH_4)_2SO_4$
8,5 mM NaCl
22 mM KH_2PO_4
47,6 mM K_2HPO_4
1 mM $MgSO_4$
20 mM Glukose
50 mg/l Aminosäuren
1 µg/l Ca^{2+}
1 µg/l Fe^{2+}
10 µg/l Thiamin
10 µg/l Biotin
100 µg/l Ampicillin
100 µg Chloramphenicol

Spurenelemente: 0,01 µg/l $MnCl_2$
0,01 µg/l $CuSO_4$ * 5 H_20
0,01 µg $NaMoO_4$
0,01 µg $ZnSO_4$

4.1.2 Bakterien

Die heterologe Expression rekombinanter Proteine erfolgte im folgenden Derivat des *E. coli.* Stammes K12:

E.coli. BL21(DE3)RIL (Novagen, INC. Madison, Wisconsin, USA)
Genotyp: F^-, *omp*T, *hsd*S_B, ($r_B^- m_B^-$), *dcm*, (DE3)

4.1.3 Transformation von *E. coli.*

50 µl elektrokompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in einer 4°C gekühlten Elektroporationsküvette (1mm) mit 1µl plasmidischer DNA versetzt. Die Elektroporation erfolgte bei 1650 V mit dem Elektoporator1000 (BioRad, München). Die transformierten Zellen wurden mit LB-Medium und 1h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

4.1.4 Bakterienkulturen

Eine Einzelkolonie wurde mit einer sterilen Impföse von einer Agar-Platte abgenommen und in 5 ml steriles LB-Medium mit einem Selektionsantibiotikum überführt. Die Kulturen wurden unter Schütteln über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur wurde zum Animpfen von größeren Kulturen im Verhältnis 1:100 oder 1:1000 verwendet.
Für Plattenkulturen wurde das LB-Medium mit 15 g/l Agar-Agar versetzt und autoklaviert. Vor dem Gießen der Platten wurde das bis auf unter 60 °C abgekühlte Medium mit den erforderlichen Antibiotika versetzt. Nach dem Ausplattieren der Bakterien erfolgte die Inkubation bei 37 °C und über Nacht. Bis zur Verwendung wurden die Platten 4 °C gelagert.
Für die Herstellung von Glycerinkulturen wurden 850 µl einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Bakterienkultur mit 150 µl einer 87%-igen, sterilen Glycerinlösung vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte dann bei -80 °C.

4.1.5 Heterologe Expression von F3

Die Expression von F3 erfolgte in dem *E. coli*.-Stamm BL21(DE3)RIL. Dafür wurde von einer Plattenkultur eine Einzelkolonie in 150 ml LB-Medium überführt, das 70 µM Ampicillin und 34µM Chloramphenicol als Antibiotika enthielt, und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 6 l LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Inkubation erfolgte in 2l-Schikanekolben. Die Messung der OD_{600}-Werte erfolgte gegen steriles LB-Medium als Leerwert. Bei einer OD_{600} von 0.8 wurde die Kultur mit 1mM Endkonzentration IPTG induziert und über Nacht bei RT weiterinkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte bei einer OD_{600} von 2,1 durch Abzentrifugation (4200 rpm, 20 min, 4°C). Für die Expression des Selemmethionin-Derivats von F3 wurde der gleiche, aber Selenomethionin-autotrophe Stamm BL21(DE3)RIL verwendet. Die Selenmethionin-Inkorporation erfolgte auf Minimalmedium. Dazu wurden die in LB-Medium gewachsenen Zellen der Vorkultur vorsichtig abzentrifugiert und in der gleichen Menge Minimalmedium wieder resuspendiert. Die Animpfung von 6 l Minimalmedium mit den Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol wurde dann im Verhältnis 1:100 in 2l-Schikanekolben mit dieser Vorkultur durchgeführt. Die Induzierung mit IPTG erfolgte bei einer OD_{600} von 0,5. Nach Induzierung wurden die Zellen über Nacht und bei RT inkubiert. Die Ernte erfolgte durch Abzentrifugation (4200 rpm, 20 min, 4°C) bei einer OD_{600} von 1,3.

4.1.6 Aufschluss der *E. coli* Zellen

Nach dem Ernten durch Abzentrifugation wurden die Zellen in 10 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris pH= 8,0, 100 mM NaCl) pro Liter Kulturmedium resuspendiert und bei -80°C schockgefroren. Nach Auftauen der resuspendierten Zellen wurde eine Spatelspitze Lysozym zugesetzt und 30 min bei RT unter ständigem Drehen der Probe die Zellwände aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde vervollständigt durch 20-minütige Sonifikation (Branson, Macrotip, Stufe 9, *duty cycle* 50%) im Eisbad. Das entstandene Lysat wurde durch Zentrifugation (20000 rpm, 30 min 4°C) von den unlöslichen Bestandteilen der Zellwand befreit und für die weitere Aufreinigung verwendet.

4.2 Proteinchemische Methoden

4.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit der Methode nach Bradford (Bradford 1976) photometrisch bei 595 nm bestimmt. Dazu wurde eine Eichgerade mit

BSA in den Konzentrationen 0,1 bis 15 µg/ml im Absorptionsbereich vom 0 bis 1,2 erstellt. 200 µl Bradfordreagenz (BioRad, München) wurden 1 bis 50 µl Probenlösung versetzt und mit ddH_2O auf 1 ml Volumen aufgefüllt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt.
Konzentrationsbestimmungen wurden darüber hinaus auch photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Dazu wurden 1 - 10 µl der zu bestimmenden Proteinlösung mit ddH_2O auf 1 ml Volumen in Quarzküvetten aufgefüllt und die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Die gemessene Extinktion wurde durch den nach der Sequenz abgeschätzten Extinktionskoeffizient dividiert und ergab die Proteinkonzentration in mg/ml unter Berücksichtigung der jeweiligen Proteinverdünnung.

4.2.2 Umpufferung

Pufferwechsel von Proteinlösungen mit kleinen Volumina (bis 2,5 ml) wurden mit Hilfe von NAP-Säulen (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach dem Prinzip der Gelpermeations-chromatographie durchgeführt.

4.2.3 Aufkonzentration von Proteinlösungen

Zur Konzentration von Proteinlösungen nach dem Prinzip der Ultrazentrifugation wurden Zentrifugationskonzentratoren des Typs Ultrafree, Centriprep und Centricon (Millipore, Eschborn) mit unterschiedlichen Massen-Cutoffs von 5 - 50 kDa verwendet.

4.2.4 Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Qualitätskontrolle der Proteine wurde die Polyacrylamid-Gelelektophorese verwendet. Hierbei wurden die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld in einer diskontinuierlichen, denauturierenden Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die SDS-PAGE wurde mit einem 7 - 10 %igen Sammelgel und einem 12 - 16 %igen Trenngel durchgeführt.

Sammelgel: x ml Acrylamid-Stammlösung (Protogel)
7,5 ml 1M Tris/HCl pH=6,8
300 µl 20 % SDS (w/v)
500 µl Pyronin G (100 mg/ml)
ad 50 ml ddH_2O

Trenngel: y ml Acrylamid-Stammlösung (Protogel)
17,0 ml 2M Tris/HCl pH=8,8
450 µl 20 % SDS (w/v)
ad 90 ml dd H_2O

Es wurden jeweils acht Gele (8,5 x 8 cm^2) in einer Gelgießkammer (Eigenbau, Werkstatt MPI für Biochemie, Martinsried) gegossen Die Trenngellösung wurde nach Zugabe von 90 µl TEMED als Polymerisationsstarter und 450 µl APS (c = 100 mg/ml) in die vorbereitete Aparatur gegossen und mit 5 ml Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Alkoholschicht entfernt, die Sammelgellösung mit 32 µl TEMED und 300 µl APS versetzt und in den Gießstand eingefüllt. Teflonkämme mit 10-18 Geltaschen wurden luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt und die ausgehärteten Gele bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.
Für die Gelelektophorese wurden die Proteinproben mit 2-fach Probenpuffer versetzt und 2 min bei 95 °C induziert. Um den Proteinbanden bestimmte Massen zuordnen zu können, ließ man ein Gemisch aus Proteinen genau definierter Masse bei der Elektrophorese mitlaufen (Sigma Low Marker). Die Elektrophporese erfolgte dann bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA im SDS-Laufpuffer.

2 x Probenpuffer: 100 mM Tris/HCl pH=6.8
200 mM DTT
0,2 % (w/v) Bromphenolblau
20 % (m/v) Glycerin

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl pH=8.3
200 mM Glycin
0,1 % (m/v) SDS

4.1.4 Coomassie Färbung

Polyacrylamidgele wurden nach erfolgter Elektrophorese in einer Coomassie-Lösung gefärbt. Dazu wurden die Gele in der Färbelösung kurz zum Sieden erhitzt, 15 min bei

Raumtemperatur geschüttelt und danach in Entfärbelösung solange gewaschen bis der Hintergrund farblos erschien und die einzelnen Proteinbanden deutlich hervortraten.

Croomassie-Färbelösung:

0,1 % (w/v) Coomassie Brillant Blue R-250
40 % (v/v) Ethanol
10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 40 % (v/v) Ethanol
10 % (v/v) Essigsäure

4.3 Proteinpräparation

4.3.1 Vorbereitung des Endotheliase1/DESC1-Benzamidin-Komplexes zur Kristallisation

Das in 50 mM HEPES (pH = 5,5), 0,3 M NaCl, 10 mM Benzamidin vorliegende Protein wurde mit ddH2O bis zu einer Pufferkonzentration von 0,5 mM HEPES pH = 5,5), 3 mM NaCl, 0,01 mM Benzamidin verdünnt, bis zu einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml aufkonzentriert, sterilfiltriert und dann für die Kristallisationsexperimente eingesetzt.

4.3.2 Herstellung des Endotheliase1/DESC1-BPTI-Komplexes

Zur Herstellung des Endotheliase1/DESC1-BPTI-Komplexes wurde das in 50 mM HEPES (pH = 5,5), 0,3 M NaCl und 10 mM Benzamidin vorliegende Protein gegen 0,5 mM HEPES (pH = 5,5), 0,3 mM NaCl in einem Slide-A-Lyzer (MW-Cutoff 10 kDa, Rothmann) für 10 h bei 4 °C zur Entfernung des Benzamidins dialysiert. Nach Aufkonzentration der benzamidinfreien Proteinlösung wurde über eine NAP-Säule ein weiterer Puffertausch zu 50 mM Tris/HCl (pH = 8,5), 30 mM NaCl durchgeführt. Danach erfolgte die Zugabe von einem 10-fachen Überschuss an BPTI (basischer pankreatischer Trypsin Inhibitor) gelöst in ddH_2O. Das Gemisch wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, aufkonzentriert und dann durch Gelpermeationschromatographie auf einer Superdex S-200 (Amersham Pharmacia, Freiburg) an einem Äkta Explorer 900 (Amersham Pharmacia, Freiburg) aufgereinigt (Laufpuffer: 50 mM Tris/HCl (pH = 8,5, 30 mM NaCl; Flußrate: 0,5 ml/min). Der Proteinkomplex wurde nach einer Retentionszeit

von 30,7 min von der Säule eluiert, mit ddH_20 bis zu einer Pufferendkonzentration von 5 mM Tris/HCl (pH = 8,5), 3 mM NaCl verdünnt, bis zu einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml aufkonzentriert. Danach zur Entfernung von präzipitiertem Protein und anderen Schwebestoffen sterilfiltriert und dann für Kristallisationsexperimente eingesetzt.

4.3.3 Proteinreinigung von F3

Zu Beginn der Reinigung wurde das Lysat einem Hitzeschritt unterzogen, bei dem es für 20 min auf 60 °C erhitzt wurde. Hitzedenaturierte Proteine wurden durch Zentrifugation (25000 rpm, 30 min, 4°C) abgetrennt, der Überstand sterilfiltriert und auf eine Q-Sepharose-Säule aufgetragen, die mit 20 mM Tris/HCl pH = 8,0 und 100 mM NaCl äquilibriert war. Die Säule wurde so lange mit dem Laufpuffer gespült, bis alle nicht gebundenen Proteine entfernt waren. Die Eluierung von F3 erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0,1 – 1,0 M NaCl, wobei F3 bei einer NaCl-Konzentration von 0.25 M von der Säule eluierte. Die gesammelten F3-Fraktionen dieser Säule wurden mit einer hochkonzentrierten Ammoniumsulfat-Lösung bis zu einer finalen Ammoniumsulfat-Konzentration von 1,5 M versetzt und auf eine Octylsepharose-Säule aufgetragen, die mit 20 mM Tris/HCl pH = 8,0, 1,5 M Ammoniumsulfat äquilibriert war. Nicht gebundene Proteine wurden wiederum durch Waschen mit dem Laufpuffer entfernt. F3 wurde dann mit einem linearen Gradienten von 1,5 - 0 M Ammoniumsulfat eluiert. Die F3-Eluierung von dieser Säule erfolgte bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 0,1 M. Anschließend wurde ein Puffertausch zu 20 mM Tris/HCl pH = 8,0, 20mM NaCl durchgeführt und die Proteinlösung mit einer Amicon-Zelle (*Cutoff* 50 kDa) aufkonzentriert. Die aufkonzentrierte Probe wurde durch Gelpermeationschromatographie auf einer Superose 12-Säule (Laufpuffer 20 mM Tris/HCl pH = 8.0, 20 mM NaCl, Flussrate 0,5 ml/min) final gereinigt. Für die Kristallisationsexperimente wurden die gesammelten F3-Fraktionen bis zu einer Proteinkonzentration von 25 mg/ml mit einem Ultrafree-Konzentrator (Cutoff 50 kDa, Millipore, Eschborn) aufkonzentriert, zur Entfernung von präzipitiertem Protein und anderen Schwebestoffen sterilfiltriert und dann unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen ausgesetzt. Die Reinigung des Selenomethionin-Derivats von F3 erfolgte nach dem gleichen, oben beschriebenen Reinigungsprotokoll. Der Verlauf der Reinigung wurde anhand der Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Reinheit der gereinigten Proteine wurde mit SDS-PAGE kontrolliert.

4.4 Kristallographische Methoden

4.4.1 Kristallisation

Die Kristallisationsexperimente erfolgten bei 18 °C nach der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen (*sitting drop*) in ChrysChem Platten (Charles Supper Company). Die Tropfen bestanden aus 1 µl Proteinlösung und der gleichen Menge Reservoirlösung und wurden gegen 300 µl Reservoirlösung äquilibriert. Die ChrysChem Platten wurden mit transparenter Klebefolie (Crystal Clear, MancoInc., Avon USA) gegen Verdunstung luftdicht verschlossen. Der Kristallisationsverlauf wurde über mehrere Monate verfolgt. Als Suchmethode für initiale Kristallisationsbedingungen wurde das Prinzip des *sparse matrix sampling* (Jancarik and Kim 1991) angewandt. Hierzu setzte man das Protein mit definierten Lösungen verschiedener Fällungsmittel, Puffer und Additiven an. Initiale Kristallisationsbedingungen wurden dann durch feinere Variierung der gewählten Parameter, wie zum Beispiel pH-Wert, Konzentration an Protein, an Fällungsmittel sowie sonstiger Additive, Tropfenvolumen und Mischungsverhältnis und Temperatur, optimiert. Um die initialen Kristallisationsbedingungen von DESC-1 und F3 zu eruieren, wurden folgende Kristallisations-*Screens* verwendet:

Crystal Screen I (Hampton, Laguna Niguel)
Crystal Screen II (Hampton, Laguna Niguel)
Crystal Screen Lite (Hampton, Laguna Niguel)
Crystal Screen Cryo (Hampton, Laguna Niguel)
MembFac (Hampton, Laguna Niguel)
Natrix (Hampton, Laguna Niguel)
Wizard I (Emerald Biostructures, Bainbridge Island)
Wizard II (Emerald Biostructures, Bainbridge Island)
Cryo I (Emerald Biostructures, Bainbridge Island)
Cryo II (Emerald Biostructures, Bainbridge Island)

4.4.2 Datensammlung

Zur Aufnahme von Röntgendiffraktionsdaten bei RT wurden die Kristalle in silanisierten Quarzkapillaren (Ø = 0,5 mm, Müller, Berlin) montiert. Beide Seiten der Kapillare wurden mit etwas Reservoirlösung gefüllt, ohne jedoch mit dem Kristall in Kontakt zu treten, und mit Dentalwachs (Richter&Hoffmann, Harvard Dental GmbH) verschlossen. Die

Kapillaren wurden auf einem Goniometerkopf fixiert und die Datensätze unter Verwendung eines Drehanoden-Generators (Rigaku, Tokio) und eines *Image Plate*-Detektors (345 mm, MAR Research, Hamburg) als Serie von Rotationsaufnahmen gesammelt. Als Röntgenstrahlung wurde Graphit-monochromatisierte CuKα-Strahlung mit einer Wellenlänge von 1,5418 Å verwendet. Für die Aufnahme von Datensätzen bei 100 K wurden die Kristalle mit einer Nylon-Schlaufe aus der Mutterlauge genommen und in eine Lösung überführt, der neben den Bestandteilen der Mutterlauge noch ein geeignetes Cryoprotektans zugesetzt wurde, um die Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren der Kristalle zu verhindern. Nach Äquilibrierung mit dieser Lösung wurden die Kristalle wieder mit der Nylon-Schlaufe aufgenommen und entweder direkt in flüssigem Stickstoff oder im Stickstoffstrom (Oxford Cryosystems, Oxford) bei 100 K schockgefroren. Die MAD-Experimente zur Strukturlösung von F3 wurden an der Wiggler BW6 Beamline am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg) unter Verwendung von Synchrotron-Strahlung durchgeführt. Als Detektor wurde ein CCD-Detektor 135 mm (MAR Research, Hamburg) verwendet.

4.4.3 Transformation der F3-Kristalle

Im Fall der F3-Kristalle zeigte sich, dass das Einfrieren in flüssigem Stickstoff unabhängig vom verwendeten Cryoprotektans zu größeren Schäden im Kristallgitter führte mit der Konsequenz, dass sich die Streueigenschaften dieser Kristalle deutlich verschlechterten oder sie nach dem Schockfrieren überhaupt kein Streubild mehr produzierten. Um die Streueigenschaften der Kristalle auch nach dem Einfrieren zu erhalten und um sie noch deutlich zu verbessern, wurden die Kristalle im Probenkopf eines „*Free Mounting Systems*“ (Proteros Biostructures, Martinsried) montiert (siehe Abbildung 7). Dieses System ermöglicht es, den Wassergehalt im Kristall gezielt zu verändern (Kiefersauer et al. 2000). Dazu wird der Kristall entweder in einer handelsüblichen Nylon-Schleife oder auf einer Kapillare in einen Luftstrom mit regelbarer Feuchte platziert. Die relative Feuchtigkeit am Kristall wird zum einen durch die über eine Kühlflüssigkeit eingestellte Temperatur am Probenkopf und zum anderen durch die Temperatur des Luftstromes bestimmt. Die für die relative Feuchtigkeit am Kristall wichtigen Temperaturen wie Gastaupunkt und Gastemperatur können mit einer Genauigkeit von ± 0.02 °C eingestellt werden, was für die relative Feuchtigkeit eine Genauigkeit von ± 0.2 % bedeutet. Die hohe Genauigkeit ist für das Arbeiten an empfindlichen Kristallen notwendig, um Schädigungen

am Kristall zu verhindern und vor allen Dingen um die Reproduzierbarkeit dieser Experimente zu gewährleisten. Zuerst erfolgte die Bestimmung der Startfeuchte mit der Mutterlauge. Bei den F3-Kristallen lag diese Startfeuchte bei 98 %. Dann wurde die Feuchte auf 94 % reduziert und der Kristall wie oben beschrieben auf der Kapillare montiert. Die Qualität des Streubildes wurde mit mehreren, nicht rotierten Diffraktionsaufnahmen überprüft. Nachfolgend wurde der Kristall in eine Nylon-Schleife mit Perfluorpolyether überführt, im Stickstoffstrom schockgefroren und bis zur Aufnahme der Datensätze in flüssigem Stickstoff gelagert. Diese Prozedur führte bei den F3-Kristallen der trigonalen Raumgruppe zu einer finalen Auflösung von 2,7 Å und bei denen der orthorombischen zu einer finalen Auflösung von 2,3 Å.

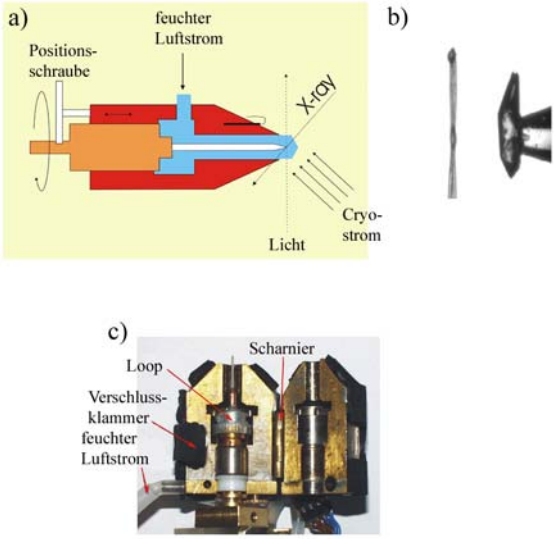


Abbildung 7: Darstellung des „*Free Mounting Systems*“ (Kiefersauer et al. 2000)

a) Schematischer Aufbau des „*Free Mounting Systems*“.

b) Darstellung eines F3-Kristalls auf einer Kapillarspitze montiert.

c) Geöffneter Loop-Kopf

4.4.4 Auswertung und Reduktion der Daten

Die Bestimmung der Kristallorientierung, der Elementarzelle und der Raumgruppe, sowie die Integration der Reflexintensitäten erfolgte mit den Programmen MOSFLM (Leslie *et al*, 1998), XDS (Kabsch et al. 1999) oder DENZO (Otwinowski and Minor 1997). Die weitere Analyse der Daten erfolgte mit den Programmen des CCP4 Programm-Pakets (Bailey 1994) oder des HKL-Programm-Pakets (Otwinowski and Minor 1997).

4.4.5 Strukturlösung

Die Kristallstrukturen des DESC-1/Benzamidin- und des DESC-1-BPTI-Komplexes wurden durch Patterson-Suchmethoden (*Molecular Replacement*) gelöst. Um die Positionen der DESC-1/Benzamidin-Moleküle in der asymmetrischen Einheit zu bestimmen, wurden Rotations- und Translationssuche mit dem Programm AMoRe (Navaza 1994) durchgeführt, wobei Daten von 20 Å bis 3,5 Å verwendet wurden. Das Suchmodell bestand aus der leichten Kette der Enteropeptidase.

Für die Positionierung der DESC-1-BPTI-Moleküle in der asymmetrischen Einheit erfolgten die Rotations- und Translationssuche mit dem Programm MOLREP aus dem CCP4 Programmpaket (Bailey 1994)(CCP4, 1994) mit der DESC-1-Benzamidin-Struktur als Suchmodell.

Für die Strukturlösung des Tricorn interagierenden Faktors F3 wurde die Methode der *Multiwavelength Anomalous Dispersion* (MAD) mit Selenomethionin als anomalen Streuer verwendet. Die 29 Selenpositionen wurden mit dem Programm SHELX (Sheldrick 1984) lokalisiert. Die Verfeinerung dieser Positionen sowie die MAD-Phasierung erfolgten mit dem Programm MLPHARE aus dem CCP4 Programmpaket (Bailey 1994). Anschließendes *Solvent Flattening* wurde mit dem Programm SOLOMON (Bailey 1994) durchgeführt und ergab eine exzellente 2Fo-Fc-Elektronen-Dichte. Das Start-Modell von F3 wurde mit dem Programm RESOLVE (Terwilliger and Berendzen 1999; Terwilliger 2000; 2003) berechnet.

4.4.5 Modellbau und Verfeinerung

Das Modell von DESC-1-Benzamidin wurde mit dem Programm O (Jones and Thirup 1986; Jones et al. 1991) gebaut, während für die Modelle von DESC-1-BPTI und von F3 das Programm MAIN (Turk 1996) verwendet wurde. Die Verfeinerung der Modelle erfolgte mit den Programmen des CNS Programmpakets (Brunger et al. 1998) unter Verwendung von *conjugate gradient minimization* und *simulated annealing,* wobei die stereochemischen Parameter für Bindungslängen und Bindungswinkel von Huber und Engh (Engh and Huber 1991) verwendet wurden. In den finalen Verfeinerungszyklen der einzelnen Modelle wurden automatisch Wassermoleküle eingebaut und manuell durch Begutachtung der F_{obs} - F_{calc} -Differenzdichte überprüft. Als Zielfunktion wurde der freie R-Faktor minimiert, wobei 5 % der Reflexe zufällig ausgewählt und von der Verfeinerung ausgeschlossen wurden.

4.4.6 Elektronendichtemodifikationen

Elektronendichtemodifikationen, wie zum Beispiel Elektronendichtemittelungen oder Elektronendichten mit kombinierten experimentellen Phasen und Modellphasen, wurden mit Programmen aus dem CCP4 Programmpaket (Bailey 1994) und mit MAIN (Turk 1996) berechnet.

4.4.7 Modellanalyse und graphische Darstellung

Molekülgeometrien wurden mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al. 1993) analysiert. Überlagerungen und *least-square-fits* von Koordinaten erfolgten mit dem Programm TOP3D (Bailey 1994). Die Zuordnung der Sekundärstrukturelemente wurde mit dem Programm MOLSCRIPT (Kraulis 1991) durchgeführt. Die graphische Darstellung der Strukturen erfolgte mit den Programmen MOLSCRIPT, Raster3d (Merritt and Murphy 1994; Merritt and Bacon 1997) und PYMOL (Delano 2000). Für die Berechnung von Proteinoberflächen wurde das Programm GRASP (Nicholls et al. 1993) benutzt. Strukturbasierte Alignments wurden mit dem Programm GCG berechnet. Die graphische Darstellung dieser Sequenzvergleiche erfolgte mit dem Programm ALSCRIPT (Barton 1993). Für die graphische Nachbearbeitung, insbesondere für die Kennzeichnung im Text diskutierter Reste, kamen die Programme PHOTOSHOP und CORELDRAW zur Anwendung.

5. Ergebnisse

5.1 Kristallstruktur der Serinprotease DESC-1

5.1.1 Kristallisation von DESC-1 mit Benzamidin und mit BPTI

Die Kristallisationsbedingungen des mit Benzamidin inhibierten DESC-1 wurden durch *sitting drop* Dampfdiffusionsexperimente bei 18 °C herausgefunden. Um erste Kristallisationsbedingungen zu finden, wurden die Crystal Screens der Firma *Hampton Research* verwendet. Erste Kristall-Nadeln erschienen nach zwei Tagen. Die Optimierung der ersten Kristallisationsbedingung führte zu quaderartig geformten Kristallen, die unter folgender Bedingung auf eine Größe von 0,5 × 0,4 × 0,3 mm^3 wuchsen: 0,1 M Tris pH = 8,5 und 8 % (m/w) PEG 8000. Die Kristalle gehörten zu der orthorombischen Raumgruppe $P22_12_1$ und wiesen folgende Zellkonstanten auf: a = 47,9 Å, b = 70,2 Å, c = 80,2 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90°$. Die asymmetrische Einheit dieser Kristalle enthielt ein Molekül DESC-1, was einem Lösungsmittelgehalt von 54 % entspricht. Der DESC-1/BPTI-Komplex wurde unter den gleichen oben angegebenen Bedingungen kristallisiert. Die ersten Kristalle dieses Komplexes wuchsen nach zwei Tagen und erreichten nach einer Woche eine finale Größe von 0,4 × 0,2 × 0,05 mm^3. Die Kristalle gehörten der orthorombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ an mit einem Molekül pro asymmetrischer Einheit entsprechend einem Lösungsmittelgehalts von 45 % und wiesen folgende Zellkonstanten auf: a = 43,88 Å, b = 73,1 Å, c = 88,8 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90$ ° (7a und 7b).

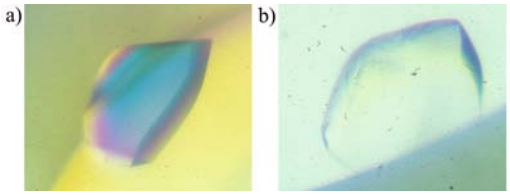


Abbildung 8: Kristalle von DESC-1

a) Kristall von DESC-1 in Benzamidin (Raumgruppe $P22_12_1$)

b) Kristall von DESC-1 in Komplex mit BPTI (Raumgruppe $P2_12_12_1$)

5.1.2 Datenaufnahme

Die mit Mutterlauge überschichteten Kristalle wurden in einer luftdicht abgeschlossenen Kapillare bei Raumtemperatur vermessen. Von den Benzamidin inhibierten DESC-1-Kristallen konnten Datensätze bis zu einer Auflösung von 1,6 Å aufgenommen werden,

während die Kristalle des BPTI-DESC-1-Komplexes nur bis zu einer Auflösung von 3,0 Å streuten. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Diffraktionsaufnahmen an einem Drehanodengenerator (Rigaku RU 200) mit Graphitmonochromator und einem 300 mm Bildplatten-Detektor (MAR Research, Hamburg) aufgenommen. Die Integration wurde mit dem Programm MOSFLM (Leslie 1992) durchgeführt, während für die Skalierung der Daten das Programm SCALA aus der CCP4 Programmsammlung verwendet wurde. Die Statistiken der Datensammlung für den DESC-1-Benzamidin- und den DESC-1-BPTI-Komplex sind in Tabelle 2 angegeben.

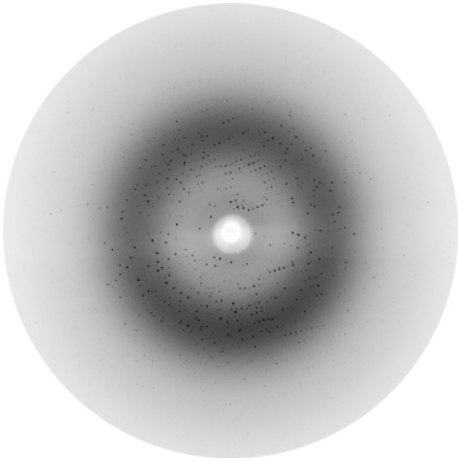


Abbildung 9: Darstellung eines Diffraktionsbildes von einem DESC-1-Benzamidin-Kristall
Das Diffraktionsbild wurde an einem Drehanoden-Generator (Rigaku, Tokio) bei einer Wellenlänge 1,5404 Å mit einem Bildplatten-Detektor (MAR Research, Hamburg) aufgenommen. Der Drehwinkel betrug 1°.

5.1.3 Phasenbestimmung, Modellbau, und Strukturverfeinerung

Phasen für den Datensatz von DESC-1 in Komplex mit Benzamidin wurden mit der Methode des molekularen Ersatzes erhalten. Als Suchmodell diente die leichte Kette der Enteropeptidase (Lu et al. 1999). Für die Rotations- und Translationssuche, um DESC-1 in der asymmetrischen Einheit zu positionieren, wurden Daten zwischen 20 Å und 3,5 Å verwendet. Die Suche erfolgte mit dem Programm AMoRe (Navaza 1994). Die beste Lösung wies einen Korrelationsfaktor von 0.36 und einen R-Faktor von 0.46 auf und setzte sich klar gegenüber der nächstbesten Lösung ab (Korrelationsfaktor = 0,22; R-Faktor = 0,50). Die kristallographische Verfeinerung erfolgte in mehreren Zyklen, die jeweils aus interaktivem Modellbau mit dem Programm O (Jones 1978; Jones and Thirup 1986; Jones et al. 1991), *simulated anealing* und *conjugate gradient* Minimierung mit Programmen aus der CNS Programmsammlung (Brunger et al. 1998) bestanden. Während der gesamten Verfeinerung wurden die geometrischen Zielwerte von Engh &Huber (Engh and Huber

1991) benutzt. Zur Berechnung des freien R-Faktors R_{free} wurden 4.5 % aller Reflexe in einem „*Test Set*“ von der Verfeinerung ausgeschlossen. Zum Abschluss der Verfeinerungsprozedur erfolgte eine individuelle B-Faktorverfeinerung (Temperaturfaktorverfeinerung) und in einer Elektronendifferenzdichteverteilung $F_{obs} - F_{calc}$ wurden kristallographisch definierte Wassermoleküle ermittelt und das erweiterte Model bis zur Konvergenz verfeinert.

Komplex	**DESC-1/Benzamidin**	**DESC-1/BPTI**
Raumgruppe	$P22_12_1$	$P2_12_12_1$
Zellkonstanten		
a/b/c (Å)	47,9/70,2/80.2	43,88 /73,1/88,8
α=β=γ (°)	90 °	90 °
Auflösung (Å)	1,6	3,0
Vollständigkeit		
gesamt (%)	98,1	96,1
Letzte Auflösungs-schale (%)	89,8	88,5
R_{merge} (%)	7,6	21,9
Multiplizität	4,6	4,6

Tabelle 2: Statistik der Datensammlungen der Komplexe DESC-1-Benzamidin und DESC-1-BPTI

Die Verfeinerungsstatistiken sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Positionierung des DESC-1-BPTI-Komplexes in der asymmetrischen Einheit wurde mit dem Programm MOLREP aus der CCP4 Programmsammlung (Bailey 1994) durchgeführt. Als Suchmodell wurde die Benzamidin inhibierte DESC-1 Struktur verwendet. Auch hier setzte sich die Lösung mit einem Korrelationsfaktor von 0,6 und einem R-Faktor von 0,41 deutlich von der nächst Lösung ab (Korrelationsfaktor = 0,41; R-Faktor 0,49). Die Verfeinerungsprozedur erfolgte wie oben beschrieben. Dabei wurde jedoch für den interaktiven Molekülbau das Programm MAIN (Turk 1996) verwendet.

5.1.4 Qualität der DESC-1 Strukturen

Die Hauptketten beider DESC-1 Komplexe sind vollständig in der Elektronendichte definiert. Im DESC-1-Benzamidin-Komplex sind die Seitenketten der Reste Tyr^{114}, Glu^{129},

Lys[137] und Glu[186] nicht in der Elektronendichte definiert, was auf die hohe Beweglichkeit dieser an der Oberfläche liegenden Seitenketten zurückgeführt werden kann.

Komplex	**DESC-1/Benzamidin**	**DESC-1/BPTI**
Unabhängige Reflexe	31409	5749
Reflexe im *working set*	1556	325
Reflexe im *test set*	29853	5424
Proteinatome (nicht-H)	1930	2335
Wasser Moleküle	130	109
Auflösungsbereich (Å)	20-1,6	20-3,0
R_{cryst} (%)[a]	21,13	23,03
R_{free} (%)[b]	22,41	28,87
R.m.s.d. Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0,005	0,01
Bindungwinkel (°)	1.36	1.86
Mittlerer B-Faktor (Å^2)	28,39	109,18
Ramachandran Plot:		
bevorzugt erlaubt (%):	87,9	73,6
zusätzlich erlaubt (%):	10,6	23,3
grosszügig erlaubt (%)	1,0	1,0

Tabelle 3: Verfeinerungsstatistiken der Komplexe DESC-1/Benzamidin und DESC-1/BPTI

Das DESC-1-Benzamidin Modell weist eine exzellente Stereochemie auf. Im Ramachandran Plot befinden sich fast alle Reste in den bevorzugten (87,9%) und zusätzlich erlaubten (10,6%) Regionen. Die R.m.s.d. Abweichungen von den stereochemischen Zielwerten für Bindungslängen und Bindungswinkeln betragen für dieses Modell 0,005 Å und 1,37 °. Im DESC-1/BPTI-Komplex war die Anzahl von in der Elektronendichte nicht definierten Seitenketten auf 10 erhöht, darunter die Seitenketten der BPTI-Reste Leu[6], Lys[46] und Arg[53] und die Seitenketten der DESC-1-Reste Lys[46], Lys[76]. Arg[86], Tyr[114], Glu[129], Arg[204] und Lys[224]. Auch dieses Modell wies exzellente Stereochemie auf mit den meisten Resten in den bevorzugten (73,9%) und zusätzlich erlaubten (23,3%) Regionen des Ramachandran Plots und mit R.m.s.d.-Abweichungen von den stereochemischen Zielwerten für Bindungslängen und Bindungswinkeln von 0,01 Å und

1,87 °. Sowohl die Verfeinerungsstatistiken als auch die Stereochemie der beiden DESC-1 Modelle sind in Tabelle 3 dargestellt.

5.1.5 Beschreibung der Struktur von DESC-1

5.1.5.1 Gesamtstruktur

Die katalytische Domäne von DESC-1 hat die Form einer Ellipse mit Durchmessern von 38 Å und 48 Å. Ähnlich wie andere trypsinartige Proteasen ist die Hauptkette dieser Domäne zu zwei dicht aneinander gelagerten Faltblättern gefaltet, die jeweils aus sechs antiparallel angeordneten β-Strängen bestehen (siehe Abbildung 10). Die beiden Faltblätter bilden fassartige Strukturen, die über drei Verbindungssegmente mit einander verknüpft sind. Die nachfolgend verwendete Nummerierung der Serinproteasereste beruht auf der von Bode (Bode et al. 1992) eingeführten Chymotrypsin-Nummerierung. Die Oberfläche von DESC-1 enthält mehrere Schleifen, eine Helix in 3/10-Konformation (Reste 60i - 62) und zwei α-Helices (Reste 158 – 186 und 225 – 235), die über alle Mitglieder dieser Familie konserviert sind. Die Reste der katalytischen Triade His^{57}, Asp^{102} und Ser^{195} befinden sich entlang der Verbindungszone zwischen den beiden fassartigen, sechssträngigen Faltblättern. Die Substratbindungstasche von DESC-1 verläuft senkrecht zu dieser Verbindungszone von links nach rechts in der in Abbildung 10 gewählten Standardorientierung für trypsinartige Serinproteasen. Die gesamte Proteasedomäne von DESC-1 besteht aus einer A-Kette und einer B-Kette. Die A-Kette, bestehend aus 15 Resten, bildet das so genannte Propeptid, während die B-Kette (Reste 16 – 244) die eigentliche „aktivierte“ Proteasedomäne aufbauen. Die Aktivierung von DESC-1 erfolgt durch die proteolytische Spaltung zwischen Arg^{15} und Ile^{16}, so dass der N-Terminus der „aktivierten“ Proteasedomän durch Ile^{16} repräsentiert wird. Die N-terminale α-Ammonium-Gruppe von Ile^{16} ist durch eine Salzbrücke zur Carboxylatgruppe von Asp^{194} stabilisiert. Diese Salzbrücke ist über alle Mitgliedern der trypsinartigen Serinproteasen konserviert. Die Bildung dieser Salzbrücke nach Abspaltung des Propeptids führt in der Proteasedomäne zu konformationellen Änderungen im aktiven Zentrum mit der Folge, dass die Reste der katalytischen Triade so zu einander positioniert werden, dass eine Substratprozessierung möglich wird. Das verwendete Konstrukt besteht nur aus der „aktivierten“ Proteasedomäne von DESC-1. Diese enthält drei Disulfidbrücken (Cys^{42} – Cys^{58}, Cys^{168} – Cys^{182} und Cys^{191} – Cys^{220}), die ebenfalls in den meisten trypsinartigen Serinproteasen zu finden sind.

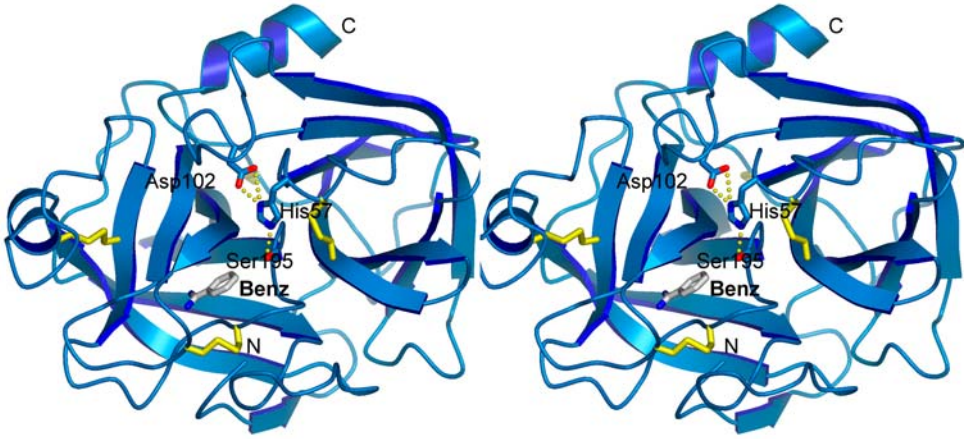


Abbildung 10: Stereobild der Gesamtstruktur von DESC-1 in Komplex mit Benzamidin

Die Reste der katalytischen Triade, das gebundene Benzamidin und die Disulfidbrücken sind als Stabmodell dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gelbe, unterbrochene Linien gezeigt. Helices sind als Spiralen, Faltblätter als Pfeile und verbindende Schleifen sind als Bänder dargestellt. Die gewählte Orientierung von DESC-1 entspricht der Standardorientierung für trypsinartige Serinproteasen.

Neben den drei konservierten Disulfidbrücken weist DESC-1 mit Cys^{122} ein an der Oberfläche positioniertes, ungepaartes Cystein auf, was aber im Falle eines vorhandenen Propeptids eine Disulfidbrücke zum Cys^{1} ausbilden würde. Das C-terminale Ende ist in ähnlicherweise wie der N-Terminus über eine Salzbrücke zwischen der Carboxylatgruppe des C-terminalen Ile^{244} und der Guanidingruppe von Arg^{235} stabilisiert.

5.1.5.2 Architektur des aktiven Zentrums

Die nachfolgende Benennung der Schleifen, die das aktive Zentrum in DESC-1 bilden, erfolgt nach dem Rest, der sich in der Mitte der beschriebenen Schleife befindet.

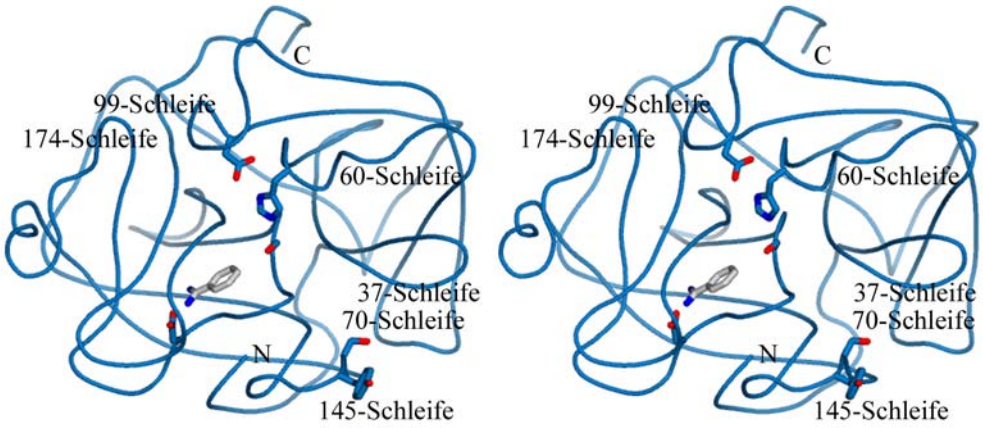


Abbildung 11: Stereodarstellung der Hauptkette von DESC-1

Die Reste der katalytischen Triade sind als Stabmodell dargestellt. Die im Text angesprochnen Schleifen sowie die Substratbindungstaschen von DESC-1 sind gekennzeichnet.

Bei der Beschreibung der einzelnen Schleifen wird die Standardorientierung aus Abbildung 10 (Gesamtansicht) und Abbildung 11 (Hauptkettenverlauf) zu Grunde gelegt. Im Osten der katalytischen Triade ragt die 37er-Schleife aus der molekularen Oberfläche von DESC-1 heraus. Diese Schleife enthält mit Ser^{32} und His^{40} zwei Reste der „zymogenen“ Triade, die zusammen mit Asp^{194} die inaktive, zymogen-artige Konformation des Proenzymes stabilisieren würden (Bode et al. 1978; Bode et al. 1992). Der Norden des aktiven Zentrums wird auf der rechten Seite von der 60-Schleife und auf der linken Seite von der 99er-Schleife begrenzt, die sich beide dachartig über das aktive Zentrum schieben. Die 60er-Schleife ist in dieser Konformation über eine Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxygruppe von Tyr^{60g} und der Guanidin-Gruppe von Arg^{41} stabilisiert. Im Westen erfolgt die Begrenzung durch die 174-Schleife, während der Süden des aktiven Zentrums hauptsächlich durch die 145-Schleife, die auf Grund ihrer Funktion in der autokatalytischen Aktivierung der trypsinartigen Serinproteasen auch als „*Autolysis*“ Schleife bezeichnet wird. Direkt neben der „*Autolysis*“ Schleife und unterhalb der 37er-Schleife befindet sich die 70er-Schleife, die in kalziumabhängigen Serinproteasen, wie zum Beispiel Thrombin, das zweiwertige Kalziumion über die Carboxylatgruppen von Glu^{70} und Glu^{80} bindet. In DESC-1 sind diese beiden Positionen mit Val und Lys besetzt. Die Seitenkette von Lys^{80} in DESC-1 zeigt im Gegensatz zu anderen trypsinartigen Serinproteasen nicht auf Val^{70} zu, sondern wird über eine Salzbrücke zur Carboxylatgruppe von Glu^{24} in die entgegen gesetzte Richtung orientiert.

5.1.5.3 Das aktive Zentrum von DESC-1 und die Substratbindungstaschen

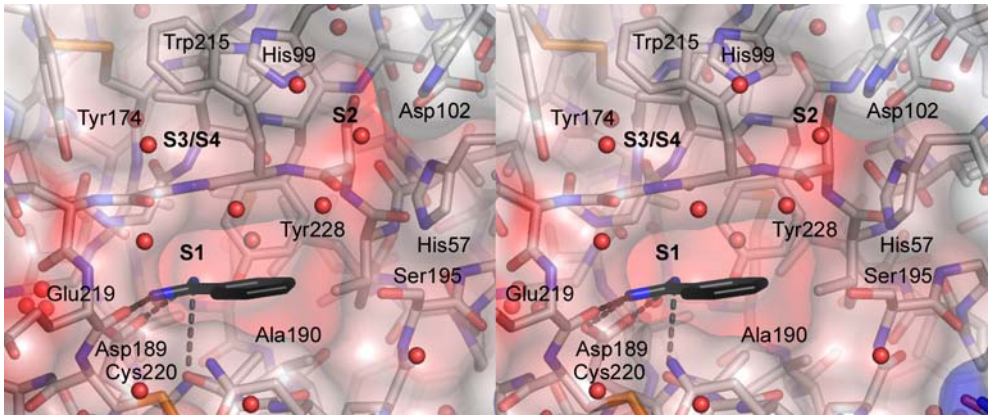
Die Anordnung der Reste, die die katalytische Triade bilden (His^{57}, Asp^{102} und Ser^{195}), sind in DESC-1 in der gleichen Weise angeordnet wie in allen trypsinartigen Serinproteasen. Sowohl die relative Orientierung der Reste zueinander durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen als auch die Bildung des Oxyanion-Lochs durch die Hauptketten-Stickstoffatome von Gly^{193} und Ser^{195} ist in DESC-1 identisch positioniert wie in allen Serinproteasen dieser Familie. Sowohl der in Abbildung 1a dargestellte proteolytische Mechanismus als auch das in Abbildung 1b gezeigte Netzwerk von Wasserstoffbrücken kann direkt auf DESC-1 übertragen werden und charakterisiert DESC-1 direkt als trypsinartige Serinprotease.

Die folgende ausführliche Beschreibung der Substratbindungstaschen von DESC-1 erfolgt in der Reihenfolge, in der die Reste P4 – P3' vom N- zum C-Terminus eines peptidischen Substrats in die Proteintaschen von DESC-1 binden.

S4/S3

Der Boden der S4/S3 Tasche wird durch das aromatische Ringsystem von Trp^{215} gebildet. Zusammen mit Tyr^{174} und Ala^{175} bildet Trp^{215} im Zentrum dieser Tasche eine hydrophobe Fläche, die im Osten durch den Imidazolring von His^{99} zur S2-Tasche hin abgegrenzt wird (siehe Abbildung 12). Im Westen erfolgt die Begrenzung dieser Tasche durch die Seitenkette von Lys^{224}, die über eine ionische Wechselwirkung mit der Carboxylatgruppe von Asp^{217} verbunden ist und deshalb in ihrer Flexibilität stark eingeschränkt ist. Im Süden geht diese Tasche direkt in die S1-Tasche über. Die S4/S3 Tasche ist durch die Ansammlung von hydrophoben Resten an ihrem Boden optimal geformt, um große, hydrophobe P4-Reste aufzunehmen.

a)



b)

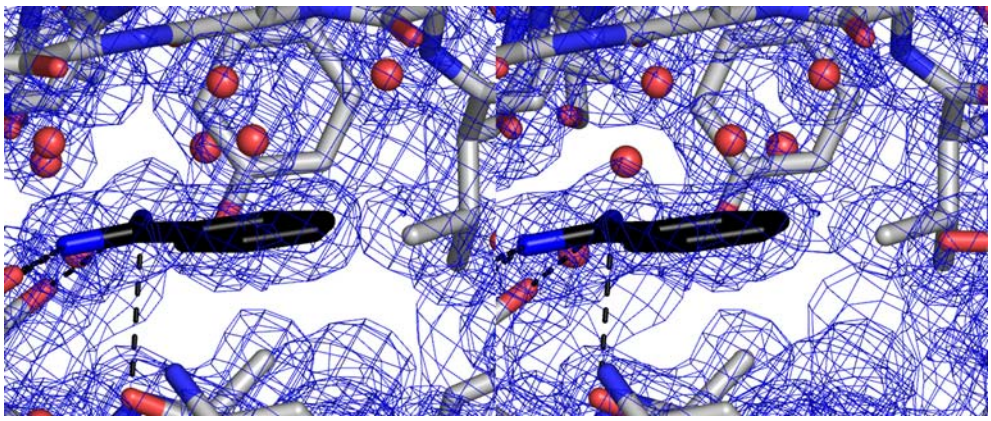


Abbildung 12: Detaillierte Stereodarstellung des aktiven Zentrums von DESC-1 mit semitransparenter Oberfläche

a) Die im Text diskutierten Reste sowie die Substratbindungstaschen sind gekennzeichnet. Die semitransparente Oberfläche ist entsprechend ihrer elektrostatischen Potentiale von -20 (intensiv rot) bis +20 k_BT/e (intensiv blau) eingefärbt.

b) Stereodarstellung des aktiven Zentrums von DESC-1 mit der finalen $2F_{obs}$-F_{calc}-Elektronendichte, konturiert bei 1σ.

Neben den hydrophoben Wechselwirkunken lässt diese Tasche auch polare Wechselwirkungen zu, wie zum Beispiel zur Hydroxygruppe von Tyr^{174}, zu den Stickstoffatomen im Imidazolring von His^{99} oder zu den Carbonylgruppen der Reste 173-174a, die ebenfalls als mögliche Akzeptoren für Wasserstoffbrücken in Richtung der S4-Tasche gerichtet sind. P3-Reste von gebundenen Substraten sind mit ihren Seitenketten aus dem aktiven Zentrum von DESC-1 herausgedreht, wo sie mit der Carboxamidgruppe von Gln^{192} über Wasserstoffbrücken verbunden und stabilisiert werden können.

S2

Die S2-Tasche von DESC-1 grenzt direkt östlich an die S4/S3-Tasche. Wie oben bereits erwähnt, erfolgt die Abgrenzung der beiden Taschen voneinander durch den Imidazolring von His^{99}. Die Tasche erstreckt sich zwischen His^{99} und His^{57} aus der katalytischen Triade, deren Imidazolringe nahezu rechtwinklig beide zu einander orientiert sind. Durch diese Orientierung wird die Tasche zu einer seichten Vertiefung, die keine exakten Grenzen aufweist. Durch die beiden Histidine, die diese Tasche rechts und links begrenzen, finden dort nur kleine, hydrophobe Reste Platz, wie zum Beispiel Glycin oder maximal Alanin. Der Rest in der 99er-Position ist ein kritischer Rest in trypsinartigen Serinproteasen, weil er die S2- von der S4/S3-Tasche trennt und sowohl die chemischen Eigenschaften dieses Restes als auch seine Flexibilität direkten Einfluss darauf haben, welche Reste in beiden Taschen gebunden werden können. Das Histidin in der 99-Position, wie es DESC-1 aufweist, und die damit verbundene Präferenz für kleine, hydrophobe P2-Reste findet man auch in der trypsinartigen Serinprotease *Urokinase-type Plasminogen Activator* (uPA) (Zeslawska et al. 2000).

S1

Die S1 Spezifitätstasche von DESC-1 erstreckt sich westlich von Ser^{195} und direkt unterhalb der S2-Tasche. In DESC-1 bilden diese Tasche folgende Peptidsegmente: Die Reste Asp^{189} bis Gln^{192} formen den Boden der Tasche, während die Peptid-Hauptkette der Reste Ser^{214} bis Glu^{219} den Eingang begrenzen. Nach vorne limitiert die Disulfidbrücke Cys^{191}-Cys^{220} die Tasche, während die Seitenketten der Reste Pro^{225} bis Tyr^{228} die Rückwand formen. Sowohl die Peptidhauptketten als auch die Seitenketten der oben beschriebenen Peptidsegmente machen diese Tasche zu einer tiefen, hydrophoben Tasche, an dessen Grund sich die negativ geladene Carboxylatgruppe von Asp^{189} befindet. Die Asp^{189}-Seitenkette bestimmt in DESC-1 die Spezifität der S1-Tasche für die basischen Reste Arginin und Lysin. Dementsprechend zeigt die Amidinogruppe von Benzamidin direkt auf die Carboxylatgruppe von Asp^{189}, mit der sie über eine 2O-2N-Salzbrücke verknüpft ist. Darüber hinaus ist die Amidinogruppe noch über Wasserstoffbrücken stabilisiert, die sie mit den Hauptgruppencarbonylen der Reste Glu^{219} und Ala^{190} ausbildet. Der Phenylring des Benzamidins ist sandwichartig zwischen die Peptidebenen gelagert, welche die Peptidbindungen der Reste Cys^{191} - Gln^{192} und Trp^{215} - Gly^{216} aufspannen. Entscheidend für die Präferenz der trypsinartigen Serinproteasen für Arginin oder Lysin in P1-Position ist der Rest 190. Serinproteasen die ein Alanin in dieser Position aufweisen,

wie zum Beispiel DESC-1 und Thrombin, bevorzugen Arginin vor Lysin in P1-Position. Bei Serinproteasen, die ein Serin in dieser Position tragen, ist die Präferenz für Lysin stärker als die für Arginin, weil durch die Hydroxygruppe des Serins ein weiterer Wasserstoffbrückenpartner für die Aminogruppe von P1-Lysin zur Verfügung steht und weil ein Serin in dieser Position die S1-Tasche stärker verengt als ein Alanin. Als Folge dieser stärkeren Verengung wird die kleinere Lysin-Seitenkette bevorzugt in diese Tasche gebunden.

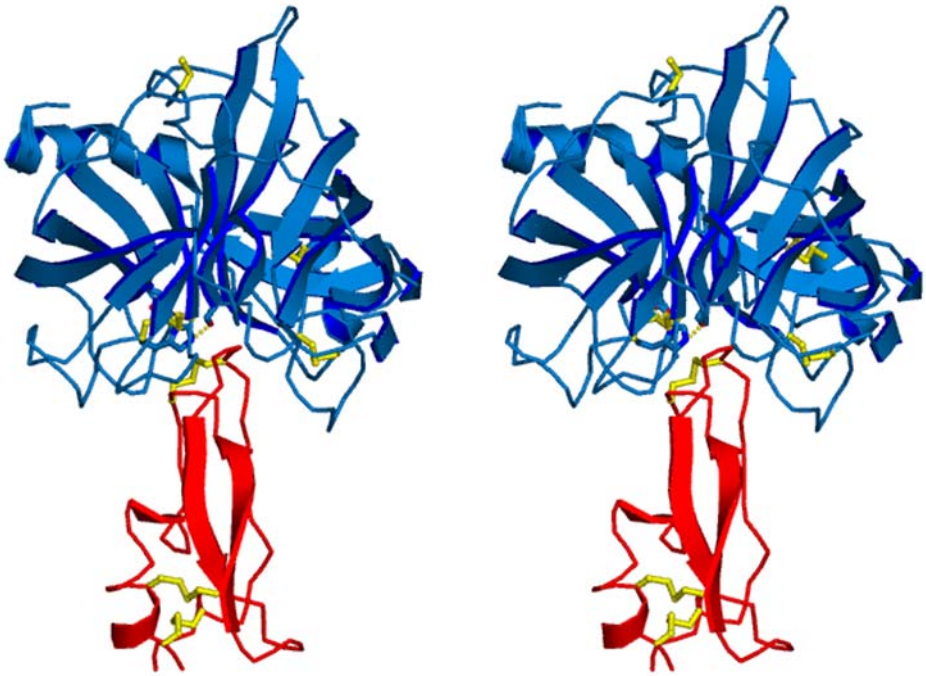
S1'/S3'

Die S1'/S3' Tasche erstreckt sich östlich von Ser^{195} und His^{57} und wird durch die 60er-Schleife in Norden, durch die 145er-„*Autolysis*"-Schleife im Süden und durch die 37er-Schleife im Osten begrenzt. Den Boden dieser Tasche formt die über alle trypsinartigen Serinproteasen konservierten Disulfidbrücke Cys^{42} - Cys^{58}. Die 60er-Schleife überdacht diese Tasche mit den Seitenketten der Reste Thr^{60} und Thr^{60a} im Norden und wird durch eine Wasserstoffbrücke zwischen der Guanidingruppe von Arg^{41} von der 37er-Schleife und der Hydroxygruppe von Tyr^{60g} in dieser Konformation stabilisiert. Die beiden Seitenketten bilden gleichzeitig auch den östlichen Abschluss dieser Tasche. Insgesamt hat auch diese Tasche einen hydrophoben Charakter. Die große Arg^{41}-Seitenkette, die direkt in das aktive Zentrum von DESC-1 zeigt, macht diese Tasche deutlich enger als in anderen Serinproteasen dieser Familie. Die S2'-Tasche von DESC-1 wird in erster Linie von der 145er-Schleife geformt, die insbesondere mit den Seitenketten Tyr^{149} und Ser^{150} diese Tasche deutlich von Süden limitiert. Allerdings ist die Tyr^{149}-Seitenkette vollständig dem Lösungsmittel exponiert und hat damit die Möglichkeit, sich bei der Bindung von größeren Substraten aus dem aktiven Zentrum von DESC-1 herauszudrehen, um so den benötigen Platz in dieser Tasche zu schaffen. Die Hydroxygruppe von Tyr^{149} repräsentiert möglicherweise auch eine weitere Bindungsstelle für Substrate oder für Inhibitoren. Aus der strukturellen Beschreibung der Spezifitätstaschen von DESC-1 direkt hervorgehend lässt sich abschließend für DESC-1 folgende Substratspezifität festlegen: große hydrophobe Reste in P4-Position, kleine hydrophobe Reste wie Glycin oder maximal Alanin in P2-Position, Arg oder Lys in P1-Position und hydrophobe Reste in P1'/P3'-Position des prozessierten Substrats.

5.1.5.4 Beschreibung der Struktur von DESC-1 in Komplex mit BPTI

Bei BPTI (basischer Pankreas Trypsin Inhibitor) handelt es sich um ein aus 58 Resten bestehendes Protein, das eine hohe Affinität zu vielen trypsinartigen Serinproteasen aufweist. Aufgrund dieser hohen Affinität wirkt BPTI bei vielen Serinproteasen als kompetitiver Inhibitor, der das aktive Zentrum der Serinprotease für zu prozessierende Substrate blockt. Auch DESC-1 zeigt hohe Affinität zu BPTI, die zur Ausbildung eines stabilen Komplexes führt, der, wie unter Material und Methoden beschrieben, auch Gelpermeationschromatographie übersteht. BPTI gehört zu der Gruppe der Kunitz-artigen Serinprotease-Inhibitoren. Diese Inhibitoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der P3-Position ein Prolin aufweisen, was zu einem Knick in der Hauptkette in diesem Bereich führt, auf den später in diesem Abschnitt noch genauer eingegangen wird. Die BPTI-Reste sind in der folgenden Beschreibung mit (I) gekennzeichnet. BPTI besteht aus einem zentralen Faltblatt, was aus drei antiparallelen β-Strängen aufgebaut ist, und einer C-terminalen α-Helix (siehe Abbildung 13a). Die sekundären Strukturelemente sind durch mehrere Schleifen miteinander verbunden, von denen die Segmente Gly^{36}(I) bis Arg^{39}(I) (zweites Bindungssegment) und Thr^{11}(I) bis Ile^{18}(I) („*Reactive Site*“-Schleife) mit der Proteasedomäne von DESC-1 wechselwirken. Beide Segmente sind durch die Disulfidbrücke Cys14(I)-Cys38(I) starr miteinander verbunden, was dazu führt, dass BPTI das aktive Zentrum von DESC-1 auseinander spreizt. Die Spreizung erfolgt durch Konformationsänderungen in der 60er-, der 99er- und der 145er-Schleife. Das zweite Bindungssegment Gly^{36}(I) bis Arg^{39}(I) bindet an DESC-1 über die Seitenkette Arg^{39}(I), die mit ihrer Guanidingruppe zwischen His^{99} und Pro^{97} steckt. Stabilisiert wird sie in dieser Position zum einen über die π-Wechselwirkung mit dem aromatischen Imidazolring von His^{99} und zum anderen über eine Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe von Pro^{97}. Die Folge dieser Wechselwirkungen ist, dass die 99er-Schleife nach Norden verschoben ist, so dass das zweite Bindungssegment überhaupt erst Platz erhält, um ins aktive Zentrum von DESC-1 zu binden.

a)



b)

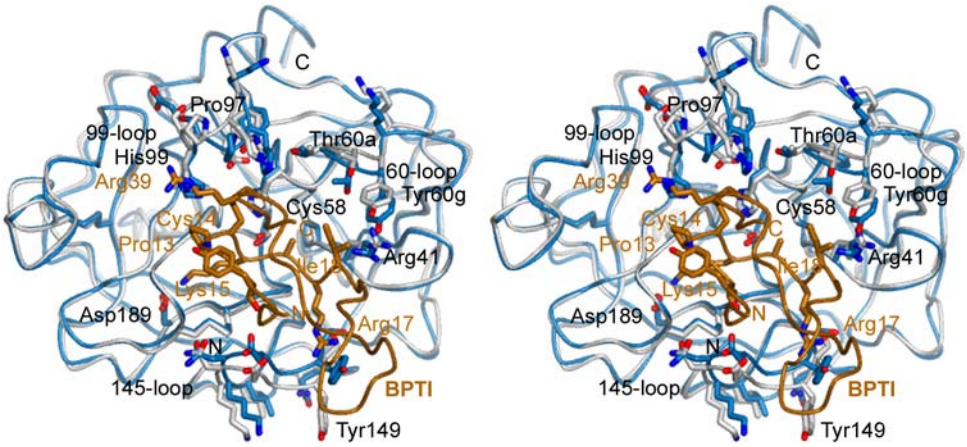


Abbildung 13: Stereodarstellung des DESC-1/BPTI-Komplexes

a) Stereodarstellung der Gesamtstruktur des DESC-1/BPTI-Komplexes

b) Stereodarstellung der überlagerten Komplexe von DESC-1 mit Benzamidin und BPTI. Die im Text diskutierten Reste und Schleifen sind gekennzeichnet.

Die Hauptwechselwirkungen zwischen DESC-1 und BPTI erfolgen jedoch über die „*Reactive Site*“ Schleife, die sich tief ins aktive Zentrum von DESC-1 hineinwindet und dabei die Reste der katalytischen Triade kreuzt. Diese Schleife bildet mit den Hauptketten der DESC-1-Segmente Ser^{214}- Asp^{217} und His^{40}- Arg^{41} ein antiparalleles Faltblatt aus, wie man es auch im Fall peptidischer Substrate findet. Die gespaltene Peptidbindung eines

Substrats wird in BPTI durch die Peptidbindung zwischen Lys^{15}(I) und Ala^{16}(I) repräsentiert, wobei der Lys^{15}(I) Carbonylsauerstoff ins Oxyanion-Loch zeigt. Im DESC-1/BPTI-Komplex wird diese Peptidbindung jedoch nicht hydrolisiert, weil die Carbonylgruppe von Lys^{15}(I) leicht aus dem Oxyanion-Loch herausgedreht ist, was zur Folge hat, dass der entstandene Michaelis-Komplex leicht verzerrt ist und keine proteolytische Spaltung zulässt (Wlodawer et al. 1987; Bode and Huber 1992). Der Teil der „*Reactive Site*"-Schleife, der die Spezifitätstaschen von DESC-1 besetzt, weist folgende Sequenz auf: Pro^{13}(I)-Gly^{14}(I)-Lys^{15}(I)-Ala^{16}(I)-Arg^{17}(I)-Ile^{18}(I). Sie entspricht deshalb nur teilweise der oben beschriebenen Substratspezifität von DESC-1. Die nachfolgende Beschreibung der BPTI-Reste, welche in die Substratbindungstaschen von DESC-1 binden, erfolgt vom N- zum C-Terminus in der Reihenfolge P3 bis P3'. Wie oben schon erwähnt, befindet sich in P3-Position von BPTI Pro^{13}(I). Durch den dadurch verursachten Knick in der Hauptkette wird Pro^{13}(I) in die S4-Tasche von DESC-1 verschoben. Die S2-Tasche von DESC-1 ist von der Disulfidbrücke Cys^{14}(I)-Cys^{38}(I) besetzt, die deutlich größer ist als die für diese Tasche bevorzugten Glycin oder Alanin. Um die S2-Tasche von DESC-1 zugänglich für diese Disulfidbrücke zu machen und um den sterischen Konflikt mit His^{99} zu vermeiden, ist der Imidazolring von His^{99} von dieser Tasche weggedreht (siehe Abbildung 13b). Die hohe Flexibilität der 99er-Schleife und der His^{99}-Seitenkette erlauben es DESC-1 auch deutlich größere Reste als Glycin und Alanin in dieser Tasche zu akzeptieren, die jedoch nur nach konformationellen Änderungen optimal in diese Tasche eingepasst werden können. Die S1-Spezifitätstasche von DESC-1 ist von der Lys^{15}(I)-Seitenkette besetzt, die weit in diese Tasche hineinreicht und am Boden, ähnlich wie Benzamidin, mit der Carboxylatgruppe von Asp^{189} über ionische Wechselwirkung fixiert ist. Die hydrophobe S1'/S3'-Tasche von DESC-1 wird von Ala^{16}(I) und Ile^{18}(I) belegt, die damit die Substratspezifität für diese Taschen recht gut treffen. Allerdings sind auch hier konformationelle Änderungen nötig, die daraus resultieren, dass die Seitenketten von Arg^{41} und Tyr^{60g} diese Tasche von Osten deutlich verkleinern. Um große Substrate wie BPTI zu binden, wird die Arg^{41}-Seitenkette von ihrem Wasserstoffbrückenpartner Tyr^{60g} weggedreht und die gesamte 60er-Schleife wird nach Norden verschoben, wie es auch im Fall der 99er-Schleife zu beobachten ist. Die P2'-Arg^{17}(I) Seitenkette zeigt direkt auf die 145-Schleife und kommt dort in sterischen Konflikt mit der Tyr^{149}-Seitenkette. Die Verschiebung der Tyr^{149}-Seitenkette führt dazu, dass die gesamte Schleife um 1,6 Å in Richtung Süden verschoben wird. Abschließend

lässt sich sagen, dass die Reste P1-P3' von BPTI die Substratspezifität von DESC-1 recht gut treffen und auch die hohe Affinität von DESC-1 zu BPTI erklären. Die Reste P4-P2 von BPTI dagegen weichen doch recht stark bezüglich ihrer Größe (P2-Cys^{14}(I)-Cys^{38}(I)) und bezüglich ihrer Lage im aktiven Zentrum (P3-Pro^{13}(I)) von der für DESC-1 vorhergesagten Substratspezifität ab und tragen dementsprechend nicht wesentlich zur Stärkung dieses Komplexes bei.

5.1.5.5 Oberflächenanalyse von DESC-1

Eine Oberflächenanalyse von DESC-1 bezüglich hydrophober und hydrophiler Bereiche ergibt, dass sich auf der dem aktiven Zentrum gegenüberliegenden Seite von DESC-1 eine große hydrophobe Fläche befindet, die unter anderem von den Resten Tyr^{114}, Ile^{206} und Tyr^{208} gebildet wird (siehe Abbildung 14). Diese hydrophobe Fläche wird in ihrem Zentrum nur durch die basische Arg^{120}-Seitenkette unterbrochen. Aus Abbildung 14 geht darüber hinaus auch hervor, dass die hydrophobe Fläche sich im linken unteren Bereich der Oberfläche zu einem kleinen, hydrophoben Kanal verjüngt, der von der Rückseite des Moleküls zu seiner Vorderseite verläuft.

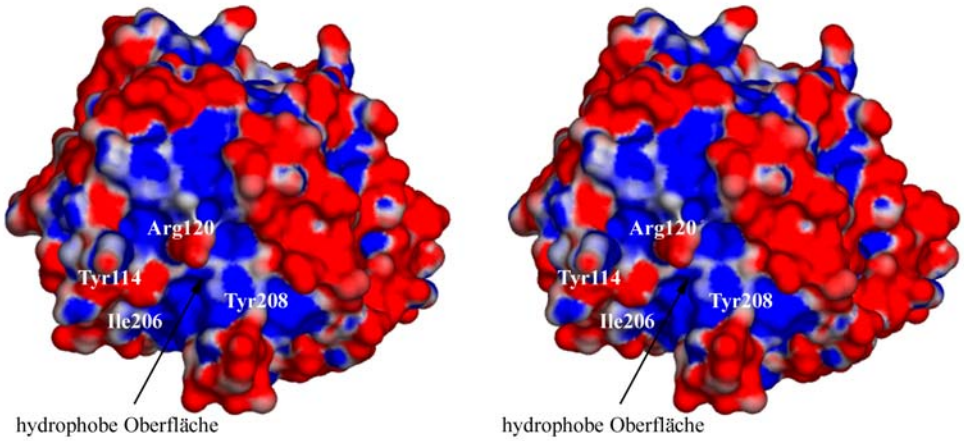


Abbildung 14: Darstellung der Oberfläche von DESC-1

DESC-1 ist in dieser Abbildung um 180° zur Standardorientierung aus Abbildung 10 um die y-Achse gedreht. Die Oberfläche ist eingefärbt in hydrophobe Bereiche (blau) und hydrophile Bereiche (rot). Die hydrophobe Interaktionsfläche ist gekennzeichnet. Die im Text angesprochenen sind gekennzeichnet

5.2 Diskussion

5.2.1 Vergleich der katalytischen Domänen von DESC-1 mit den strukturell bekannten TT-SPs Matriptase, Hepsin und Enteropeptidase

Die Organisation der katalytischen Domänen von DESC-1, Matriptase, Hepsin und Enteropeptidase in zwei dicht aneinander gelagerte, fassartige Faltblätter, die den strukturellen Rahmen für die optimale Positionierung eines peptidischen Substrats im aktiven Zentrum bilden, ist nahezu identisch. Die katalytischen Domänen mit Standardabweichungen (*r.m.s.d.*) von unter 0,8 Å strukturell überlagert werden. Dabei zeigt DESC-1 mit Hepsin (Somoza et al. 2003) die höchste topologische Ähnlichkeit (R.m.s.d. = 0,7 Å) mit 229 topologisch ähnlichen Resten, von denen 96 topologisch identisch sind. Hepsin wird gefolgt von Matriptase (Friedrich et al. 2002) und Enteropeptidase (Lu et al. 1999), die beide *r.m.s.d.*-Werte von 0,75 Å mit DESC-1 aufweisen. Bei Matriptase entspricht das 111 topologisch identischen Resten mit DESC-1, während Enteropeptidase 89 identische Reste mit DESC-1 aufweist. Die topologische Ähnlichkeit der TT-SPs bildet die Grundlage des in Abbildung 15 dargstellten strukturbasierten Sequenzalignments.

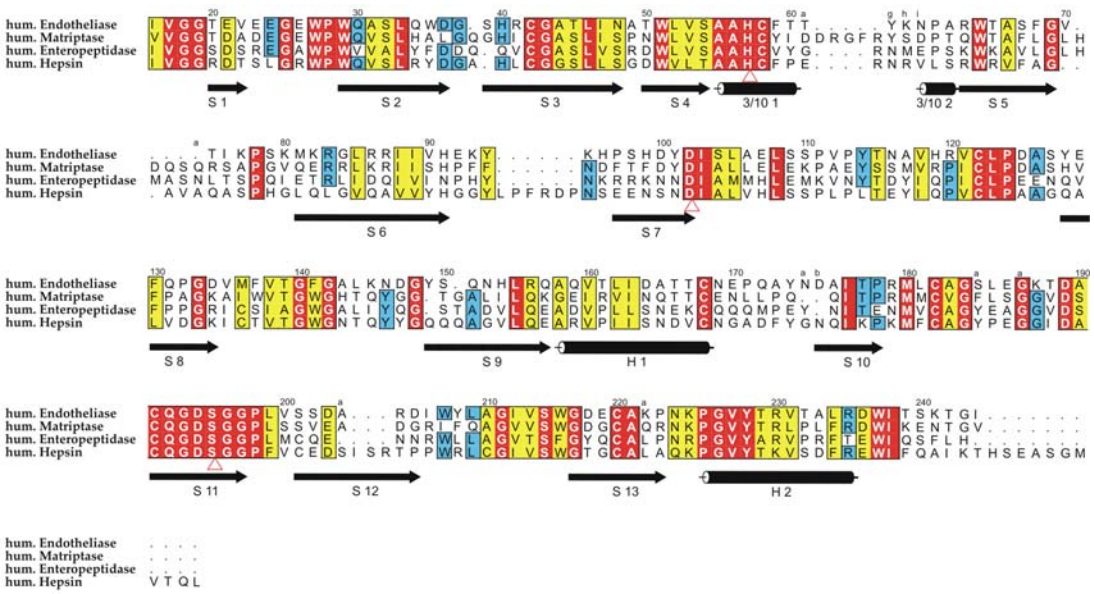


Abbildung 15: Strukturbasiertes Alignment der katalytischen Domäne von DESC-1 mit Matriptase, Enteropeptidase und Hepsin

Die Nummerierung entspricht der Chymotrypsin-Nummerierung. Die Reste der katalytischen Triade sind mit roten Pfeilspitzen markiert. Faltblätter und Helices sind als Pfeile und Zylinder dargestellt.

Trotz der hohen topologischen Ähnlichkeit dieser Serinproteasen, lassen sich doch deutliche Unterschiede in den Schleifen feststellen, die die Spezifität der einzelnen TT-SPs gegenüber unterschiedlichen Substraten und Inhibitoren generieren. Die in Abbildung 16 dargestellte Überlagerung zeigt Abweichungen der einzelnen TT-SPs in der 37er-Schleife, in der 60er-Schleife, in der 70er-Schleife, in der 99er-Schleife und in der 145er-Schleife. Die 37er-Schleife zeigt die geringsten Abweichungen in den einzelnen TT-SPs. Die beobachteten Abweichungen in dieser Schleife resultieren ausschließlich aus den Wechselwirkungen der unterschiedlichen Seitenketten in dieser Schleife, die direkt die Architektur der S1'/S3'-Tasche beeinflussen. Die 60er-Schleife, die die S1'/S3' vom Norden her begrenzt, zeigt insbesondere in Matriptase einen völlig anderen Verlauf als derjenige, der in den anderen TT-SPs beobachtet wird. Die Insertion von vier zusätzlichen Resten in diese Schleife führt zu einer thrombinartigen Überdachung der S1'/S3'-Tasche in Matriptase.

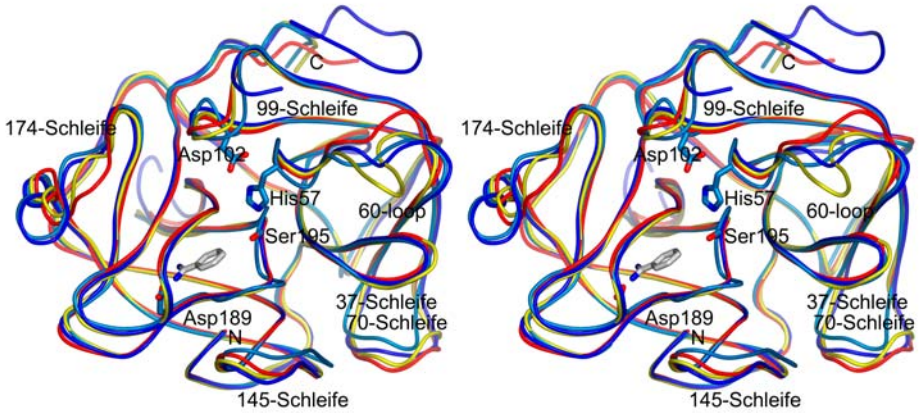


Abbildung 16: Überlagerung der katalytischen Domänen von DESC-1, Matriptase, Enteropeptidase und Hepsin

Die Reste der katalytischen Triade, Asp^{189} und das gebundene Benzamidin sind als Stabmodelle dargestellt. Die Termini und die im Text diskutierten Schleifen sind gekennzeichnet.

In DESC-1 ist diese Schleife um einen Rest kürzer als in Hepsin und Enteropeptidase (siehe Abbildung 16) mit der Konsequenz, dass in DESC-1 die S1'/S3'-Tasche am stärksten durch die 60er-Schleife verengt wird. Die 70er-Schleife, die Kalziumbindungsschleife, ist in DESC-1 nur zu Hälfte vorhanden. Die Reste 71 – 74a fehlen in DESC-1. Das Fehlen dieser Reste erklärt in DESC-1 die besondere Konformation der Lys^{80}-Seitenkette, die im Vergleich zu den anderen TT-SPs nicht auf

Val^{70} gerichtet ist, sondern in entgegengesetzter Richtung durch Glu^{24} fixiert wird. Die wichtigsten Unterschiede in den TT-SPs weist die 99er-Schleife auf, weil der Rest in der 99er-Position, wie oben schon erwähnt, die S4/S3-Tasche von der S2-Tasche trennt, und damit direkt zur Generation von Spezifität in diesen Taschen beiträgt. In Hepsin ist diese Schleife durch die Insertion von sechs zusätzlichen Resten deutlich verlängert und weist damit einen signifikant anderen Verlauf als in den Serinproteasen DESC-1, Matriptase und Enteropeptidase auf. Die Reste 100 - 104 sind in der Kristallstruktur von Hepsin ungeordnet und daher nicht in der Elektronendichte definiert. Die 99er-Schleifen von DESC-1, Matriptase und Enteropeptidase sind zwar von der Länge her identisch, doch die Konformationen in dieser Schleife variieren deutlich, was auf die Sequenzheterogenität (siehe Abbildung 15) dieser TT-SPs in der 99er-Schleife zurückzuführen ist. Bei der 145er-Schleife, der „*Autolysis*"-Schleife, die die S1'/S3'-Tasche von Süden her begrenzt, nimmt DESC-1 im Vergleich zu den anderen TT-SPs eine Sonderstellung ein, weil die Hauptkette und die Seitenketten dieser Schleife diese Tasche deutlich stärker verengen als das bei Matriptase, Hepsin und Enteropeptidase zu beobachten ist. Die Substratbindungstaschen von DESC-1, Matriptase, Hepsin und Enteropeptidase weisen deutliche Unterschiede in den Seitenketten auf, welche die Substratspezifität der einzelnen TT-SPs generieren. Die Konsequenz dieser unterschiedlichen Seitenketten ist, dass zumindest die bisher strukturell bekannten TT-SPs unterschiedliche, nicht überlappende Substrate erkennen und prozessieren. Nachfolgend werden die Seitenketten, die in den Substratbindungstaschen von DESC-1, Matriptase, Hepsin und Enteropeptidase Spezifität generieren, in der Reihenfolge von S4 bis S3' detailliert verglichen (siehe Abbildung 17a-d).

S4/S3

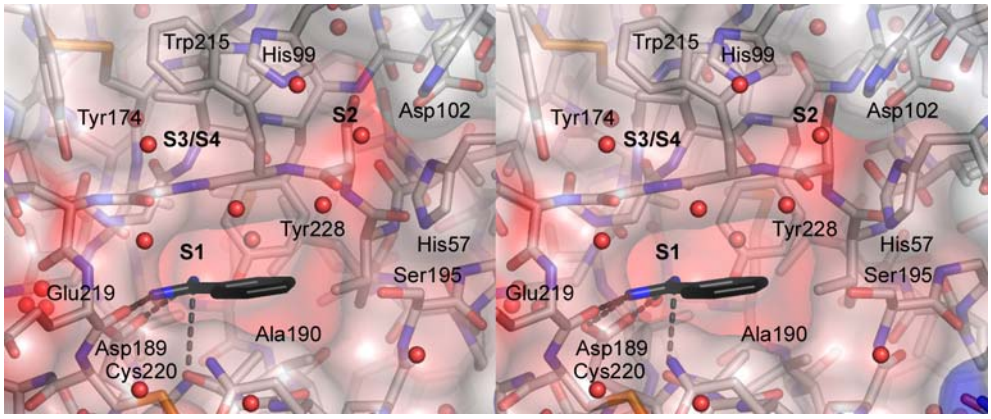
Sowohl die Substratspezifität als auch die Größe dieser Tasche werden zum einen durch den 99-Rest, der diese Tasche im Osten begrenzt, und zum anderen durch den Rest in der 175er-Position bestimmt. Die 175er-Position ist in Matriptase und Hepsin mit Glutamat besetzt, was dazu führt, dass diese Taschen im Vergleich zu DESC-1, was Alanin in dieser Position trägt, deutlich verkleinert sind. In Kombination mit den unterschiedlichen Resten in der 99er-Position (His^{99}/DESC-1, Phe^{99}/Matriptase, Asn^{99}/Hepsin und Lys^{99}/Enteropeptidase) lässt sich vorhersagen, dass alle TT-SPs unterschiedliche Präferenzen für die Reste zeigen, die in diese Tasche binden. DESC-1 bevorzugt große, hydrophobe Reste in der P4-Position, die die Möglichkeit haben, spezifisch mit His^{99} im Osten dieser Tasche zu

interagieren. In Matriptase würde man aufgrund von Phe[99] erwarten, dass ebenfalls große hydrophobe Reste in diese Tasche binden, die allerdings im Unterschied zu DESC-1 die Möglichkeit haben, im Westen dieser Tasche spezifisch mit Gln[175] zu interagieren. Hydrophile P4-Reste binden bevorzugt in die S4/S3-Tasche von Hepsin, weil mit Gln[175] und Asn[99] gleich zwei polare Seitenketten vorhanden sind, die beide mögliche Interaktionspartner für P4-Reste darstellen. Die am stärksten verkleinerte S4/S3-Tasche befindet sich in Enteropeptidase, was auf Tyr[174a] und auf Lys[99] zurückzuführen ist. Es ist grundsätzlich vorstellbar, dass die Lys[99]-Seitenkette in Abhängigkeit zu der in der S2-Tasche gebundene Seitenkette die Möglichkeit hat, eine andere Orientierung anzunehmen, um auch größere P4-Reste aufnehmen zu können, ist grundsätzlich vorstellbar. Die Aspartat-Seitenkette des gebundenen Chloromethylketons (siehe Abbildung 17d) steckt zwischen der aromatischen Seitenkette Tyr[174a] und Lys[99]. Die Präferenz für saure Reste in P4-Position wird also in Enteropeptidase durch die Aminogruppe von Lys[99] generiert.

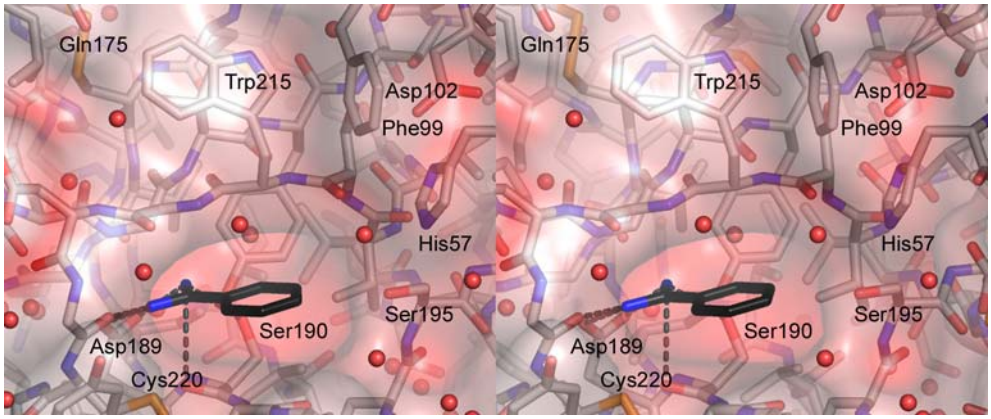
S2

Da der Rest in der 99er-Position die S3/S4- von der S2-Tasche trennt, hat sowohl die Flexibilität als auch die chemische Natur dieses Restes direkten Einfluss auf

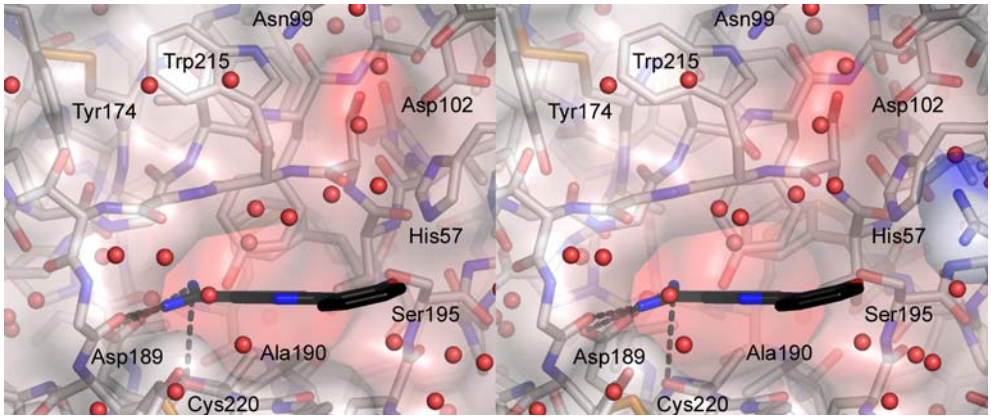
a)



b)



c)



d)

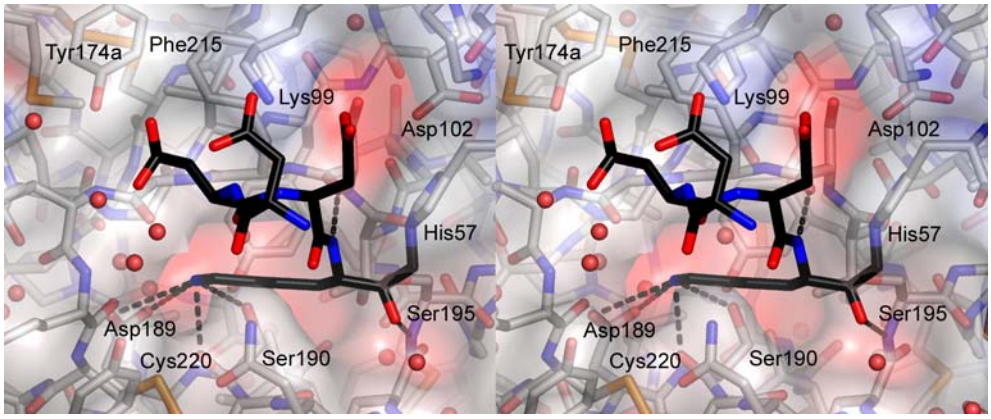


Abbildung 17: Großaufnahme der aktiven Zentren der TT-SPs

a) DESC-1 komplexiert mit Benzamidin

b) Matriptase komplexiert mit Benzamidin

c) Hepsin komplexiert mit 2-(2-Hydroxy-Phenyl)1H-Benzoimidaxol-5-Carboxamid

d) Enteropeptidase komplexiert mit dem Trypsinogen-Aktivierungspeptid Val-$(Asp)_4$-Lys-Chloromethyl-keton.

Alle Inhibitoren sind als schwarze Stabmodelle dargestellt. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die im Text diskutierten Reste sind gekennzeichnet.

die Substratspezifität in dieser Tasche. Da, wie oben bereits erwähnt, der 99er-Rest in allen vier TT-SPs unterschiedlich ist (His/DESC-1, Phe/Matriptase, Asn/Hepsin, Lys/Entero-peptidase), ist dementsprechend auch der Charakter der einzelnen S2-Taschen stark unterschiedlich. Während die S2-Tasche von Matriptase durch Phe^{99} am wenigsten Platz bietet und damit eine starke Präferenz für Glycin aufweist, findet man in Hepsin, dass die Asn^{99}-Seitenkette deutlich vom aktiven Zentrum zurückgezogen ist mit der Folge, dass die S2- und S4/S3-Tasche direkt ineinander übergehen. Die S2-Tasche von Hepsin bietet damit als größte S2-Tasche der verglichenen TT-SPs Platz für große polare Reste, die mit

der Asn^{99}-Amidgruppe wechselwirken können. In der Enteropeptidase trennt die Lys^{99}-Seitenkette im Gegensatz zu Hepsin beide Taschen deutlich und generiert auch in dieser Tasche Präferenz für saure Reste. Die S2-Tasche in DESC-1 zeigt Ähnlichkeit mit der von Matriptase, aber durch Histidin in der 99er-Position ist diese Tasche etwas größer als die von Matriptase und neben Glycin wird auch Alanin dort akzeptiert.

S1

Die S1-Spezifitätstaschen von DESC-1, Matriptase, Hepsin und Enteropeptidase können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die eine Gruppe (DESC-1 und Hepsin) trägt ein Alanin in der 190er-Position, während die anderen Vertreter dieser Gruppe (Matriptase und Enteropeptidase) ein Serin in dieser Position aufweisen. Die Spezifität für die basischen P1-Reste Lysin und Arginin ist allen TT-SPs gemeinsam, aber mit Serin in der 190er-Position ist die Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke mit P1-Lysin möglich, was damit bevorzugt in diese Tasche gebunden wird. Dazu kommt das Serin in der 190er-Position diese Tasche etwas stärker verengt als ein Alanin. Insgesamt zeigen jedoch Punktmutanten in dieser Position (Sichler et al. 2002; Katz et al. 2003), dass der Einfluss dieses Restes auf die Substratspezifität nur gering ist, aber beim Design von spezifischen Inhibitoren durchaus genutzt werden kann, um die einzelnen Mitglieder dieser Familie effizient und spezifisch zu inhibieren. Während DESC-1, Matriptase und Hepsin in Abbildung 17a - c in Komplex mit Benzamidin und mit einem Benzamidin-Derivat (Hepsin) gezeigt sind, ist Enteropeptidase in Abbildung 17d mit dem Trypsinogen-Aktivierungspeptid Val-Asp$_4$-Lys-Chloromethylketon dargestellt (Lu et al. 1999). Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit sind in Abbildung 17d nur die Reste P4 bis P1 des Chloromethylketons dargestellt, während die Reste, die keine Wechselwirkungen mit der Proteasedomäne ausbilden, nicht gezeigt sind. Die synthetischen Benzamidin-Inhibitoren in DESC-1, in Matriptase und in Hepsin zeigen sehr schön die Wechselwirkungen in der S1-Tasche, interagieren aber nicht mit den anderen Substratbindungstaschen. Im Gegensatz dazu besetzten die Aspartate in P2- und P3-Position die S2- und die S4/S3-Tasche von Enteropeptidase, während das Aspartat in P4-Position nach vorne zeigt, aber noch mit Lys^{99}, der östlichen Begrenzung der S4/S3-Tasche, wechselwirken kann. Der Bindungsmodus des Chloromethylketons unterscheidet sich von dem eines peptidischen Substrat darin, dass der P3-Rest in der S4-Tasche untergebracht ist und nicht nach vorne aus dem aktiven Zentrum herausragt, wie man es bei einem peptidischen Substrat erwarten würde. Die Lys^{99}-Seitenkette bildet mit den Aspartaten in P2- und P4-Position Salzbrücken

aus, während der P3 Rest durch Tyr^{174a} mit Wasserstoffbrücken in der S4-Tasche stabilisiert wird (Lu et al. 1999). Darüber hinaus zeigt sich eindeutig, dass die Präferenz von sauren Resten in P2- und P4-Position in Enteropeptidase durch die Lys^{99}-Seitenkette generiert wird.

S1'/S3'

Wie bereits oben erwähnt, bilden die 60er-Schleife, die 37er-Schleife und die 145er-Schleife die S1'/S3'-Tasche. Neben dem unterschiedlichen Verlauf und der unterschiedlichen Länge der 60er-Schleife in DESC-1, Matriptase, Hepsin und Enteropeptidase zeigt sich, dass insbesondere der Rest in der 41er-Position die Größe dieser Tasche bestimmt. Während die Arg^{41}-Seitenkette in DESC-1 mit Tyr^{60g} über eine Wasserstoffbrücke in dieser Position stabilisiert ist, ist die 41-Position in Matriptase, in Hepsin und in Enteropeptidase mit Isoleucin, mit Valin, und mit Leucine besetzt (siehe Abbildung 15). Die Besetzung dieser Position mit deutlich kleineren, hydrophoben Resten lässt die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur 60er-Schleife nicht zu. Das führt dazu, dass die S1'/S3'-Tasche in Matriptase, Hepsin und Enteropeptidase im Vergleich zu der von DESC-1 deutlich vergrößert sind. Die 145er-Schleife, die südliche Begrenzung dieser Tasche und Interaktionspartner für P2'-Reste, ist bei DESC-1 von allen verglichenen TT-SPs am weitesten nach Norden verschoben. Darüber hinaus zeigen die Seitenketten von Tyr^{149} und Ser^{150} direkt in das aktive Zentrum von DESC-1 und verengen dieses noch zusätzlich. Allerdings ist die 145er-Schleife nicht starr, sondern hat die Möglichkeit in Abhängigkeit des P2'-Restes andere Konformationen einzunehmen, wie es im DESC-1-BPTI-Komplex zu beobachten ist.

Vergleicht man die Oberflächen der einzelnen TT-SPs, insbesondere bezüglich hydrophober und hydrophiler Bereiche, stellt man fest, dass die hydrophobe Fläche auf der dem aktiven Zentrum gegenüberliegenden Seite in DESC-1 auch in den anderen TT-SPs zu finden ist (siehe Abbildung 18a - d). Als einziger Vertreter dieser Familie wurde Hepsin neben der Proteasedomäne auch mit der N-terminalen Scavenger Receptor Cystein-Rich (SRCR) Domäne kristallisiert (siehe Abbildung 18a), die auf der Rückseite der Proteasedomäne zwischen der C-terminalen Helix, der 204er-Schleife und der 126er-Schleife starr mit der Proteasedomäne verbunden ist (Somoza et al. 2003). Der C-Terminus von Hepsin ist im Vergleich zu DESC-1, Matriptase und Enteropeptidase um elf Reste verlängert, was dazu führt, dass die C-terminale Helix verlängert ist und dass Hepsin eine zusätzliche C-terminale Schleife aufweist, die mit der Proteasedomäne interagieren kann.

Die Verbindung der beiden extrazellulären Domänen in Hepsin erfolgt durch die Leu^{51}-Seitenkette der SRCR-Domäne, die in eine hydrophobe Vertiefung auf der Oberfläche von Hepsin bindet. Im Gegensatz zu Hepsin ist in DESC-1 und Matriptase diese Verbindung nicht möglich, weil die Position der Leu^{51}-Seitenkette aufgrund der verkürzten C-Termini von DESC-1 und Matriptase von den C-terminalen, hydrophoben Resten Ile^{244} (DESC-1) und Val^{244} (Matriptase) eingenommen wird.

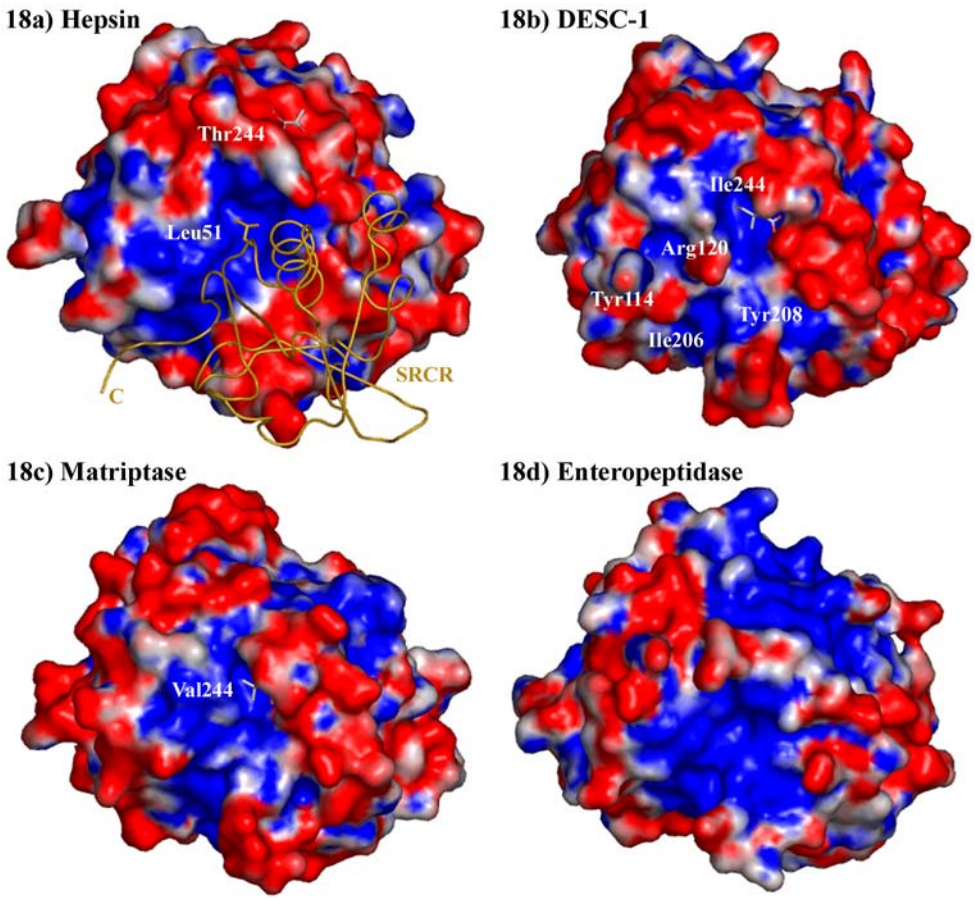


Abbildung 18: Darstellung der Oberflächen von Hepsin (18a), DESC-1 (18b), Matriptase (18c) und Enteropeptidase (18d)

Die Proteasen sind im Vergleich zur Standardorientierung aus Abbildung 10 um 180° um die vertikale Achse gedreht. Hepsin ist mit gebundener SRCR-Domäne gezeigt, die als goldene Cα-Hauptkette dargestellt ist. Die im Text diskutierten Reste sind gekennzeichnet.

In Hepsin ist die 244er-Position mit der weniger hydrophoben Seitenkette eines Threonins besetzt, die aber als Teil der zusätzlichen Schleife an den nördlichen Rand der hydrophoben Interaktionsfläche verschoben ist, sodass die hydrophobe Vertiefung frei für die Leu^{51}-Seitenkette ist. Da die C-terminalen Carboxylatgruppen von Ile^{244} und Val^{244} in

DESC-1 und Matriptase über Salzbrücken zur Guanidingruppe von Arg^{235} stabilisiert sind, ist nicht davon auszugehen, dass die Konformation dieser Seitenketten die Folge der fehlenden N-terminalen Domänen ist. Es scheint eher, dass die Bindung der N-terminalen Domänen an die Proteasedomänen von DESC-1 und von Matriptase in einer anderen Art erfolgt, als in Hepsin über die Leu^{51}-Seitenkette. So könnte in DESC-1 die aus der Mitte der hydrophoben Fläche herausragende Arg^{120}-Seitenkette neben den hydrophoben Resten, die sie umgeben, möglicherweise als Interaktionspartner für negativ geladene Reste der SEA-Domäne dienen. Darüber hinaus kann man in Abbildung 18a sehr schön erkennen, dass der C-Terminus der SRCR-Domäne in einem hydrophoben Kanal verläuft, der sich vom linken unteren Teil der hydrophoben Fläche zur Vorderseite des Moleküls zieht. Sowohl der hydrophobe Kanal als auch der Bindungsmodus des C-Terminus in denselben sind über die vier bisher strukturell bekannten TT-SPs konserviert. Interessanterweise zeigen die Oberflächen von Matriptase und Enteropeptidase eine weitere, hydrophobe Interaktionsfläche, die sich links über der ersten befindet. Während in Matriptase beide Interaktionsflächen durch einen kleinen hydrophoben Kanal verbunden sind, der zum Beispiel ein Linkerpeptid zwischen zwei N-terminalen Domänen aufnehmen könnte, sind sie in Enteropeptidase durch eine Brücke von polaren Resten voneinander getrennt. In DESC-1 und Hepsin findet man anstelle der zweiten Interaktionfläche eine Oberfläche, die sich sowohl aus polaren als auch hydrophoben Resten zusammensetzt und damit keine durchgehende hydrophobe oder polare Oberfläche bilden. In DESC-1 und Hepsin ist die zweite Interaktionsfläche also nicht vorhanden. Das passt sehr gut zu der Domänenorganisation in der extrazellulären Stammregion der strukturell bekannten TT-SPs. Während DESC-1 und Hepsin neben der Proteasedomäne nur eine weitere Domäne in der Stammregion aufweisen (SEA und SRCR), sind die Stammregionen von Matriptase und Enteropeptidase deutlich erweitert und weisen neben der Proteasedomäne noch sechs weitere Domänen im Fall von Matriptase und sieben weitere Domänen im Fall von Enteropeptidase auf. Diese zusätzlichen Domänen in Matriptase und Enteropeptidase repräsentieren möglicherweise die Bindungspartner für die zweite hydrophobe Interaktionsfläche.

Die Oberflächenanalyse von DESC-1 und der Vergleich mit der an Hepsin gebundenen SRCR-Domäne lassen den Schluss zu, dass die SEA-Domäne von DESC-1 auf der Rückseite starr mit der Proteasedomäne verbunden ist. Aufgrund der Positionierung der SEA-Domäne ist eine direkte Wechselwirkung mit den Resten des aktiven Zentrums von

DESC-1 nicht möglich, wodurch auch die Regulierung der proteolytischen Aktivität von DESC-1 als Funktion der SEA-Domäne nicht sinnvoll erscheint. SEA-Domänen treten in stark glykolisierter Umgebung auf, wo sie mit O-glykosidisch verbundenen Proteoglycanen verankert sind (Bork and Patthy 1995). Diese stark glykolisierte Umgebung findet man zum Beispiel in der extrazellularen Matrix (ECM), so dass der SEA-Domäne in DESC-1 möglicherweise die Funktion zukommt, die Proteasedomäne von DESC-1 in der ECM zu positionieren. Darüber hinaus ist auch vorstellbar, dass diese Domäne zur Zell/Zell-Adhäsion beiträgt mit der Konsequenz, dass die Herunterregulierung oder völlige Abwesenheit von DESC-1, wie sie in den wuchernden Karzinomen im Kopf- und Nackenbereich nachgewiesen wurde (Lang and Schuller 2001), direkten Einfluss auf die Adhäsions- und Migrationseigenschaften dieser Zellen hätte. Die Eigenschaft der Zellen dieser Karzinome zu wuchern, würde auch direkt daraufhin deuten, dass die Zell/Zell-Adhäsion dort gestört ist.

Die oben beschriebene unterschiedliche Ausstattung der Substratbindungstaschen der bisher strukturell aufgeklärten TT-SPs und die daraus folgende unterschiedliche Substratspezifität von DESC-1, Matriptase, Hepsin und Enteropeptidase ermöglichen es, spezifische Inhibitoren für die einzelnen TT-SPs zu entwickeln, mit denen es möglich ist, die TT-SPs voneinander abzugrenzen. Das ist insbesondere deswegen von großer Bedeutung, weil neben den mit Krebs assoziierten TT-SPs DESC-1, Matriptase und Hepsin mit Enteropeptidase ein Enzym zu dieser Familie gehört, was aufgrund seiner Funktion als Aktivator von Trypsinogen für die menschliche Verdauung essentiell ist und dessen Inhibition katastrophale Folgen auf den menschlichen Organismus hätte. Die gezielte Inhibition der TT-SPs sowohl für therapeutische als auch für diagnostische Zwecke, insbesondere von Hepsin und Matriptase, die, wie in der Einleitung erwähnt, von unterschiedlichen Tumoren überexprimiert werden, hat das Potential als viel versprechende neue Methode zur Behandlung von Krebs und anderen Krankheiten. Die DESC-1-BPTI-Strukur zeigt die hohe Flexibilität des aktiven Zentrums von DESC-1, die den Zugang von Kunitz-artigen Inhibitoren ermöglicht. Darüber hinaus lässt die hohe Affinität von BPTI zu DESC-1 vermuten, dass Kunitz-artige Inhibitoren wie BPTI in der Regulierung der proteolytischen Aktivität von DESC-1 eine Rolle spielen könnten. Das natürliche Substrat von DESC-1 ist bisher nicht bekannt, aber aufgrund seiner Positionierung in der extrazellulären Matrix ist anzunehmen, dass DESC-1 in das Netzwerk anderer Protease-Systeme, wie zum Beispiel des uPA-uPAR-Systems, der MT-MMPs oder der ADAMs,

integriert ist und dort für die Aktivierung bestimmter Komponenten dieser proteolytischen Systeme zuständig ist.

6. Ergebnisse

6.1 Kristallstruktur des Tricorn Interagierenden Faktors F3 von *Thermoplasma acidophilum*

6.1.1 Reinigung von F3

Die Reinigung von F3 zu apparenter Homogenität erfolgte über ein vierstufiges Reinigungsprotokoll, welches neben einem Hitzeschritt bei 60 °C drei Chromatographieschritte enthielt: Anionenaustauschchromatographie an einer Q-Sepharose-Säule, hydrophobe Wechselwirkungschromatographie an einer Octylsepharose-Säule und Gelfiltrationschromatographie an einer Superose 12 Säule.

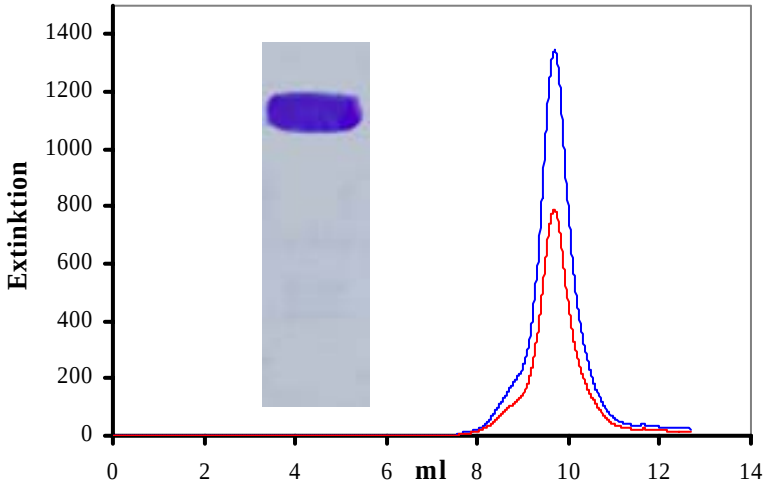


Abbildung 19: Darstellung des finalen Reinigungschrittes von F3

Elutionsprofil von F3 nach Gelfiltration an der Superose 12-Säule. Die blaue Kurve entspricht einer Extinktion bei 280 nm, während die rote Kurve die Extinktion bei 260 nm darstellt. Der abgebildete Gelausschnitt zeigt ein Coomassie gefärbtes 12 %iges SDS-PAGE-Gel dieses letzten Reinigungsschrittes

6.1.2 Kristallisation von F3

Die Kristallisationsbedingungen von F3 wurden durch *sitting drop* Dampfdiffusionsexperimente bei 18 °C herausgefunden. Um erste Kristallisationsbedingungen zu finden, wurden die Crystal Screens der Firma *Hampton Research* verwendet. Erste Kristall-Nadeln erschienen nach zwei Tagen. Nach der Optimierung der ersten Kristallisationsbedingung wuchsen hexagonalen Kristalle, die innerhalb von zwei Wochen eine finale Größe von 0,6 x 0,3 x 0,2 mm^3 erreichten, unter folgender Bedingung: 0,1 M Tris/HCl pH= 8,5, 18 % (m/w) PEG 2000, 0,2 M $LiSO_4$. Die

Kristalle gehörten zur trigonalen Raumgruppe $P3_221$ und wiesen Zellkonstanten von a= 105,1 Å, b = 105,1 Å, c= 178,2 Å, $\alpha = \beta = 90$ °, $\gamma = 120$° auf. Die asymmetrische Einheit dieser Kristalle enthielt ein Molekül F3, was einem Wassergehalt von 52 % entspricht. Unter der gleichen, oben beschriebenen Kristallisationsbedingung wurde noch eine weitere Kristallform von F3 gefunden. Diese andere Kristallform gehörte zu der orthorombischen Raumgruppe $P22_12_1$ mit folgenden Zellkonstanten: a = 105,6 Å, b = 115,2 Å c = 183,3 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90$ °. Die Kristalle wuchsen bis zu einer finalen Größe von 0,5 x 0,3 x 0,2 mm^3 und enthielten in der asymmetrischen Einheit zwei Moleküle F3 entsprechend einem Wassergehalt von 45 % (siehe Abbildung 20a –b).

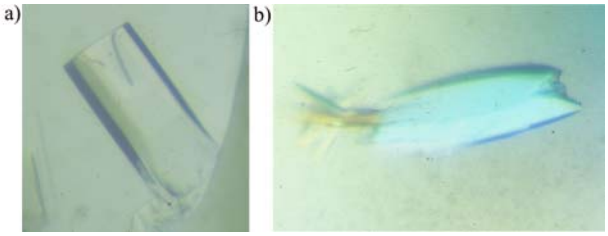


Abbildung 20: Kristalle des Tricorn Interagierenden Faktors F3

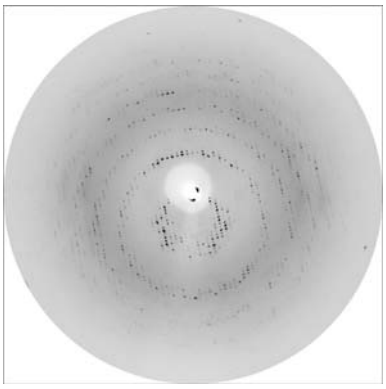
a) F3-Kristalle der trigonalen Raumgruppe $P3_221$

b) F3-Kristalle der orthorombischen Raumgruppe $P22_12_1$

6.1.3 Datenaufnahme und Phasenbestimmung

Die relative Feuchtigkeit der F3-Kristalle wurde wie unter Material und Methoden beschrieben mit dem *Free Mounting System* von 98% Startfeuchte auf 94 % reduziert und führte sowohl bei der trigonalen als auch bei der orthorombischen Raumgruppe zu einer deutlichen Verbesserung der Auflösung von 2,7 Å im Fall der trigonalen Raumgruppe und von 2,3 Å im Fall der orthorombischen Raumgruppe. Die Kristalle wurden in Nylon-Schlaufen überführt, die mit Perfluorpolyether gefüllt waren und im flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die MAD-Experimente zur Strukturlösung von F3 wurden am Deutschen Elektronen-Synchrotron DESY in Hamburg unter Verwendung von Synchrotron-Strahlung durchgeführt. Zur Bestimmung der Selen-Absorptionskante wurde zuerst ein Wellenlängen-Scan durchgeführt. Nachfolgend wurden Datensätze für die Peak-Wellenlänge (λ = 0,9788 Å), für die Wellenlänge des *Inflection points* (λ = 0,97915 Å) und für die *Remote*-Wellenlänge (λ = 0,9200 Å) aufgenommen, wobei der Kristall pro Bild um 0,5 ° über einen Winkelbereich von 120 ° gedreht wurde. Im Falle von anormaler

Dispersion wurde der Kristall zusätzlich um 180 ° gedreht, um auch die Reflexe der zugehörigen Friedelpartner zu bestimmen.



21: Darstellung eines Diffraktionsbildes von einem F3-Kristall (Raumgruppe $P22_12_1$)

Das Diffraktionsbild wurde an der Beamline BW6 (Deutsches Elektronensyncrotron Hamburg, DESY) bei einer Wellenlänge von λ (Peak) = 0,9788 Å mit einem CCD-Detektor (MAR Research, Hamburg) aufgenommen. Der Drehwinkel betrug 0,5 °.

Die Lagen der Selenatome wurden unter Verwendung des Programms SHELX und einer anormalen Differenz-Patterson-Dichte bestimmt. Die finalen Parameter der Verfeinerung der Schweratomparameter und die Berechnung der Phasen mit dem Programm MLPHARE (Bailey 1994) sind in Tabelle 4 angegeben.

	SeMetF3			F3 (nativ)
Wellenlänge	0,9788 Å	0,97915 Å	0,9200 Å	1,005Å
Raumgruppe	$P3_221$			$P22_12_1$
Zellkonstanten	a = 104,78 Å b = 104,78 Å c = 137,35 Å α = 90 ° β = 90 ° γ =120 °			a = 105,6 Å b = 115,20 Å c = 183,30 Å α = 90 ° β = 90 ° γ = 90 °
Auflösung	20 – 2,7 Å	20 – 2,7 Å	20 – 2,7 Å	20 – 2,3 Å
Unabhängige Reflexe	25877	25533	25649	99594
Vollständigkeit	98,9 %	97,7 %	97,0 %	99,7 %
R_{merge}	5,6 %	6,3 %	6,4 %	5,2 %
I/σ	25,32	15,75	20,66	16,58
Anzahl an Selenatomen	29	29		
Phasing Power	1,452	1,553		

Tabelle 4: MAD-Phasierungsstatistik und Datensammlungsstatistik

6.1.4 Modellbau, Dichtemodifizierung und Verfeinerung

Die Phasierung mit den gefundenen Selenpositionen, sowie anschließendes *Solvens Flattening* mit dem Programm SOLOMON (Bailey 1994) führten zu einer exzellenten Startdichte, für die mit dem Programm RESOLVE(Terwilliger and Berendzen 1999; Terwilliger 2000; 2003) ein erstes Modell berechnet wurde. In der ersten $2F_{obs}$-F_{calc}-Elektronendichte, die Daten bis zu einer Auflösung von 2,7 Å enthielt, waren sowohl die Hauptkette als auch die Seitenketten der Reste 1 - 560 vollständig in der Dichte definiert, während die C-terminalen Reste 561 – 780 vollständig undefiniert waren. Zur Verbesserung der Dichte in diesem Bereich wurde zuerst mit dem höher aufgelösten Datensatz der orthorombischen Raumgruppe die Auflösung auf 2,3 Å erhöht. Dann wurden die Dichten des Moleküls aus der trigonalen Raumgruppe und die der Moleküle aus der orthorombischen Raumgruppe unter Verwendung von Programmen aus dem CCP4 Programm Paket und dem Programm MAIN (Turk 1996) gemittelt. Zusammen mit der Verwendung von Dichten, deren kombinierte Phasen sich aus den experimentell

ermittelten Phasen und den aus dem Modell berechneten Phasen zusammensetzten, führte diese Prozedur zu einer exzellent definierten Dichte, in der die meisten Sekundärstrukturelemente, sowie die meisten Seitenketten des C-terminalen Teils eindeutig zuzuordnen waren. Von einigen hoch flexiblen Schleifen konnte nur die Hauptkette definiert werden, während die Seitenketten nicht zu sehen waren. In der Dichte der trigonalen Raumgruppe war die Helix H20 nicht definiert. Der Bau der Modelle erfolgte mit dem Programm MAIN (Turk 1996). Die kristallographische Verfeinerung erfolgte, wie für die DESC-1-Modelle bereits beschrieben, mit der Verfeinerungsroutine des CNS Programmpakets (Brunger et al. 1998). Abschließend wurden in beiden Modellen kristallographisch definierte Wassermoleküle in einer Elektronendifferenzdichte F_{obs}-F_{calc} ermittelt und die erweiterten Modelle bis zur Konvergenz verfeinert. Beide F3-Modelle weisen exzellente Parameter mit kristallographischen R-Faktoren von 0,22 ($P3_221$)/ 0,21 ($P22_12_1$) und mit freien R-Faktoren von 0,29 ($P3_221$)/ 0,26 ($P22_12_1$) auf. Die Verfeinerungsstatistiken dieser Modelle, die Abweichungen der Bindungslängen und -winkel von den stereochemischen Zielwerten, sowie die Verteilung der Reste im Ramachandranplot sind in Tabelle 5 dargestellt.

	F3 $P3_221$	F3 $P22_12_1$
Reflexe im *working set*	23089	94507
Reflexe im *test set*	1199	5030
Proteinatome (nicht-H)	6292	12584
Wasser Moleküle	365	804
Auflösungsbereich (Å)	20-2,7	20-2,3
R_{cryst} (%)[a]	22,17	21,38
R_{free} (%)[b]	29,64	26,17
R.m.s.d. Abweichungen **Bindungslängen (Å)** **Bindungwinkel**	 0,007 Å 1,23 °	 0,008Å 1,21°
Mittlerer B-Faktor (Å^2)	42,74	39,2
Ramachandran Plot: **bevorzugt erlaubt (%):** **zusätzlich erlaubt (%):** **grosszügig erlaubt (%)**	 83,4 % 15,5 % 0,6 %	 88,2 % 10,4 % 1,0 %

Tabelle 5: Verfeinerungsstatistiken der F3-Modelle

6.2 Strukturbeschreibung des Tricorn Interagierenden Faktors F3

6.2.1 BLAST Homologie Suche

Eine mit dem Programm BLAST durchgeführte Homologiesuche mit der Sequenz von F3, um strukturell verwandte Proteine zu identifizieren, zeigte höchste Identität zu der Aminopeptidase N aus *Thermoplasma volcanium* (68%), gefolgt von F2 aus *Thermoplasma acidophilum* (56%), von den Aminopeptidasen Aap1p (37%) und Aap2p (36%) aus *Saccharomyces cerevisiae*, von der Pyromycin-sensitiven Aminopeptidase (32%) aus *Homo sapiens* und von der Leukotrien A4 Hydrolase (LTA4H) (25%) aus *Homo sapiens*. Das strukturbasierte Alignment dieser Aminopeptidasen ist in Abbildung

22 dargestellt und zeigt das konservierte HEXXH Zinkbindungsmotiv, das sie als Zinkpeptidasen charakterisiert. Ebenfalls konserviert ist der dritte Zinkbindungsligand im Sequenzmotiv NEXFA, das sich in einer konservierten Entfernung von 18 Aminosäuren zu dem zweiten Histidin des Zinkbindungsmotivs befindet. Die konservierten Zinkbindungsliganden ermöglichen die Zuordnung dieser Aminopeptidasen in die Gluzincin-Familie der Metalloproteasen. Einziger bisher strukturell bekannter Vertreter der in Abbildung 22 verglichenen Aminopeptidasen ist die Leukotrien A4 Hydrolase(Thunnissen et al. 2001) (PDB accession code 1HS6).

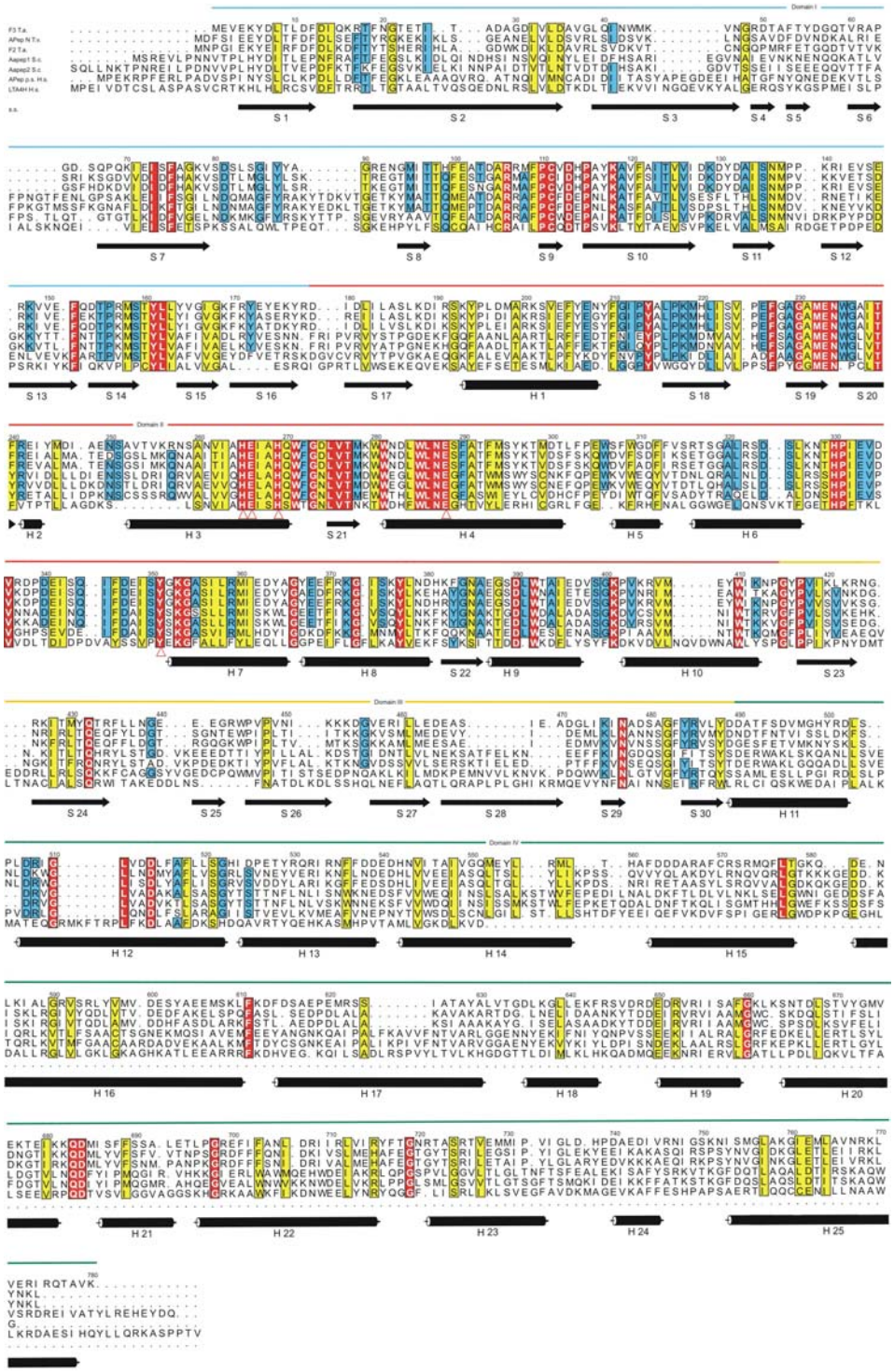


Abbildung 22: Strukturbasiertes Alignment von F3 mit den Zink-Aminopeptidasen dieser Familie

Die zinkbindenden Reste und der Protonakzeptor Tyr[351] sind mit roten Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die Domänenunterteilung, die Nummerierung der Reste und die Sekundärstrukturelemente entsprechen denen von F3. Die Farbgebung der einzelnen Domänen entspricht der in Abbildung 23 verwendeten. β-Faltblätter sind als Pfeile und α-Helices als Zylinder dargestellt.

6.2.2 Gesamtstruktur von F3

F3 ist aus vier Domänen aufgebaut, die zusammen die Form einer asymmetrischen, U-artig geformten Struktur ausbilden (siehe Abbildung 23). Die Dimensionen dieser Struktur betragen 80 Å x 40Å x 47Å. Der rechte Schenkel dieser U-artig geformten Struktur wird durch die N-terminale Domäne I (Reste 1 - 170) und durch die katalytische Domäne II (Reste 171 - 414) gebildet, die zusammen eine Länge von 80 Å aufweisen. Die Verbindung der beiden Schenkel wird durch die fünfte Helix der katalytischen Domäne II, durch die Domäne III (Reste 415 - 489) und durch die ersten drei Helices der C-terminalen Domäne IV geformt und weist eine Breite von 40 Å auf.

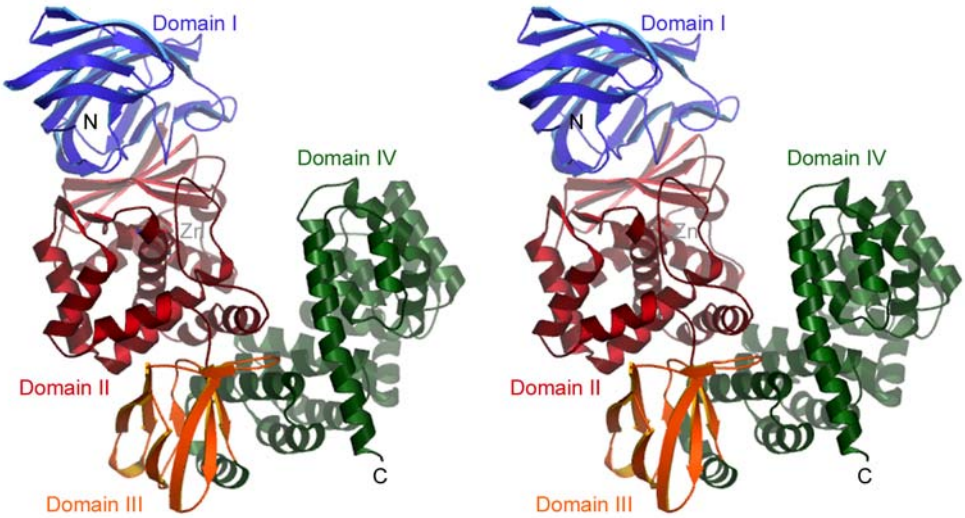


Abbildung 23: Stereodarstellung der Gesamtstruktur von F3

Die Termini, das Zinkion und die vier Domänen sind gekennzeichnet. Die N-terminale Domäne I ist in blau, die katalytische Domäne II in dunkelrot, die Domäne III in gold und die C-terminale Domäne in dunkelgrün dargestellt. Die Reste des Zinkbindungsmotivs His^{265}, His^{269} und Glu^{288} sind als Stabmodelle gezeigt, während das Zinkion als graue Kugel dargestellt ist.

Der rechte Schenkel der U-Form hat eine Länge von 45 Å und ist damit deutlich kürzer als der linke Schenkel und wird von den restlichen Helices der C-terminalen Domäne IV gebildet. Die relative Anordnung der vier Domänen zueinander ergeben eine 25 Å tiefe Kluft zwischen den beiden Schenkeln der U-Form, in der das aktive Zentrum mit den konservierten Zinkbindungsliganden am linken Schenkel positioniert ist. Diese Kluft erweitert sich keilartig von 13 Å am Eingang bis 22 Å am Boden. Die Form und die Größe dieser Kluft variieren in den unterschiedlichen Kristallformen von F3, so dass eine mehr geöffnete oder mehr geschlossene Konformation von F3 zu beobachten ist.

6.2.3 N-terminale Domäne I

Die N-terminale Domäne von F3 besteht aus drei β-Faltblättern. Das zentrale β-Faltblatt dieser Domäne besteht aus acht Strängen, die antiparallel zu einander angeordnet sind. Dieses β-Faltblatt formt eine große sattel-artige Oberfläche, die vollständig Lösungsmittel exponiert ist. Flankiert wird das zentrale Faltblatt von zwei weiteren antiparallelen Faltblättern, ein dreisträngiges und ein viersträngiges, die zusammen mit dem zentralen Faltblatt eine fass-artige Struktur ausbilden. Die einzelnen Stränge dieser β-Faltblätter sind mit unterschiedlich langen Schleifen verbunden, von denen die 82er- und die Lösungsmittel exponierte, hauptsächlich aus polaren Resten aufgebaute 92er-Schleife zu erwähnen sind, weil sie zusammen eine dachartige Struktur ausbilden, die die tiefe Kluft am Eingang deutlich von der linken Seite her verengen (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24).

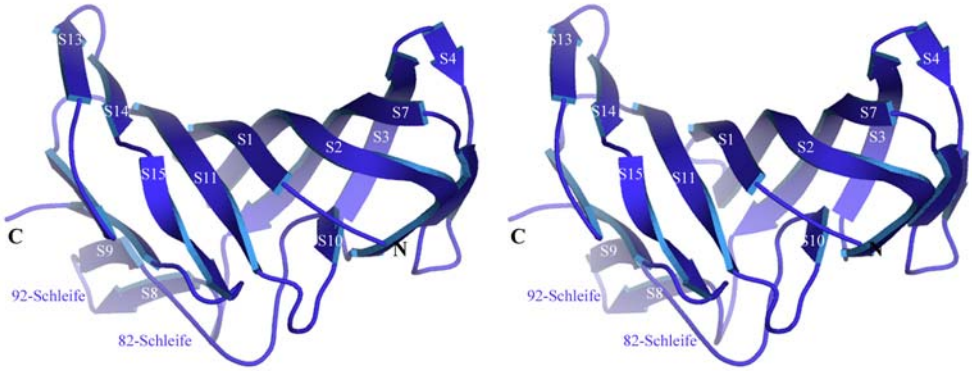


Abbildung 24: Stereodarstellung der N-terminalen Domäne von F3

Die im Text beschriebenen Stränge und Schleifen und der Termini sind gekennzeichnet. Die in dieser Abbildung gewählte Orientierung entspricht der um 90 ° um die Z-Achse gedrehten Orientierung aus Abbildung 21.

Die N-terminale Seitenkette von Met^{1} ist in einer hydrophoben Vertiefung positioniert, die von den hydrophoben Seitenketten der Reste Ala^{27}, Ala^{29}, Gly^{30}, Ile^{32}, Val^{33}, Ile^{25} und Ile^{102} aufgespannt wird. Die Met^{1} Seitenkette wird in dieser Vertiefung durch hydrophobe Wechselwirkung mit den erwähnten Resten stabilisiert.

6.2.4 Katalytische Domäne II

Die katalytische Domäne von F3 setzt sich aus zwei Teilen zusammen: im ersten Teil sind sowohl β-Stränge als auch α-Helices kombiniert, während der zweite Teil hauptsächlich aus α-Helices aufgebaut ist. Der erste Teil dieser Domäne besteht aus fünf β-Strängen, von den inneren drei β-Stränge parallel zu einander angeordnet sind, während die beiden äußeren β-Stränge in entgegen gesetzte Richtung zeigen. Dieses große β-Faltblatt bildet wiederum eine große Oberfläche, die sich passgenau an die Unterseite der N-terminalen Domäne anlagert (siehe Abbildung 23 und Abbildung 25). Unterbrochen wird dieses Faltblatt nur durch die Helix H1, die sich zwischen den β-Strängen S17 und S18 befindet. Der β-Strang S19 verläuft direkt über dem aktiven Zentrum und könnte somit bei der Substraterkennung von F3 eine Rolle spielen. Der zweite Teil dieser Domäne besteht hauptsächlich aus acht Helices, die nur durch ein paralleles β-Faltblatt, bestehend aus den Strängen S21 und S22, unterbrochen sind. Das konservierte Zinkbindungsmotiv $H^{265}E^{266}XXH^{269}$ ist Teil von Helix H3. Glu^{266} übernimmt in der Katalyse die Funktion der generellen Base. Das zweite konservierte Zinkbindungsmotiv $NE^{288}XFA$, das mit Glu^{288} den dritten Zink-chelatisierenden Rest enthält, befindet sich in Helix H4. Die restlichen Helices H5 – H10 sind in Form von zwei Lagen mit einander verzahnt, so dass sie zusammen eine halbkugel-artig geformte, dicht gepackte α-helikale Struktur ergeben. Darüber hinaus muss erwähnt werden, dass F3 in dieser Domäne eine sehr lange Schleife aufweist (Reste 328 – 349), die Helix H6 mit Helix H7 verbindet und die direkt die Vorderseite des aktiven Zentrums von F3 abdeckt. Diese 338er-Schleife ist hochflexibel und in den einzelnen Konformationen von F3 nur als Hauptkette aber nicht mit allen Seitenketten definiert, trägt aber eindeutig zur Architektur des aktiven Zentrums von F3 bei.

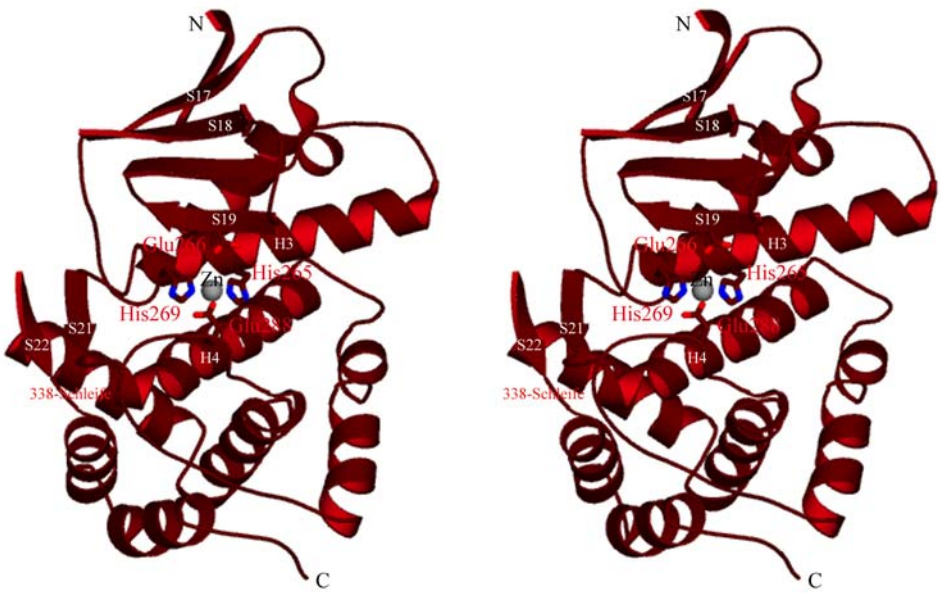


Abbildung 25: Stereodarstellung der katalytischen Domäne II von F3

Die Termini, die zinkbindenden Reste sowie die im Text diskutierten Sekundär-Strukturelemente sind gekennzeichnet. Die Zinkliganden sind als Stabmodelle dargestellt, während das Zinkion als graue Kugel gezeigt ist. Die Orientierung ist gegenüber Abbildung 23 um etwa 90 ° um die y-Achse gedreht.

6.2.5 Domäne III

Domäne III (Reste 415 – 489) ist wiederum nur aus β-Strängen aufgebaut. Die acht β-Stränge (S23 – S30) dieser Domäne lagern sich zu einer fass-artigen Struktur zusammen. S25 ist der einzige Strang, der strukturell nicht zur Fass-Struktur beiträgt, sondern im rechten Winkel zu den anderen Strängen am oberen Rand der fassartigen Struktur verläuft (siehe Abbildung 26). Diese Domäne bildet mit dem ersten Teil der C-terminalen Domäne IV den Boden der U-förmigen Gesamtstruktur.

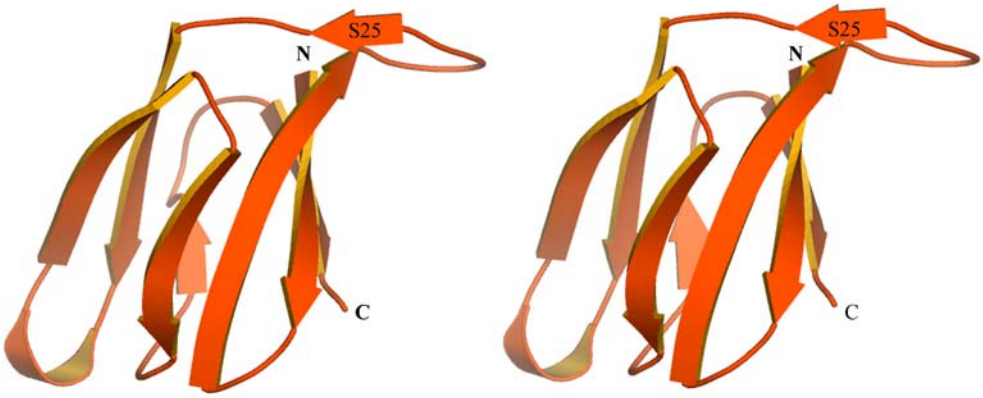


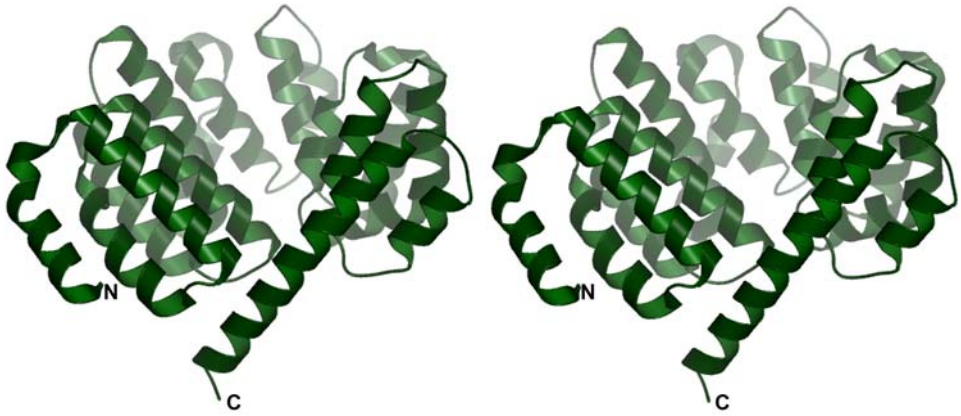
Abbildung 26: Stereodarstellung der Domäne III von F3

Die Termini sowie der im Text angesprochene β-Strang sind gekennzeichnet. Die gewählte Otientierung entspricht der aus Abbildung 23.

6.2.6 C-terminale Domäne IV

Die C-terminale Domäne IV (Reste 490 - 780) von F3 ist vollständig aus α-Helices aufgebaut. Die 15 Helices (H11 – H25) dieser Domäne sind in einer Superhelix organisiert, die in der Mitte geknickt ist, so dass zwei Blöcke von Helices entstehen. Beide Blöcke stehen in einem Winkel von annähernd 90 °. Durch den superhelikalen Aufbau dieser Domäne besteht jeder Block aus zwei parallelen Schichten von Helices. Im ersten Block werden die innere Schicht von vier Helices und die äußere Schicht von drei Helices gebildet, die antiparallel zu einander angeordnet sind. Die innere Schicht des ersten Blocks vervollständigt zusammen mit den Helices H5 und H6 aus der katalytischen Domäne II den Boden der tiefen Kluft. Der zweite Block, bestehend aus jeweils vier Helices in der inneren und in der äußeren Schicht, bildet den rechten, deutlich kürzeren Schenkel der U-förmigen Gesamtstruktur. Die vier inneren Helices dieses Blocks formen den rechten Rand der tiefen Kluft. Die äußeren Schichten beider Blocks ergeben die äußere Architektur des Bodens und des rechten Schenkels der Gesamtstruktur. Bemerkenswert in der Struktur dieser Domäne ist die C-terminale Helix H25, die mit Abstand die längste Helix in F3 ist und die mit dem C-terminus direkt zwischen die ersten beiden Helices der inneren Schicht des ersten Blocks zeigt (siehe Abbildung 27a). Die Stabilisierung der C-terminalen Helix zwischen den beiden anderen Helices trägt maßgeblich dazu bei, dass die beiden Blocks in dieser 90°-Konformation gehalten werden. Darüber hinaus stabilisiert sie den Knick in der Superhelix. Insgesamt zeigt sich, dass diese Domäne von allen anderen F3-Domänen mit Abstand die höchste Flexibilität aufweist, was insbesondere auch in den hohen B-Faktoren (Temperaturfaktoren) der Helices des zweiten Blocks zu sehen ist. Die oben beschriebene Kristallbedingung führte zu zwei unterschiedlichen Kristallformen: die erste Kristallform mit der trigonalen Raumgruppe $P3_221$ mit einem Molekül (MOL3) in der asymmetrischen Einheit und die zweite Kristallform mit der orthorombischen Raumgruppe $P22_12_1$ mit zwei Molekülen (MOL1 und MOL2) in der asymmetrischen Einheit.

a)



b)

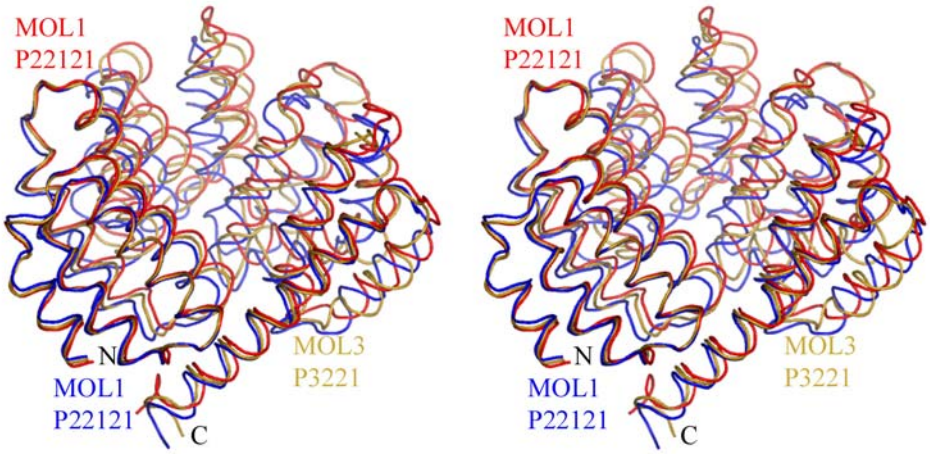


Abbildung 27: Stereodarstellung der C-terminalen Domäne IV von F3

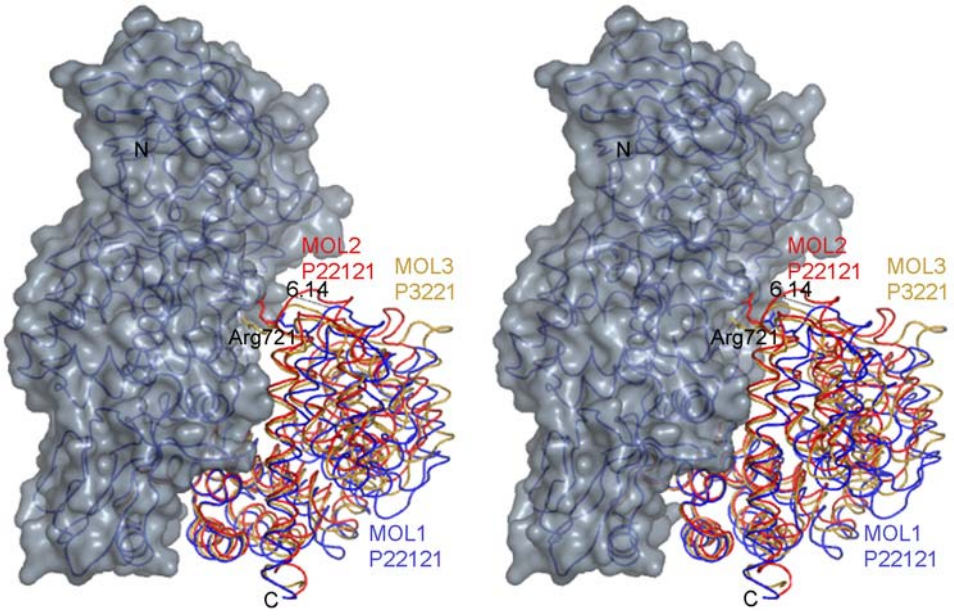
a) Stereodarstellung der in MOL1 ($P22_12_1$) beobachteten Konformation der C-terminalen Domäne IV

b) Stereodarstellung der Hauptketten von MOL1/$P22_12_1$ (blau), MOL2/$P22_12_1$ (rot) und MOL3/$P3_221$ (gold).

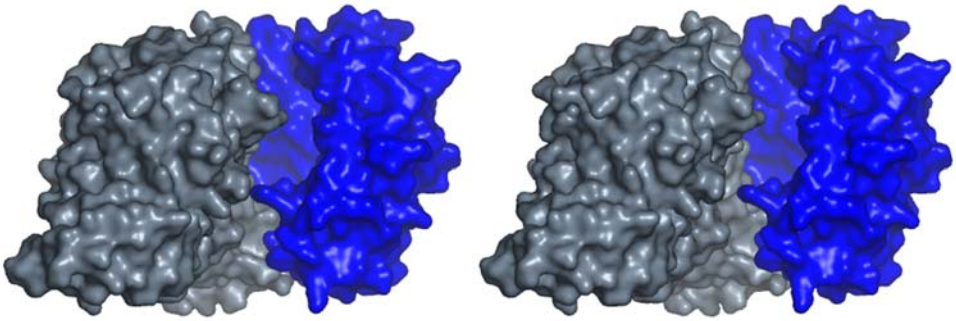
Die Überlagerung der drei unterschiedlichen Konformationen von F3 (siehe Abbildung 28a) zeigt das die ersten drei Domänen (die N-terminale Domäne I, die katalytische Domäne II und die Domäne III) in allen drei Konformationen nahezu unverändert bleiben. Ähnlich ist das auch bei den Helices des ersten Blocks von der C-terminalen Domäne IV, die ebenfalls nahezu unverändert in allen drei Konformationen vorliegen. Die größten Unterschiede zwischen MOL1 und MOL2 aus der orthorombischen Raumgruppe und MOL3 aus der trigonalen Raumgruppe sind in den Helices des zweiten Blocks zu beobachten. Die überlagerten Hauptketten (siehe Abbildung 27b und Abbildung 28a -d) zeigen, dass MOL1 aus der orthorombischen Raumgruppe die am weitesten geöffnete Kluft ausbildet. In dieser Konformation sind die Helices teilweise bis zu 15 Å nach rechts und bis zu 5 Å in Richtung des Bodens verschoben. Während MOL2 aus der

orthorombischen Raumgruppe und MOL3 aus der trigonalen Raumgruppe bezüglich des Verlaufs der vier C-terminalen Helices sehr ähnlich sind, zeigen sich dort deutliche Unterschiede in den ersten vier Helices des zweiten Blocks. Der Verlauf der Hauptkette von MOL3 ähnelt hier mehr dem in MOL1 beobachteten Verlauf, wobei die Verschiebung in Richtung des Bodens bei MOL3 deutlich geringer ausfällt als in MOL1. Insgesamt führen die Konformationsänderungen, die in den einzelnen Strukturen von F3 in dieser Domäne festzustellen sind, dazu, dass man eine offene, eine geschlossene Konformation und ein Intermediat definieren kann. Die beiden Moleküle der orthorombischen Raumgruppe zeigen die extremsten Konformationen während das Molekül aus der trigonalen Raumgruppe (MOL3) ein Intermediat zwischen der offenen (MOL1) und der geschlossenen (MOL2) darstellt. Darüber hinaus zeigt die Überlagerung, dass die relative Anordnung der Helices aus dem zweiten Block sehr flexibel ist. Die drei unterschiedlichen Konformationen von F3 sind mit den unterschiedlichen Kristallkontakten in den beiden Kristallformen zu erklären. Außerdem können die drei Konformationen als Schnappschüsse der molekularen Dynamik des F3-Moleküls angesehen werden und würden damit auch ausgezeichnet als Modell für die konformationellen Änderungen dienen, die ausschließlich in der C-terminalen Domäne IV von F3 sowohl bei der Substratbindung als auch bei der Substratprozessierung stattfinden.

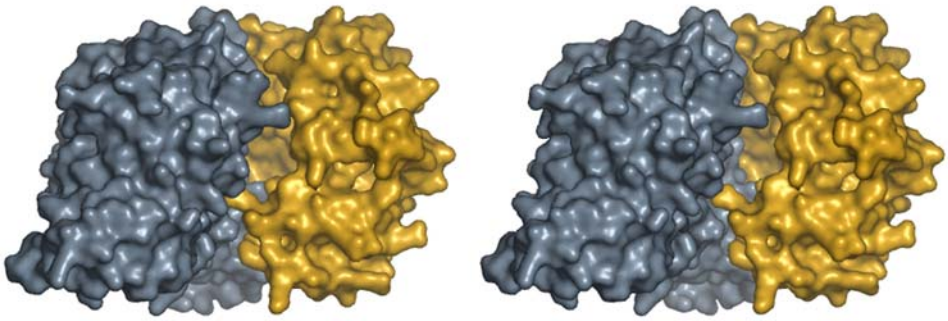
a)



b)



c)



d)

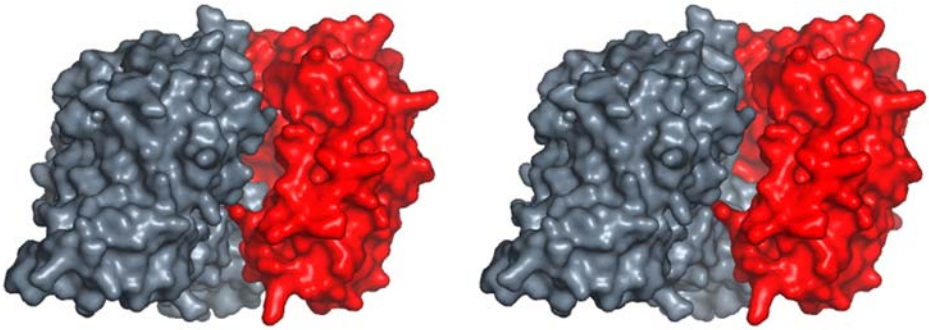


Abbildung 28: Stereodarstellung der drei überlagerten Konformationen von F3

a) Stereodarstellung der überlagerten Hauptketten von F3. Die starren Domänen sind mit einer semitransparenten Oberfläche überzogen. Die dort gezeigte Hauptkette gehört zu MOL1. Die C- und N-Termini sind gekennzeichnet. Über jedem Molekül sind die Raumgruppen geschrieben, in denen es kristallisiert. Die Arg^{721}-Seitenkette ist als Stab-Modell gezeigt. Die Reste sind entsprechend den Molekülfarben eingefärbt: MOL1/P22121 (blau), MOL2/P22121 (rot) und MOL3/P3221 (gold).

Stereodarstellung der Oberflächen der drei Konformationen. Die Einfärbung der C-terminalen Domäne IV entspricht farblich der in a) gewählten.

b) Offene Konformation, MOL1 ($P22_12_1$)

c) Intermediat, MOL3 ($P3_221$)

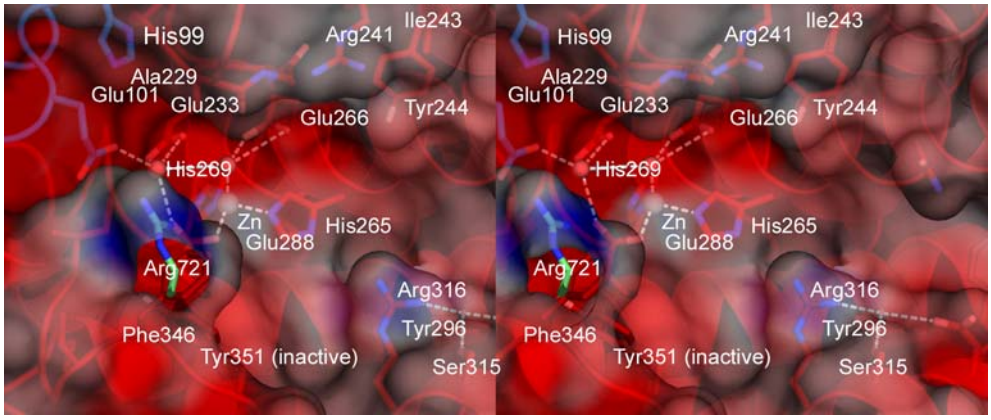
d) geschlossene Konformation, MOL2 ($P22_12_1$)

6.2.7 Das aktive Zentrum von F3

Wie oben schon kurz angesprochen, befindet sich das aktive Zentrum von F3 am linken Schenkel der U-förmigen Struktur. Das aktive Zentrum liegt in einer Aushöhlung mit 20 Å Länge, die sich diagonal von der rechten oberen Ecke bis zur linken unteren Ecke des linken Schenkels zieht. Die rechte Seite (Osten) erweitert sich bis auf 15 Å, während sich die Aushöhlung nach Westen hin bis auf 5Å kanalartig verengt. Die Aushöhlung des aktiven Zentrums steht nach vorne direkt mir der tiefen Kluft zwischen der katalytischen Domäne II und der C-terminalen Domäne IV in Verbindung. Insgesamt tragen Sekundärstrukturelemente der N-terminalen Domäne I, der katalytischen Domäne II und der C-terminalen Domäne IV zur Architektur des aktiven Zentrums bei. Während der Hauptteil des aktiven Zentrums von Sekundärstrukturelementen der katalytischen Domäne II gebildet wird, besteht der Beitrag der N-terminalen Domäne in zwei Schleifen und der der C-terminale Domäne IV nur in der Seitenkette Arg^{721}, die Teil von Helix H23 ist (siehe Abbildung 29a-b).

An der Ostseite des aktiven Zentrums wird die lang gezogene Vertiefung durch die Seitenkette Arg^{316} in zwei kleinere Vertiefungen unterteilt, an deren Verzweigungspunkt durch die Amidino-Gruppe positive Ladung generiert wird. Die Arg^{316}-Seitenkette wird in dieser Position über Wasserstoffbrücken zur Hydroxygruppe von Tyr^{296} stabilisiert (siehe Abbildung 29a), die zum hinteren Ende der zweiten „*Active Site*“-Helix H4 gehört. Die erste Vertiefung zeigt direkt nach Osten, während sich die zweite Vertiefung im Süden des aktiven Zentrums erstreckt. Das Dach der nach Osten zeigenden Vertiefung wird vom Anfang der ersten „*Active* Site“-Helix H3 mit den Seitenketten der Reste Thr^{254} und Asn^{258}. Abgeschlossen wird diese Vertiefung im Osten mit den aromatischen Seitenketten der Reste Trp^{306} und Phe^{308}, während die südliche Begrenzung durch die Seitenketten der Reste Arg^{316} und Asn^{311} erfolgt. Insgesamt hat die östliche Vertiefung aufgrund der beiden Asparagin- und der Threonin-Seitenketten polaren Charakter. Die südliche Vertiefung wird zum einen im Osten durch die Seitenkette von Arg^{316} und zum anderen im Westen durch die Tyr^{351}-Seitenkette begrenzt (siehe Abbildung 29a). Die Hauptkette der Reste Tyr^{351} und Gly^{352} bilden den südlichen Abschluss dieser Vertiefung. Die südliche Vertiefung hat damit mehr hydrophoben Charakter.

a)



b)

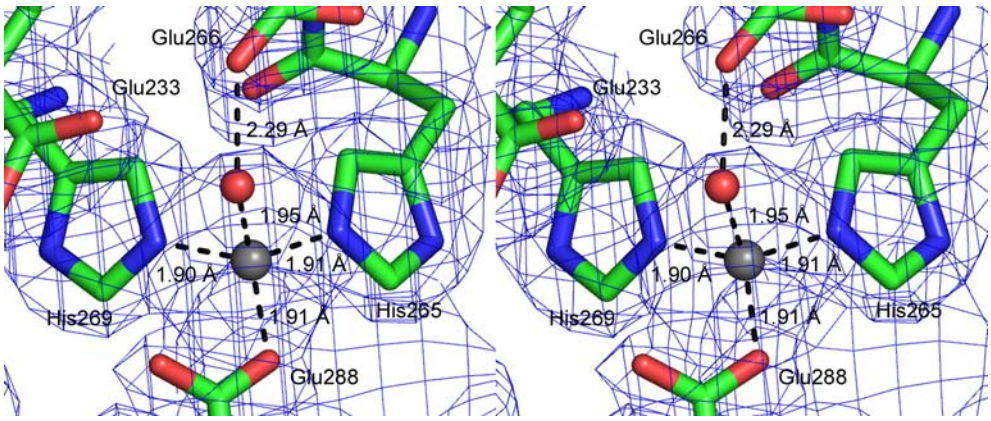


Abbildung 29: Stereodarstellung des aktiven Zentrums von F3

a) Stereodarstellung des aktiven Zentrums mit semi-transparenter Oberfläche und angedeuteten Sekundärstrukturelementen. Die im Text diskutierten Reste sind als Stabmodelle dargestellt und entsprechend der Domänenzugehörigkeit eingefärbt. Die Färbung der Oberfläche entspricht ihrem elektrostatischen Potential von 20 kT/e (blau) bis -20 kT/e (rot). Das Zinkion ist als graue Kugel dargestellt. Die unterschiedlichen Konformationen von Tyr^{351} sind markiert. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte weiße Linien angedeutet.

b) Stereodarstellung der zinkbindenden Reste, der generellen Base und des N-Terminus bindenden Restes mit der finalen $2F_{obs}$-F_{calc}-Elektronendichte, konturiert bei 1σ.

Die beiden Vertiefungen, die bezüglich ihres elektrostatischen Potentials völlig unterschiedlich ausgestattet sind, legen nah, dass sie zwei unterschiedliche Substratbindungsmodi repräsentieren. Da F3 sowohl Di- als auch Tri-Peptide prozessiert, kann man davon ausgehen, dass die Funktion dieser beiden Vertiefungen die Bindung von Seitenketten von Di- oder Tri-Peptiden ist.

Die Reste des konservierten Zink-Bindungsmotivs HEXXH befinden sich in Helix H3, während der dritte zinkbindende Ligand in Helix H4 positioniert ist. Beide Helices sind

leicht gegen einander verdreht und mit dem β-Strang S21 verbunden, der mit dem β-Strang S22 ein paralleles Faltblatt ausbildet. Das Zinkion ist koordiniert mit den Nε2-Stickstoffatomen von His^{265} und His^{269} und mit dem Carboxylatsauerstoff von Glu^{288} (siehe Abbildung 29b). Zusammen mit dem „*Active Site*"-Wassermolekül ergibt das für das Zinkion die Koordinierung einer leicht verzerrten, trigonalen Pyramide (siehe Abbildung 29b). Der zweite Carboxylatsauerstoff Oε2 von Glu^{288} bildet mit den Carboxylatgruppen von Glu^{101} und Glu^{233} eine stark negativ geladene Vertiefung, die optimal geformt ist, um die N-terminale Ammoniumgruppe eines Substrats zu binden.

Das Dach über dem aktiven Zentrum von F3 wird im Osten von der Helix H3 geformt, während es im Westen von der 86er-Schleife (Reste 80 - 93) und von der 102er-Schleife (Reste 98 – 107) gebildet wird, die beide zur N-terminalen Domäne I gehören. Die 102er-Schleife ist eine wichtige Schleife, weil sie mit His^{99} den einzigen Rest in Reichweite des Zinks trägt, der eine positive Ladung aufweist und so als Bindungspartner für die Carboxylatgruppe der von F3 bevorzugten Glutamat-Seitenkette in P1-Position in Frage kommt.

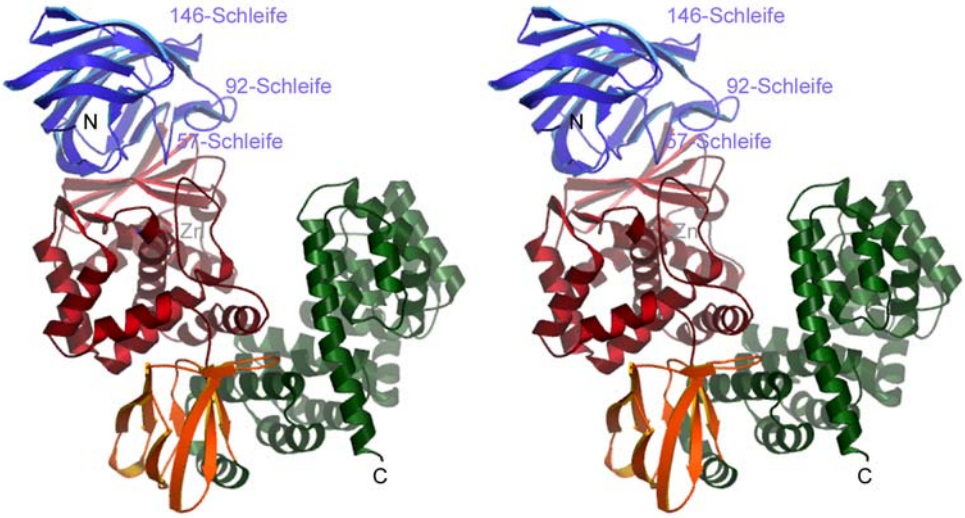
Der mittlere Teil des Dachs wird durch den β-Strang S19 mit den Resten Gly^{228}, Ala^{229} und Gly^{230}, sowie mit den Seitenketten Arg^{241}, Ile^{243} und Tyr^{244} von Helix H2 geformt. Die vordere Wand der großen Vertiefung wird im Osten hauptsächlich durch Helix H5 (Reste 307 - 312) begrenzt, während im Westen die oben bereits beschriebene hochflexible 338er-Schleife mit den Seitenketten der Reste Ile^{342} und Phe^{346} und der Hauptkette der Reste Asp^{347} und Glu^{348} diese Funktion übernimmt. Der einzige Rest aus der C-terminalen Domäne IV, der in die Architektur des aktiven Zentrums von F3 involviert ist, ist die Arg^{721}-Seitenkette von Helix H23. Die Seitenkette von Arg^{721} ist genau auf die 338er-Schleife gerichtet und stabilisiert diese Schleife über hydrophobe Wechselwirkungen. Interessanterweise unterscheiden sich die drei unterschiedlichen Konformationen von F3 sowohl in der Position als auch im Verlauf dieser Seitenkette deutlich von einander. In allen drei Konformationen ist die Arg^{721}-Seitenkette nicht in der Elektronendichte definiert, was auf eine hohe Flexibilität dieser Seitenkette schließen lässt. Jedoch lässt der Verlauf der Hauptkette in diesem Bereich bei MOL2 ($P22_12_1$) und MOL3 ($P3_221$) eine hydrophobe Wechselwirkung mit der 338er-Schleife zu. Die 338er-Schleife bildet in diesem Bereich mit den Seitenketten der Reste Ile^{342}, Ile^{345} und Phe^{346} eine kleine, hydrophobe Vertiefung, in die die Arg^{721}-Seitenkette direkt hinein zeigt. In der offenen Konformation von MOL1 ($P22_12_1$) ist Helix H23 um 6,1 Å in den Vordergrund verschoben

(siehe Abbildung 27b und 28a) mit der Konsequenz, dass die hydrophobe Wechselwirkung der Arg^{721}-Seitenkette nicht mehr möglich ist. Insgesamt lässt sich anhand der Arg^{721}-Seitenkette eine geschlossene Konformation (MOL2/$P22_12_1$), eine offene Konformation (MOL1/$P22_12_1$) und ein Intermediat (MOL3/$P3_221$) definieren. Darüber hinaus wird auch die Funktion der Arg^{721}-Seitenkette als Überbrückungsrest zwischen der katalytischen Domäne II und der C-terminalen Domäne IV deutlich. Sie sorgt dafür, dass die tiefe Kluft vor dem aktiven Zentrum von F3 nach vorne hin verschlossen wird.

6.2.8 Vergleich von F3 mit der humanen Aminopeptidase Leukotrien A4 hydrolase (LTA4H) und mit Thermolysin (*Bacillus thermoproteolyticus*)

Wie in Abschnitt 6.2.1 bereits erwähnt, weist F3 mit LTA4H eine Sequenzidentität von 25 % auf. Die Überlagerung der beiden N-terminalen Domänen von F3 (Reste 1 - 170) und LTA4H (Thunnissen et al. 2001)(PDB *accession Code*: *1HS6*) (Reste 1 - 207) ergibt *r.m.s.d.*-Werte von 1,19 Å für 145 Cα-Positionen aus 170 im Fall von F3 und 207 im Fall von LTA4H. Die Organisation der Sekundärstrukturelemente ist in beiden Proteinen sehr ähnlich. Größere Unterschiede bezüglich des Verlaufs lassen sich in drei Schleifenbereichen von LTA4H feststellen (siehe Abbildung 30a und 30b): in der 80er-Schleife (entspricht der 57er-Schleife von F3), in der 124er-Schleife (entspricht der 92er-Schleife von F3) und in der 182er-Schleife (entspricht der 146er-Schleife von F3).

a)



b)

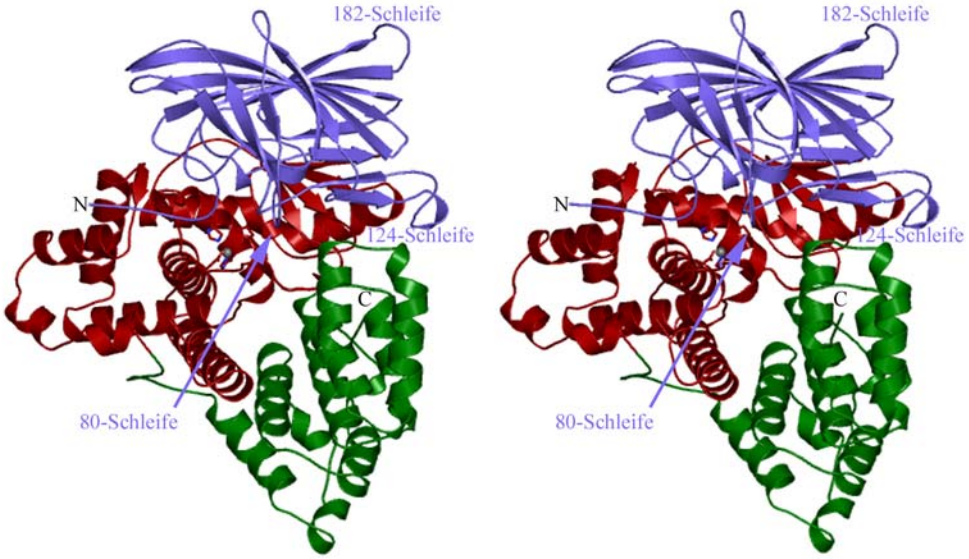


Abbildung 30: Stereodarstellung der Gesamtstrukturen von F3 und LTA4H

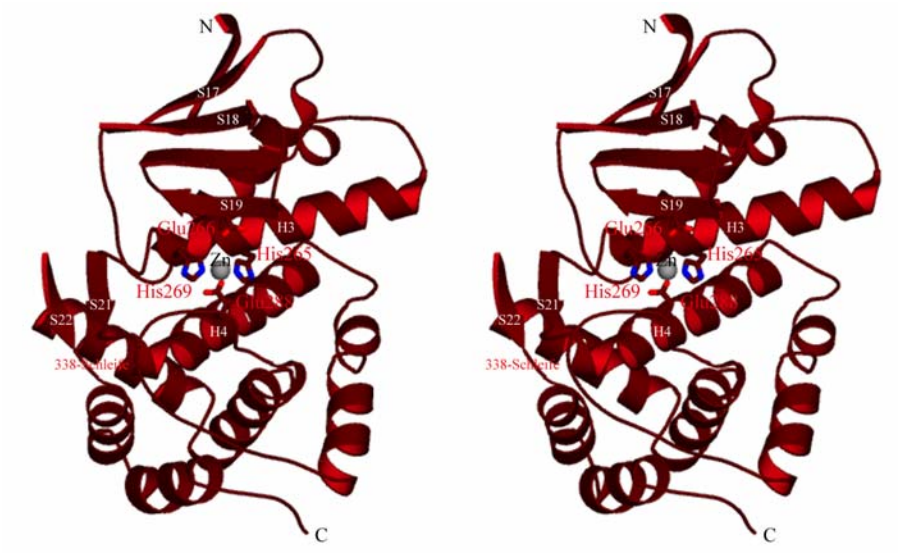
a) Stereodarstellung der Gesamtstruktur von F3.

b) Stereodarstellung der Gesamtstruktur von LTA4H. Die Domänen sind in den gleichen in a) verwendeten Farben eingefärbt. Die Unterschiede beider Proteine sind markiert.

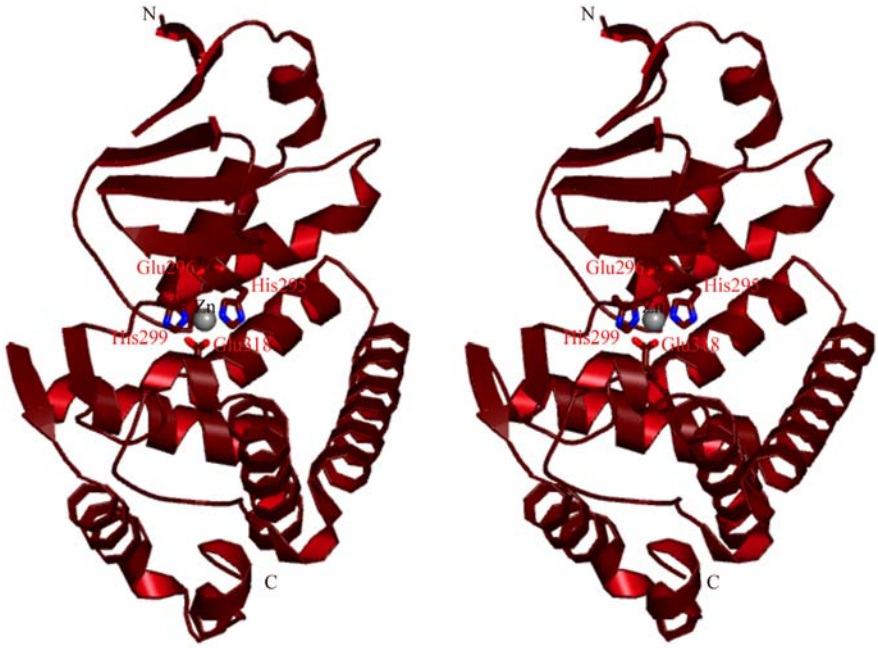
Die 182er-Schleife, die den rechten Rand der sattelartigen Oberfläche bildet, ist in LTA4H um vier Reste verlängert im Vergleich zur 146er-Schleife in F3, was zu einer stärkeren Krümmung dieser Oberfläche in LTA4H führt. Weiterhin verengt die 80er-Schleife in LTA4H deutlich stärker die tiefe Kluft vor dem aktiven Zentrum von links als das für die nur aus drei Resten bestehende 57er-Schleife in F3 zu beobachten ist (siehe Abbildung 30). Abschließend ist noch die 124er-Schleife von LTA4H zu erwähnen, bei der es sich um eine oberflächenexponierte, hauptsächlich aus den polaren Seitenketten der Reste Gln^{122}, Thr^{123}, Ser^{124}, Gly^{125} und Lys^{126} aufgebaute Schleife handelt. In F3 ist die entsprechende 92er-Schleife um vier Reste verkürzt, aber ebenfalls polar, und bildet zusammen mit der 82er-Schleife eine dachartige Struktur aus, die die tiefe Kluft vor dem aktiven Zentrum von F3 von der linken Seite begrenzt. Deutliche Unterschiede zwischen F3 und LTA4H lassen sich in den N-Termini feststellen. LTA4H trägt hier eine Insertion von 15 Resten, die eine zusätzliche Schleifen-Struktur ausbilden, die jedoch keinen Kontakt mehr zum Rest des Proteins hat und entsprechend flexibel ist. Die N-terminale Seitenkette Met^{1} dagegen ist in einer hydrophoben Vertiefung positioniert, die von den Seitenketten der Reste Ala^{27}, Ala^{29}, Gly^{30}, Ile^{32}, Val^{33}, Ile^{25} und Ile^{102} gebildet wird, und wird dort über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert.

Die Überlagerung der katalytische Domäne II von F3 mit den katalytischen Domänen von LTA4H und Thermolysin (Holmes et al. 1983)(*Bacillus thermoproteolyticus*), dem prominenten Namengeber der Gluzincin-Familie der Metalloproteasen, ergibt *r.m.s.d.*-Werte von 1,65Å für LTA4H/F3 und 2,3 Å für Thermolysin/F3. In Abbildung 31a – c sind die Strukturen der katalytischen Domänen von F3, von LTA4H und von Thermolysin (PDB *accession Code*: 7TLN) dargestellt. Die Anordnung der Sekundärstrukturelemente dieser Domäne in F3 und in LTA4H ist nahezu identisch. Deutliche Unterschiede lassen sich jedoch im Vergleich zu Thermolysin feststellen. Die gemischte α/β-Struktur im ersten Teil dieser Domäne ist in Thermolysin um vier Stränge erweitert und bildet zusammen mit dem konservierten fünfsträngigen Faltblatt eine dachartige Struktur in Thermolysin aus. In F3 und LTA4H ist diese Struktur nicht vorhanden, sondern wird durch die sattelförmige Struktur der N-terminalen Domäne ersetzt, die in Thermolysin fehlt. Die Helices H5 und H6 in F3 sind in Thermolysin durch eine lange Schleifenstruktur ersetzt, die durch drei kurze Helices unterbrochen ist und die über die Vorderseite des Moleküls verläuft und direkt in die in F3 entsprechende 338er-Schleife übergeht. Diese Schleife ist in Thermolysin deutlich kürzer und entsprechend weniger flexibel als in F3 und LTA4H. Ein strukturelles Merkmal, was nur in Thermolysin zu finden ist, ist die β-Haarschlaufe zwischen den Helices H7 und H8, an deren Stelle in F3 und LTA4H nur eine Schleife zu finden ist (siehe Abbildung 31a-c). Insgesamt lässt sich aber sagen, dass die Architektur des aktiven Zentrums in allen drei Metalloproteasen sehr ähnlich ist und dass die relative Anordnung der Helices H3 und H4 sowie die Position der zinkkoordinierenden Reste absolut identisch sind.

a)


N
S17
S18
S19
H3
Zn
His269
S21
S22
H4
C
N
S17
S18
S19
H3
Zn
His269
S21
S22
H4
C

b)


N
Zn
His299
C
N
Zn
His299
C

c)

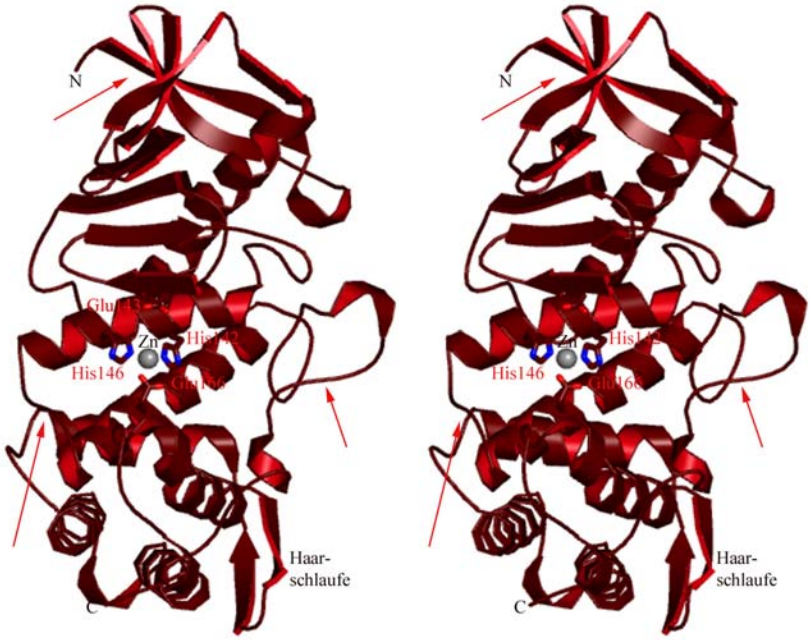


Abbildung 31: Stereodarstellung der katalytischen Domänen von F3, LTA4H und Thermolysin

Die zinkkoordinierenden Reste sind als Stabmodelle dargestellt. Die Zinkionen sind als graue Kugeln angedeutet. Die im Text diskutierten Reste sind gekennzeichnet.

a) Stereodarstellung der katalytischen Domäne von F3.

b) Stereodarstellung der katalytischen Domäne von LTA4H

c) Stereodarstellung der Gesamtstruktur von Thermolysin. Die strukturellen Unterschiede von Thermolysin zu F3 und LTA4H sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Domäne III von F3 ist ein Strukturelement, was weder Thermolysin noch LTA4H aufweist, und kann daher in dieser Betrachtung vernachlässigt werden.

Der superhelikale Aufbau der C-terminalen Domänen von F3 und LTA4H ist identisch. Allerdings ist in LTA4H diese Domäne nur auf den ersten Block von Helices reduziert. Durch die deutlich geringere Ausdehnung dieser Domäne in LTA4H besetzt sie den Platz, an dem in F3 die tiefe Kluft aufgespannt wird. Darüber hinaus wird diese Domäne über Wasserstoffbrücken mit der N-terminalen und der katalytischen Domäne verbunden. In F3 ist die Entfernung zwischen dem zweiten Block von Helices und den anderen Domänen zu groß, um Wasserstoffbrücken auszubilden, was direkt die hohe Flexibilität in diesem Bereich von F3 erklärt.

6. 3 Diskussion

Der Tricorn interagierende Faktor F3 aus dem Organismus *Thermoplasma acidophilum* ist eine Zinkprotease, die in vier Domänen unterteilt ist, von denen drei strukturell nahe mit der humanen Leuktrien A4 Hydrolase verwandt sind. Überlagerung der einzelnen Domänen dieser Proteine zeigt hohe Ähnlichkeit in der Anordnung ihrer Sekundär-Strukturelemente. Die sattel-artig geformte N-terminale Domäne, sowie die thermolysin-artige, katalytische Domäne II, in der sowohl die relative Anordnung der beiden „*Active Site*“-Helices als auch die Position der zinkbindenden Reste identisch sind, können als strukturelle Merkmale dieser neuen Gruppe von Aminopeptidasen angesehen werden. Während die fass-artig geformte Domäne III nur in F3 zu finden ist, zeigt sich, dass die superhelikale Anordnung der Helices in der C-terminalen Domäne auch bei beiden Proteasen zu beobachten ist. Allerdings unterscheidet sich die relative Position dieser Domäne in beiden Proteinen. Während diese Domäne in F3 deutlich erweitert ist und durch den oben beschriebenen Knick in der Superhelix die große Kluft vor dem aktiven Zentrum gebildet wird, besetzt sie in LTA4H genau die Position dieser Kluft, so dass das aktive Zentrum dort im Vergleich zu F3 deutlich stärker eingeengt wird. Wie im strukturbasierten Alignment in Abbildung 22 zu sehen ist, sind die zinkbindenden Reste über die gesamte Familie in den Motiven HEXXH und NEFXA konserviert, was die direkte Einordnung in die Gruppe der Gluzincine erlaubt. Die im Alignment gezeigten Vertreter dieser Familie weisen alle Aminopeptidase-Funktionalität auf und können damit zu der Aminopeptidase-Familie der Gluzincine zusammengefasst werden, von denen F3 und LTA4H die ersten strukturell bekannten Vertreter sind. Merkmal dieser neuen Gruppe der Aminopeptidasen ist ihr dritter Zinkbindungsligand, der sich in einer konservierten Distanz von 18 Aminosäuren vom zweiten zinkbindenden Histidin im Motiv NEXFA befindet. Weiteres Merkmal ist die Bindungsstelle des Substrat-N-Terminus, die durch die Carboxylatgruppen von zwei Glutamaten gebildet wird. In F3 handelt es sich bei den Glutamaten um Glu^{101} und Glu^{233}, die zusammen mit dem Glutamat Glu^{288} aus dem zweiten Zink-Bindungsmotiv NEXFA eine stark negativ geladene Vertiefung formen, die die N-terminale Ammonium-Gruppe des Substrat perfekt binden kann. Ausnahme macht auf der 101er-Position nur LTA4H, die an dieser Position eine Glutamin-Seitenkette trägt, die aber mit der besonderen Funktion der LTA4H in der Leukotrien-Kaskade als Katalysator bei der Hydrolyse des Leukotriens A4 Epoxids zu erklären ist.

Die Überlagerung der mechanistisch relevanten Reste von F3, LTA4H und Thermolysin, wie sie in Abbildung 32 dargestellt ist, zeigt deutlich, dass die zinkbindenden Reste dieser drei Zinkproteasen fast identisch positioniert sind. Man kann deshalb den für Thermolysin vorgeschlagenen Proteolyse-Mechanismus direkt auf die Aminopeptidasen F3 und LTA4H übertragen.

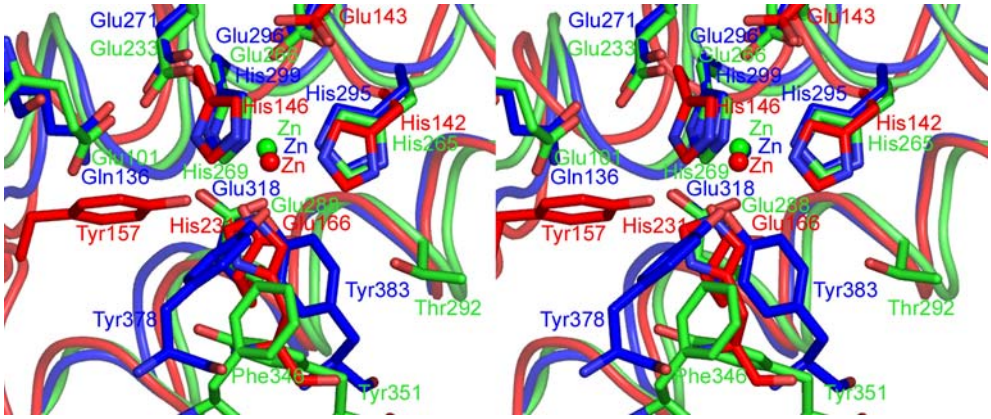


Abbildung 32: Stereodarstellung der mechanistisch relevanten Reste von F3, von Thermolysin und von LTA4H

Dargestellt sind die Hauptketten von F3 (grün), Thermolysin (rot) und LTA4H (blau) im Bereich der zinkbindenden Reste. Die im Text diskutierten Reste sind als Stabmodelle dargestellt. Die Farben der Reste entsprechen den zugehörigen Proteinfarben

Der folgende Proteolyse-Mechanismus von F3 basiert auf dem für Thermolysin (Holmes et al. 1983) und für Aminopeptidase N (Luciani et al. 1998) vorgeschlagenen Mechanismus. Der proteolytische Zyklus beginnt mit der Bindung des N-Terminus des Substrats über die Carboxylatgruppen von Glu^{101} und Glu^{233}. Glu^{266} fungiert als generelle Base, die zusammen mit dem Zinkion das „*active Site*“-Wasser polarisiert. Das Substrat ist über den Carbonylsauerstoff der zu schneidenden Bindung an das Zinkion gebunden und wird dort auch wie das „*active Site*“-Wasser polarisiert. Das Zink-gebundene Solvensmolekül überträgt ein Proton auf den Carbonylsauerstoff des Substrats und greift dann nukleophil die zu spaltende Bindung an, wobei das tetraedrische Zwischenprodukt entsteht. In dem Zwischenprodukt weist das Zinkion mit den drei zinkbindenden Resten, dem „*active Site*“-Wasser und dem Carbonylsauerstoff des Substrats eine Pentakoordinierung auf. Das zweite Proton des „*Active Site*“-Wassers wird auf den neu gebildeten N-Terminus übertragen. Glu^{266} übernimmt hier die Funktion eines Proton-Transfer-Shuttles, der das abstrahierte Proton auf den neuen N-Terminus überträgt.

Darüber hinaus stabilisiert Glu^{266} den neuen N-Terminus über eine Salzbrücke. Die P1-Aminosäure ist über ihre C-terminale Carboxylatgruppe an das Zinkion gebunden. Sowohl die Aminosäure als auch der neu gebildete N-Terminus werden durch die Bindung eines neuen Wassermoleküls von dem aktiven Zentrum gelöst, so dass F3 in einen neuen proteolytischen Zyklus eintreten kann. In Thermolysin wird das tetraedrische Zwischenprodukt durch die Seitenketten der Reste Tyr^{157} und His^{231} stabilisiert. Die Hydroxygruppe von Tyr^{157} und der Imidazolstickstoff von His^{231} stellen als Protondonoren dem Zwischenprodukt ihre Protonen zu Verfügung (Holmes et al. 1983; Gomis-Rüth et al. 1993; Gomis-Rüth et al. 1994). In der Überlagerung in Abbildung 31 sieht man, dass die Position von His^{231} in Thermolysin von den Seitenketten Tyr^{351} in F3 und Tyr^{383} in LTA4H (Blomster et al. 1995; Thunnissen et al. 2001) besetzt wird, die beide zum ersten Teil der Helix H7 gehören und die Protonendonorfunktion ausfüllen. Unterschiede zwischen den drei Zinkproteasen finden sich in der Position des zweiten Protondonor-Restes. In Thermolysin befindet sich Tyr^{157} in der langen Schleife zwischen den beiden „*active Site*“-Helices. Im Vergleich zu F3 und LTA4H ist diese Schleife in Thermolysin deutlich verlängert, was auf das im Abschnitt 6.2.8 bereits erwähnte fehlende zweisträngige β-Faltblatt zurückzuführen ist. Durch die deutliche Verlängerung dieser Schleife ist sie um 4,4 Å zum Zink hin verschoben, was die Hydroxygruppe von Tyr^{157} in eine perfekte Position bringt, um als Protondonor zu fungieren. Die Tyr^{157}-Position in Thermolysin ist in F3 und in LTA4H mit Tryptophanen besetzt, die grundsätzlich aufgrund ihrer chemischen Natur, ähnlich wie His^{231} in Thermolysin, die Protondonor-Funktionalität übernehmen könnten. Es zeigt sich jedoch, dass die Distanz zwischen dem Stickstoff und dem Zinkion aufgrund der verkürzten Schleifen in F3 und LTA4H deutlich zu groß ist, um diese Funktionalität auszufüllen. In LTA4H übernimmt Tyr^{378} diese Funktion (siehe Abbildung 32). Allerdings ist das, wie das Alignment in Abbildung 22 zeigt, eine Ausnahme in dieser Position, da sie bei allen anderen Aminopeptidasen mit einer hydrophoben Phenylalanin-Seitenkette (Phe^{346} in F3) besetzt ist. Das heißt also, dass durch die Phe/Tyr-Substitution in allen Mitgliedern dieser Familie, außer in LTA4H, der zweite Protondonor fehlt. Es ist grundsätzlich vorstellbar, dass die Punktmutation F345Y zu einer deutlichen Erhöhung der Protease-Aktivität von F3 führen könnte, weil dann neben der Tyr^{351}-Seitenkette noch ein weiterer Protondonor zur Stabilisierung des Zwischenprodukts zur Verfügung stehen würde. Auch die Thr^{292}-Seitenkette in F3, die zur zweiten „*active Site*“-Helix H4 gehört, könnte möglicherweise diese Funktion übernehmen. Insbesondere da sie auch über alle

Mitglieder dieser Familie, ausgenommen in der humanen pyromycin-sensitiven Aminopeptidase (Valin), konserviert ist. Die vorgeschlagenen Punktmutanten könnten helfen, die Frage zu klären, welche Reste neben den zinkbindenden Resten an der proteolytischen Umsetzung von F3 und von den verwandten Aminopeptidasen beteiligt sind.

Darüber hinaus lassen sich aus der identischen Positionierung der mechanistisch relevanten Reste Rückschlüsse über die evolutionäre Verwandtschaft dieser drei Zinkproteasen ziehen. Die identische Positionierung der zinkbindenden Reste sowie der generellen Base reflektieren die Koevolution. Allerdings unterscheiden sich die drei Zinkproteasen in den Resten, die die Protondonorfunktion erfüllen und in den Sekundär-Strukturelementen, zu denen diese Reste gehören. Das heißt also, dass alle Proteasen den gleichen proteolytischen Mechanismus besitzen, dass sich aber unterschiedliche Reste als Protondonor entwickelt haben. Abschließend kann man also sagen, dass F3, Thermolysin und LTA4H eine konvergente Evolution zeigen, deren treibende Kraft ein einziger, fundamentaler Proteolyse-Mechanismus ist.

Der Vergleich der Seitenketten von Tyr^{383}(LTA4H) und Tyr^{351}(F3) in Abbildung 32 zeigt, dass die Tyr^{351}-Seitenkette deutlich vom Zinkion weg gedreht ist und dass außerdem die gesamte Helix H7, zu der Tyr^{351} gehört, um fast 2,7 Å in südlicher Richtung verschoben ist. Beides deutet stark darauf hin, dass es sich bei den drei Kristallstrukturen von F3 um inaktive Konformationen handelt. Die aktive unterscheidet sich von den inaktiven Konformationen mit hoher Wahrscheinlichkeit darin, dass die Tyr^{351}-Seitenkette zum Zinkion hingedreht ist und so die Hydroxygruppe in eine Distanz von 3,7 Å zum Zinkion kommt, um dort als Protondonor zu fungieren. Darüber hinaus ist sehr wahrscheinlich, dass die Konformationsänderung von der inaktiven zur aktiven F3-Konformation durch die Substratbindung induziert wird. In Abbildung 33 sind die aktive und die inaktive Form der Tyr^{351}-Seitenkette gekennzeichnet.

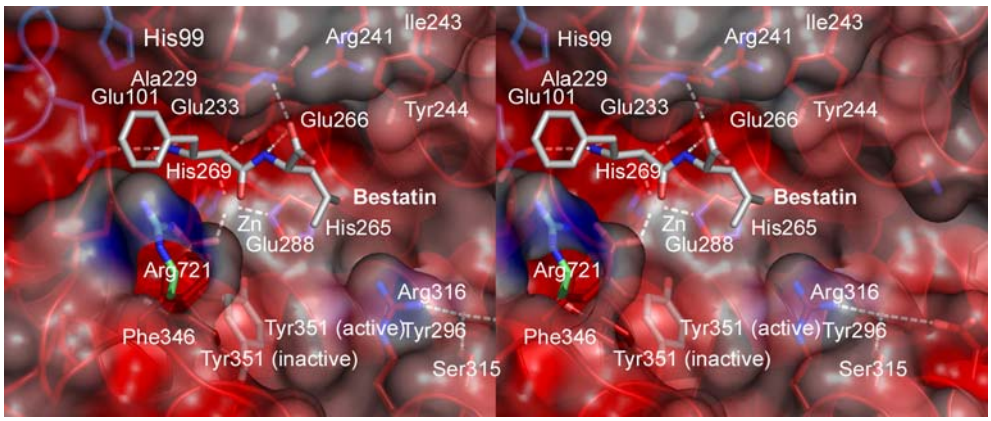


Abbildung 33: Stereodarstellung der direkten Aufsicht auf das aktive Zentrum von F3 mit gebundenen Bestatin-Modell

Die Oberfläche und die Sekundär-Strukturelemente sind dargestellt. Die Farbwahl der Sekundär-Strukturelemente entspricht der aus Abbildung 23. Die Reste, die das aktive Zentrum formen, sowie die zinkbindenden Reste sind als Stabmodelle dargestellt. Die Färbung der semitransparenten Oberfläche entspricht dem elektrostatischen Potential von 20 kT/e (blau) bis -20 kT/e (rot). Das Zinkion ist als graue Kugel dargestellt, während die aktive Tyr^{351}-Seitenkette und das Bestatin-Modell als weiße Stabmodelle gezeigt sind. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte weiße Linien angedeutet.

Das in Abbildung 33 dargestellte Modell von Bestatin in das aktive Zentrum von F3 gebunden basiert auf dem Komplex von Bestatin mit LTA4H (Thunnissen et al. 2001). Der Phenylring von Bestatin steckt zwischen den Seitenketten von Glu^{101} und Ala^{229}. Verglichen mit LTA4H, wo die Ala^{229}-Position von Tyr^{267} besetzt wird, weist die P1-Tasche von F3 deutlich mehr Platz auf. Der aromatische Ring von Tyr^{267} scheint jedoch einen deutlich besseren Wechselwirkungspartner für den Bestatin-Phenylring darzustellen. Die Substratspezifität in der F3-P1-Tasche wird durch die His^{99}-Seitenkette generiert, die die einzige Seitenkette in dieser Tasche mit der Möglichkeit ist, die von F3 bevorzugten, sauren Reste zu binden. Der Austausch des Bestatin-Phenylrings durch eine Glutamat-Seitenkette (Daten nicht gezeigt) macht deutlich, dass die Carboxylatgruppe des Glutamats perfekt positioniert wäre, um in Wechselwirkung mit dem Nε1-Stickstoff von His^{99} zu treten. Da His^{99} der einzige Rest in dieser Schleife ist, der für die Spezifität von F3 zuständig ist, kann man diese Schleife als Spezifitäts-Schleife von F3 bezeichnen. Interessanterweise ist diese Position in allen anderen verglichenen Aminopeptidasen mit einer Glutamin-Seitenkette besetzt. Im Fall der Aminopeptidasen F2 und F3 von *Thermoplasma acidophilum* erklärt der Austausch von Histidin zu Glutamin in F2 das deutlich größere Substratspektrum gegenüber neutralen, hydrophoben und basischen Aminosäuren, während das Substratspektrum von F3 auf saure Aminosäuren begrenzt ist.

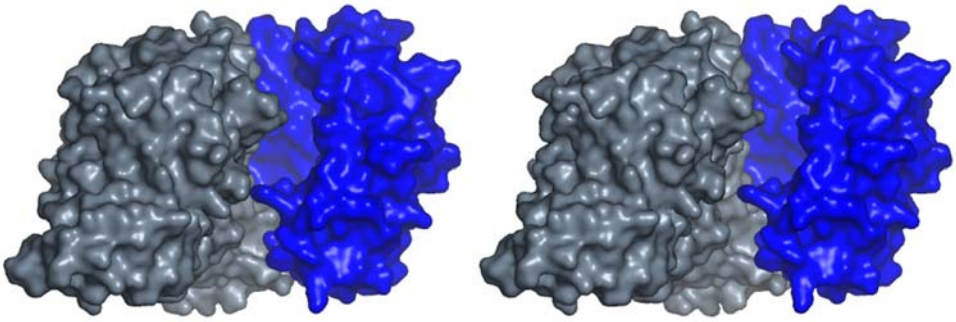
Der N-Terminus von Bestatin ist, wie in LTA4H, über die Carboxylatgruppen von Glu^{101} und Glu^{233} gebunden. Die Hydroxygruppe und die direkt benachbarte Carbonyl-Gruppe von Bestatin imitieren den tetraedrischen Übergangszustand, in dem das Zinkion die gleiche Pentakoordinierung aufweist, die auch bei einem prozessierten Substrat zu erwarten wäre. Auch die Bindung des C-Terminus von Bestatin über die Hauptketten-Stickstoffatome der Reste Ala^{229} und Gly^{230} ist in F3 und LTA4H konserviert und identisch. Darüber hinaus wird aus Abbildung 33 deutlich, dass Glu^{266} als generelle Base über Wasserstoffbrücken mit dem der Carbonyl-Gruppe direkt benachbarten Hauptketten-Stickstoffatom von Bestatin verbunden ist. Hier kann es seine Funktion als Proton-Transfer-Shuttle sowie als Salzbrückenpartner für den neu entstandenen Substrat-N-Terminus perfekt ausfüllen. Das auf dem LTA4H-Bestatin-Komplex basierende Modell von Bestatin im aktiven Zentrum von F3 ist ein exzellentes Modell für die Substratbindung im aktiven Zentrum von F3, was auch absolut im Einklang mit dem für F3 vorgeschlagenen Proteolyse-Mechanismus steht.

Die C-terminale Methionin-Seitenkette von F3 ist durch die Positionierung in einer hydrophoben Vertiefung durch die Struktur vor Autolyse geschützt. Das erklärt auch die Unterschiede zum C-Terminus der LTA4H, der, wie bereits erwähnt, frei zugänglich ist und strukturell nicht geschützt ist. Für die Funktion der LTA4H als Katalysator in der Leukotrien-Kaskade ist es nicht nötig, dass der C-Terminus vor Autolyse geschützt. Eine ähnliche Stabilisierung des C-Terminus, wie sie in F3 zu beobachten ist, findet man auch in der Prolyl-Iminopeptidase F1, bei der die Stabilisierung über die cytosolische Cysteinbrücke Cys^{5}-Cys^{22} erfolgt (Goettig et al. 2002).

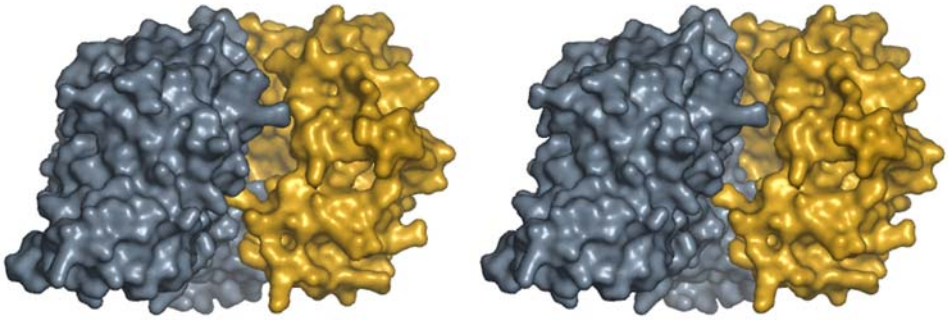
Die drei konformationellen Schnappschüsse von F3 geben tiefere Einsichten in die molekular dynamischen Veränderungen, die bei der Bindung und bei der Prozessierung von F3-Substraten in dem Molekül vor sich gehen. Wie unter Abschnitt 6.2.6 bereits angesprochen ist nur die C-terminale Domäne IV hoch flexibel, während die drei anderen Domänen in den drei unterschiedlichen Konformationen nahezu unverändert bleiben. Insbesondere die Anordnung der Helices im zweiten Block in Domäne IV zeigen deutliche Unterschiede, die die Architektur der großen Kluft vor dem aktiven Zentrum von F3 direkt beeinflussen. Die drei Schnappschüsse von F3 (MOL1/$P22_12_1$ offene Konformation; MOL3/$P3_221$ intermediäre Konformation und MOL1/$P22_12_1$ geschlossene Konformation) lassen Schlüsse darüber zu, wie ein Substrat in das aktive Zentrum von F3 eintritt und wie das Produkt, die freie Aminosäure, wieder aus dem aktiven Zentrum entlassen wird. In der

offenen Konformation von MOL1 ist die tiefe Kluft für das Substrat entweder von vorne oder von oben zugänglich (siehe Abbildung 34a). In der intermediären Konformation (siehe Abbildung 34b) ist der Boden der großen Kluft bereits geschlossen und auch die obere Öffnung ist deutlich verengt, was zum einen dazu führt, dass der Eintritt eines weiteren Substrats in die tiefe Kluft von F3 verhindert wird, und zum anderen dazu, dass das gebundene Substrat nicht durch ein Substrat ersetzt werden kann, was den Spezifitätskriterien von F3 nicht genügt und dementsprechend nicht umgesetzt werden würde. Nur der Mittelteil der großen Kluft bleibt geöffnet in dieser intermediären Konformation und könnte möglicherweise den Ausgang für die Substrate darstellen, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften nicht in die P1-Tasche von F3 gebunden werden können.

a)



b)



c)

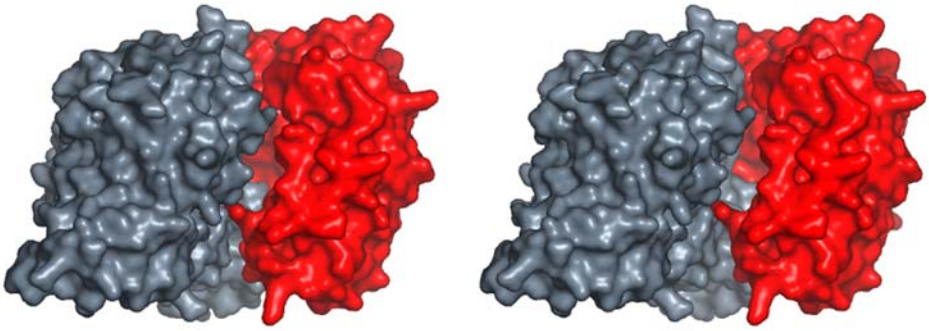


Abbildung 34: Stereodarstellung der Oberfläche der einzelnen Konformationen von F3

a) offene Konformation, MOL1, $P22_12_1$

b) intermediäre Konformation MOL3, $P3_221$

c) geschlossene Konformation, MOL2, $P22_12_1$

In der geschlossenen Konformation von F3 (siehe Abbildung 34c) ist die große Kluft vollständig geschlossen, so dass kein Substrat hineingelangen kann und nur das Produkt, die freie Aminosäure, aus dem in Abschnitt 6.2.7 beschriebenen kleinen Canyon, der sich am Boden in der in Abbildung 34c gewählten Orientierung befindet, aus dem aktive Zentrum von F3 heraustreten kann.

Bezüglich der Wechselwirkung der Tricornprotease mit den dazu gehörigen interagierenden Faktoren F1, F2 und F3 gibt es bisher nur für F1 experimentelle Hinweise, dass es zu der Ausbildung von supermolekularen Komplexen zwischen der Tricornprotease und ihren Faktoren kommt (Tamura et al. 1996; Tamura et al. 1998; Goettig et al. 2002). Demnach ist der gebildete Komplex sehr schwach und scheint in erster Linie als Folge der Substratübergabe von der Tricornprotease zum interagierenden Faktor F1 zu entstehen. Mit dieser Substrat-induzierten Komplexbildung hätte die Tricornprotease die Möglichkeit, ihre Produkte gezielt an die einzelnen Protease-Faktoren F1, F2 und F3 entsprechend ihrer jeweiligen Substratspezifität zu übergeben.

Die Tricorn-Produkte verlassen die Tricornprotease hauptsächlich durch den β6-Propeller (Brandstetter et al. 2001; Kim et al. 2002). Das würde bedeuten, dass man, wenn eine Komplexbildung zwischen der Tricornprotease und F3 stattfinden sollte, den β6-Propeller als Andockstelle für F3 erwarten würde. Aus dem in Abbildung 35 dargestellten supermolekularen Komplex zwischen der Tricornprotease und F3 kann man deutlich sehen, dass der β6-Propeller aufgrund seiner geometrischen Abmessungen recht gut auf den Eingangsbereich von F3 passt. Durch die drei unterschiedlichen Konformationen

(siehe Abbildung 34a-c) von F3 wird darüber hinaus schnell klar, dass die Tricornprotease ihre Produkte nur an die offene Konformation von F3 übergeben kann, weil in den anderen Konformationen der obere Eingang zum aktiven Zentrum von F3 blockiert ist. Die Freisetzung von F3 durch die Tricornprotease würde dann im Zusammenspiel mit dem konformationellen „Atmen“ während des katalytischen Zyklus von F3 erfolgen, so dass die Tricornprotease wieder die Möglichkeit hätte, ein neu hergestelltes, weiteres Produkt an den entsprechenden Protease-Faktor F1, F2 oder F3 weiter zugeben. Der oben beschriebene Mechanismus des Substrat-Transfers und der Komponenten-Wechselwirkung zwischen der Tricornprotease und F3 ist bisher noch nicht experimentell nachgewiesen und weitere Experimente, so wie zum Beispiel dynamische Lichtstreuungsexperimente und Kleinwinkelstreung von Röntgenstrahlen, sind nötig, um zum einen nachzuweisen, ob die Komponenten-Wechselwirkung überhaupt statt findet, und zum anderen um nachzuweisen, auf welche Art und Weise der Substrattransfer von der Tricornprotease zu F3 abläuft.

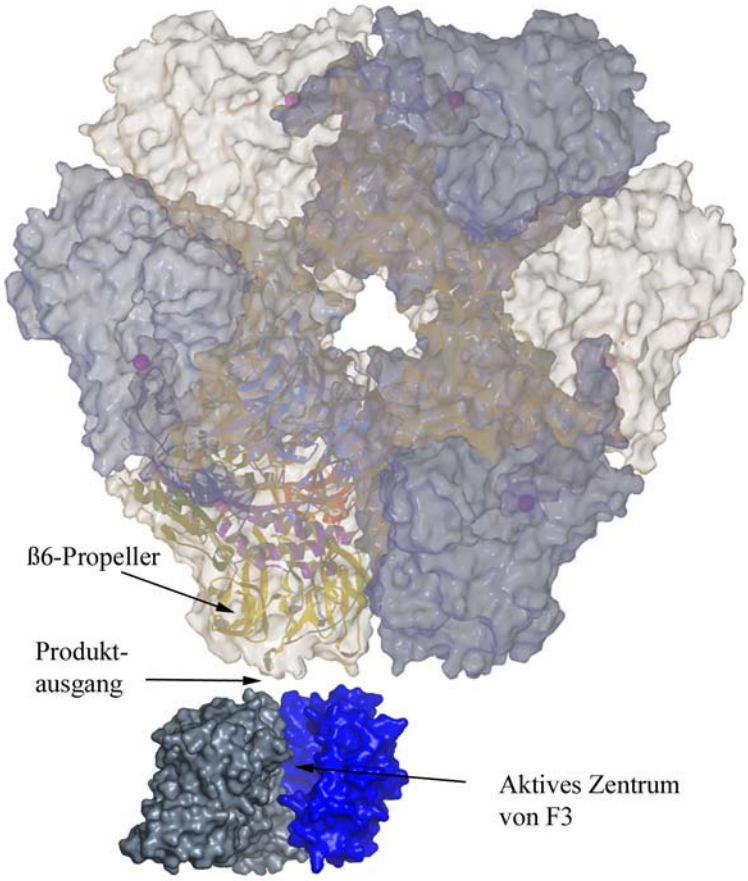


Abbildung 35: Darstellung des super-molekularen Komplexes zwischen der Tricornprotease und F3
Die Tricornprotease ist als Hexamer dargestellt, dessen 6 Untereinheiten unterschiedliche Farben aufweisen. Eine Untereinheit ist mit einer semi-transparenten Oberfläche bedeckt, unter der der β6-Propeller als gelber Ribbonplot zu sehen ist. F3 ist als Oberfläche in der offenen Konformation von MOL1($P22_12_1$) dargestellt.

7. Literaturverzeichnis

Auld, D.S. 1997. Zinc catalysis in metalloproteases. In *Metal Sites in Proteins and Models*, pp. 29-50.

Bailey, S. 1994. The Ccp4 Suite - Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **50:** 760-763.

Barton, G.J. 1993. Alscript - a Tool to Format Multiple Sequence Alignments. *Protein Engineering* **6:** 37-40.

Blomster, M., Wetterholm, A., Mueller, M.J., and Haeggstrom, J.Z. 1995. Evidence for a Catalytic Role of Tyrosine-383 in the Peptidase Reaction of Leukotriene-a(4) Hydrolase. *European Journal of Biochemistry* **231:** 528-534.

Blow DM. 1971. *The Enzymes*. Academic Press, Boca Raton.

Blundell TJ, J.L. 1976. *Protein Crystallography*. Academic Press, New York.

Bode, W., Gomisruth, F.X., and Stockler, W. 1993. Astacins, Serralysins, Snake-Venom and Matrix Metalloproteinases Exhibit Identical Zinc-Binding Environments (Hexxhxxgxxh and Met-Turn) and Topologies and Should Be Grouped into a Common Family, the Metzincins. *Febs Letters* **331:** 134-140.

Bode, W., and Huber, R. 1992. Natural Protein Proteinase-Inhibitors and Their Interaction with Proteinases. *European Journal of Biochemistry* **204:** 433-451.

Bode, W., and Huber, R. 2000. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1477:** 241-252.

Bode, W., Meyer, E., and Powers, J.C. 1989. Human-Leukocyte and Porcine Pancreatic Elastase - X-Ray Crystal-Structures, Mechanism, Substrate-Specificity, and Mechanism-Based Inhibitors. *Biochemistry* **28:** 1951-1963.

Bode, W., Schwager, P., and Huber, R. 1978. Transition of Bovine Trypsinogen to a Trypsin-Like State Upon Strong Ligand-Binding - Refined Crystal-Structures of Bovine Trypsinogen-Pancreatic Trypsin-Inhibitor Complex and of Its Ternary Complex with Ile-Val at 1.9 a Resolution. *Journal of Molecular Biology* **118:** 99-112.

Bode, W., Turk, D., and Karshikov, A. 1992. The Refined 1.9-Angstrom X-Ray Crystal-Structure of D-Phe-Pro-Arg Chloromethylketone-Inhibited Human Alpha-Thrombin - Structure-Analysis, Overall Structure, Electrostatic Properties, Detailed Active-Site Geometry, and Structure-Function-Relationships. *Protein Science* **1:** 426-471.

Bohley, P., and Seglen, P.O. 1992. Proteases and Proteolysis in the Lysosome. *Experientia* **48:** 151-157.

Bork, P., and Patthy, L. 1995. The Sea Module - a New Extracellular Domain Associated with O-Glycosylation. *Protein Science* **4:** 1421-1425.

Bradford, M.M. 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72:** 248-254.

Brandstetter, H., Kim, J.S., Groll, M., Gottig, P., and Huber, R. 2002. Structural basis for the processive protein degradation by tricorn protease. *Biological Chemistry* **383:** 1157-1165.

Brandstetter, H., Kim, J.S., Groll, M., and Huber, R. 2001. Crystal structure of the tricorn protease reveals a protein disassembly line. *Nature* **414:** 466-470.

Brown, M.S., Herz, J., and Goldstein, J.L. 1997. LDL-receptor structure - Calcium cages, acid baths and recycling receptors. *Nature* **388:** 629-630.

Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. 1998. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **54:** 905-921.

Cheronis JC, R.J. 1993. *Protease, protease inhibitors and protease derived peptides*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 3 - 18.

Czapinska, H., and Otlewski, J. 1999. Structural and energetic determinants of the S-1-site specificity in serine proteases. *European Journal of Biochemistry* **260:** 571-595.

Delano, W. 2000. *http://www.delanoscientific.com, San Carlos, California, USA*.

Drenth J. 1994. *Principles of protein X-ray Crystallography*. Springer Verlag, New York.

Engh, R.A., and Huber, R. 1991. Accurate Bond and Angle Parameters for X-Ray Protein-Structure Refinement. *Acta Crystallographica Section A* **47:** 392-400.

Ewald PP. 1921. Das "Reziproke Gitter" in der Strukturtheorie. *Z. Kristallogr*. **56:** 491-500.

Flaumenhaft, R., and Rifkin, D.B. 1992. The Extracellular Regulation of Growth-Factor Action. *Molecular Biology of the Cell* **3:** 1057-1065.

Fonseca, P., and Light, A. 1983. The Purification and Characterization of Bovine Enterokinase from Membrane-Fragments in the Duodenal Mucosal Fluid. *Journal of Biological Chemistry* **258:** 4516-4520.

Friedrich, R., Fuentes-Prior, P., Ong, E., Coombs, G., Hunter, M., Oehler, R., Pierson, D., Gonzalez, R., Huber, R., Bode, W., et al. 2002. Catalytic domain structures of MT-SP1/matriptase, a matrix-degrading transmembrane serine proteinase. *Journal of Biological Chemistry* **277:** 2160-2168.

Fülöp, V., Bocskei, Z., and Polgar, L. 1998. Prolyl oligopeptidase: An unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell* **94:** 161-170.

Goettig, P., Groll, M., Kim, J.S., Huber, R., and Brandstetter, H. 2002. Structures of the tricorn-interacting aminopeptidase F1 with different ligands explain its catalytic mechanism. *Embo Journal* **21:** 5343-5352.

Gomis-Rüth, F.X., Kress, L.F., Kellermann, J., Mayr, I., Lee, X., Huber, R., and Bode, W. 1994. Refined 2-Center-Dot-0 Angstrom X-Ray Crystal-Structure of the Snake-Venom Zinc-Endopeptidase Adamalysin-Ii - Primary and Tertiary Structure Determination, Refinement, Molecular-Structure and Comparison with Astacin, Collagenase and Thermolysin. *Journal of Molecular Biology* **239:** 513-544.

Gomis-Rüth, F.X., Stocker, W., Huber, R., Zwilling, R., and Bode, W. 1993. Refined 1.8 Angstrom X-Ray Crystal-Structure of Astacin, a Zinc-Endopeptidase from the Crayfish Astacus-Astacus L - Structure Determination, Refinement, Molecular-Structure and Comparison with Thermolysin. *Journal of Molecular Biology* **229:** 945-968.

Hangauer, D.G., Gund, P., Andose, J.D., Bush, B.L., Fluder, E.M., McIntyre, E.F., and Smith, G.M. 1985. Modeling the Mechanism of Peptide Cleavage by Thermolysin. *Annals of the New York Academy of Sciences* **439:** 124-139.

Hardingham, T.E., and Fosang, A.J. 1992. Proteoglycans - Many Forms and Many Functions. *Faseb Journal* **6:** 861-870.

Harris, J.R. 1968. Release of a Macromolecular Protein Component from Human Erythrocyte Ghosts. *Biochimica Et Biophysica Acta* **150:** 534-&.

Hase, J., Kobashi, K., Nakai, N., Mitsui, K., Iwata, K., and Takadera, T. 1980. Quaternary Structure of Carp Muscle Alkaline Protease. *Biochimica Et Biophysica Acta* **611:** 205-213.

Hedstrom J. 2002. Serine Protease mechanism and Specificity. *Chemical Reviews* **102:** 4501-4523.

Hegerl, R., Pfeifer, G., Puhler, G., Dahlmann, B., and Baumeister, W. 1991. The 3-Dimensional Structure of Proteasomes from Thermoplasma-Acidophilum as Determined by Electron-Microscopy Using Random Conical Tilting. *Febs Letters* **283:** 117-121.

Holmes, M.A., Tronrud, D.E., and Matthews, B.W. 1983. Structural-Analysis of the Inhibition of Thermolysin by an Active-Site-Directed Irreversible Inhibitor. *Biochemistry* **22:** 236-240.

Hooper, J.D., Clements, J.A., Quigley, J.P., and Antalis, T.M. 2001. Type II transmembrane serine proteases - Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **276:** 857-860.

Hooper, N. 1996. *Zinc Metalloproteases in Health and Disease*. Taylor & Francis, London, pp. 1-22.

Hooper, N.M. 1994. Families of Zinc Metalloproteases. *Febs Letters* **354:** 1-6.

Jancarik, J., and Kim, S.H. 1991. Sparse-Matrix Sampling - a Screening Method for Crystallization of Proteins. *Journal of Applied Crystallography* **24:** 409-411.

Jones, T.A. 1978. A graphic model building and refinement system for macromolecular structure determination. *Journal of Applied Crystallography* **11:** 268-272.

Jones, T.A., and Thirup, S. 1986. Using Known Substructures in Protein Model-Building and Crystallography. *Embo Journal* **5:** 819-822.

Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., and Kjeldgaard, M. 1991. Improved Methods for Building Protein Models in Electron-Density Maps and the Location of Errors in These Models. *Acta Crystallographica Section A* **47:** 110-119.

Katz, B.A., Elrod, K., Verner, E., Mackman, R.L., Luong, C., Shrader, W.D., Sendzik, M., Spencer, J.R., Sprengeler, P.A., Kolesnikov, A., et al. 2003. Elaborate manifold of short hydrogen bond arrays mediating binding of active site-directed serine protease inhibitors. *Journal of Molecular Biology* **329:** 93-120.

Kiefersauer, R., Than, M.E., Dobbek, H., Gremer, L., Melero, M., Strobl, S., Dias, J.M., Soulimane, T., and Huber, R. 2000. A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes. *Journal of Applied Crystallography* **33:** 1223-1230.

Kim, J.S., Groll, M., Musiol, H.A., Behrendt, R., Kaiser, M., Moroder, L., Huber, R., and Brandstetter, H. 2002. Navigation inside a protease: Substrate selection and product exit in the tricorn protease from Thermoplasma acidophilum. *Journal of Molecular Biology* **324:** 1041-1050.

Kjellen, L., and Lindahl, U. 1991. Proteoglycans - Structures and Interactions. *Annual Review of Biochemistry* **60:** 443-475.

Kounnas, M.Z., Church, F.C., Argraves, W.S., and Strickland, D.K. 1996. Cellular internalization and degradation of antithrombin III-thrombin, heparin cofactor II-thrombin, and alpha(1)-antitrypsin-trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein. *Journal of Biological Chemistry* **271:** 6523-6529.

Kraulis, P.J. 1991. Molscript - a Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography* **24:** 946-950.

Lang, J.C., and Schuller, D.E. 2001. Differential expression of a novel serine protease homologue in squamous cell carcinoma of the head and neck. *British Journal of Cancer* **84:** 237-243.

Laskowski, R.A., Moss, D.S., and Thornton, J.M. 1993. Main-Chain Bond Lengths and Bond Angles in Protein Structures. *Journal of Molecular Biology* **231:** 1049-1067.

Leslie, A.G.W. 1992. Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* **26**.

Lin, C.Y., Anders, J., Johnson, M., and Dickson, R.B. 1999. Purification and characterization of a complex containing matriptase and a Kunitz-type serine protease inhibitor from human milk. *Journal of Biological Chemistry* **274:** 18237-18242.

Loewe J., S.D., Jap B., Zwickl P.; Baumeister W., Huber R.,. 1995. Crystal Structure of the 20S Proteasome from the Archaeon T. acidophilum at 3.4 A Resolution. *Science* **268:** 533-539.

Louvard, D., Maroux, S., Baratti, J., and Desnuell.P. 1973. Distribution of Enterokinase in Porcine Intestine and on Its Subcellular Localization. *Biochimica Et Biophysica Acta* **309:** 127-137.

Lu, D.S., Futterer, K., Korolev, S., Zheng, X.L., Tan, K., Waksman, G., and Sadler, J.E. 1999. Crystal structure of enteropeptidase light chain complexed with an analog of the trypsinogen activation peptide. *Journal of Molecular Biology* **292:** 361-373.

Luciani, N., Marie-Claire, C., Ruffet, E., Beaumont, A., Roques, B.P., and Fournie-Zaluski, M.C. 1998. Characterization of Glu(350) as a critical residue involved in the N-terminal amine binding site of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2): Insights into its mechanism of action. *Biochemistry* **37:** 686-692.

Massa W. 1996. *Kristallstrukturbestimmung*. Teubner Verlag, Stuttgart.

Massagne J. 1991. A helping hand from proteoglycans. *Current Biology* **2:** 117-119.

Merritt, E.A., and Bacon, D.J. 1997. Raster3D: Photorealistic molecular graphics. In *Macromolecular Crystallography, Pt B*, pp. 505-524.

Merritt, E.A., and Murphy, M.E.P. 1994. Raster3d Version-2.0 - a Program for Photorealistic Molecular Graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **50:** 869-873.

Navaza, J. 1994. Amore - an Automated Package for Molecular Replacement. *Acta Crystallographica Section A* **50:** 157-163.

Netzel-Arnett, S., Hooper, J.D., Szabo, R., Madison, E.L., Quigley, J.P., Bugge, T.H., and Antalis, A.M. 2003. Membrane anchored serine proteases: A rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **22:** 237-258.

Nicholls, A., Bharadwaj, R., and Honig, B. 1993. Grasp - Graphical Representation and Analysis of Surface-Properties. *Biophysical Journal* **64:** A166-A166.

Nykjaer, A., Conese, M., Christensen, E.I., Olson, D., Cremona, O., Gliemann, J., and Blasi, F. 1997. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *Embo Journal* **16:** 2610-2620.

Otwinowski, Z., and Minor, W. 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Macromolecular Crystallography, Pt A*, pp. 307-326.

Pavlov, I. 1904. Nobel Lecture, Physiology and Medicine. *The Nobel Foundation*.

Perona, J.J., and Craik, C.S. 1995. Structural Basis of Substrate-Specificity in the Serine Proteases. *Protein Science* **4:** 337-360.

Peters, J.M. 1994. Proteasomes - Protein-Degradation Machines of the Cell. *Trends in Biochemical Sciences* **19:** 377-382.

Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M., and Lopez-Otin, C. 2003. Human and mouse proteases: A comparative genomic approach. *Nature Reviews Genetics* **4:** 544-558.

Rockel, B., Jakana, J., Chiu, W., and Baumeister, W. 2002. Electron cryo-microscopy of VAT, the archaeal p97/CDC48 homologue from Thermoplasma acidophilum. *Journal of Molecular Biology* **317:** 673-681.

Ruoslahti, E. 1988. Structure and Biology of Proteoglycans. *Annual Review of Cell Biology* **4:** 229-255.

Ruoslahti, E., and Yamaguchi, Y. 1991. Proteoglycans as Modulators of Growth-Factor Activities. *Cell* **64:** 867-869.

Schlechter I, B.A. 1967. On the side of the active site in proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27:** 157-162.

Sheldrick, G. 1984. Shelx-84 - a Program System for Crystal-Structure Solution and Refinement. *Acta Crystallographica Section A* **40:** C440-C440.

Shotton, D.M., and Watson, H.C. 1970. 3-Dimensional Structure of Crystalline Porcine Pancreatic Elastase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **257:** 111-&.

Sichler, K., Hopfner, K.P., Kopetzki, E., Huber, R., Bode, W., and Brandstetter, H. 2002. The influence of residue 190 in the S1 site of trypsin-like serine proteases on substrate selectivity is universally conserved. *Febs Letters* **530:** 220-224.

Somoza, J.R., Ho, J.D., Luong, C., Ghate, M., Sprengeler, P.A., Mortara, K., Shrader, W.D., Sperandio, D., Chan, H., McGrath, M.E., et al. 2003. The structure of the extracellular region of human hepsin reveals a serine protease domain and a novel scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain. *Structure* **11:** 1123-1131.

Stocker, W., and Bode, W. 1995. Structural Features of a Superfamily of Zinc-Endopeptidases - the Metzincins. *Current Opinion in Structural Biology* **5:** 383-390.

Strout GH, J.L. 1989. *X-ray Structure Determination*. John Wiley, New York.

Szabo, R., Wu, Q.Y., Dickson, R.B., Netzel-Arnett, S., Antalis, T.M., and Bugge, T.H. 2003. Type II transmembrane serine proteases. *Thrombosis and Haemostasis* **90:** 185-193.

Tamura, N., Lottspeich, F., Baumeister, W., and Tamura, T. 1998. The role of Tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation. *Cell* **95:** 637-648.

Tamura, T., Tamura, N., Lottspeich, F., and Baumeister, W. 1996. Tricorn protease (TRI) interacting factor 1 from Thermoplasma acidophilum is a proline iminopeptidase. *Febs Letters* **398:** 101-105.

Terwilliger, T.C. 2000. Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **56:** 965-972.

Terwilliger, T.C. 2003. Automated main-chain model building by template matching and iterative fragment extension. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **59:** 38-44.

Terwilliger, T.C., and Berendzen, J. 1999. Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **55:** 849-861.

Thunnissen, M., Nordlund, P., and Haeggstrom, J.Z. 2001. Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nature Structural Biology* **8:** 131-135.

Turk, D. 1996. MAIN96: An interactive software for density modifications, model building, structure refinement and analysis. *Meeting of the international Union of Crystallography Macromolecular Computing School***:** International Union of Crystallogarphy, PE Bourne and K. Watepaugh, eds. Western Washington University, WA.

Turk, V. 1999. *Proteases:new perspectives*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 1 - 12.

Walz, J., Tamura, T., Tamura, N., Grimm, R., Baumeister, W., and Koster, A.J. 1997. Tricorn protease exists as an icosahedral supermolecule in vivo. *Molecular Cell* **1:** 59-65.

Wenzel, T., and Baumeister, W. 1995. Conformational Constraints in Protein-Degradation by the 20s Proteasome. *Nature Structural Biology* **2:** 199-204.

Wight TN, K.M., Quarnstroem EE. 1992. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Current Opinion in Cell Biology* **4**.

Wlodawer, A., Deisenhofer, J., and Huber, R. 1987. Comparison of 2 Highly Refined Structures of Bovine Pancreatic Trypsin-Inhibitor. *Journal of Molecular Biology* **193:** 145-156.

Yasuoka, S., Ohnishi, T., Kawano, S., Tsuchihashi, S., Ogawara, M., Masuda, K., Yamaoka, K., Takahashi, M., and Sano, T. 1997. Purification, characterization, and localization of a novel trypsin-like protease found in the human airway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **16:** 300-308.

Zeslawska, E., Schweinitz, A., Karcher, A., Sondermann, P., Sperl, S., Sturzebecher, J., and Jacob, U. 2000. Crystals of the urokinase type plasminogen activator variant beta c-uPA in complex with small molecule inhibitors open the way towards structure-based drug design. *Journal of Molecular Biology* **301:** 465-475.

8. Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 1999 bis Dezember 2004 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Robert Huber in der Abteilung Strukturforschung des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Huber für die Überlassung der interessanten Themen, für sein fortwährendes Interesse am Fortschritt der Projekte und für die große wissenschaftliche Freiheit. Seine wohlwollende Unterstützung und sein Vertrauen in mich waren mir stets eine große Hilfe.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn PD. Dr. Hans Brandstetter für die Hilfe bei der Lösung der vielen kristallographischen Probleme im F3-Projekt, für seine große fachliche Kompetenz, die er mir stets geduldig zur Verfügung gestellt hat, und für die angenehme Art seiner Betreuung die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. Peter Goettig danke ich für die Klonierung des F3-Proteins, für viele hilfreiche Diskussionen, für seine ständige Bereitschaft, mir bei großen und kleinen Problemen zu helfen, und für die Bereitstellung von Bildmaterial für diese Arbeit.

Herrn Dr. Reiner Kiefersauer danke ich für die Einführung in das von ihm entwickelte „*Free Mounting System*“, ohne das die Strukturlösung von F3 nicht möglich gewesen wäre, und für die Bereitstellung von Bildmaterial zu diesem System.

Herrn Dr. Edwin L. Madison (Dendreon, San Diego) danke ich für die Bereitstellung von gereinigten DESC-1 für die Kristallisation.

Herrn PD. Dr. Uwe Jacob möchte ich für die Hilfe bei dem DESC-1-Projekt und bei der daraus resultierenden Publikation danken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kollegen Dr. Martin Augustin, Dr. Daniela Jozic, Dr. Mireia Comellas-Bigler, Dr. Iris Fritze, Dr. Klaus Maskos, Dr. Peter Sondermann, Dr. Rupert Lang, Dr. Werner Atzenhofer, Dr. David Reverter, Dr. Martha Garrido-Franco, Dr. Tim Clausen, Dr. Tobias Krojer, Dr. Irena Bonin, Dr. Marina Rubini, Dr. Stephan Ehlert, Dr. Hans-Georg Beisel, Dr. Jens Kaiser, Dr. Stefan Steinbacher Dr. Oliver Einstle, Rasso Willkomm, Marianne Braun, Christine Krapf, Martin Locher und Charlotte Ungewickel für die freundschaftliche Atmosphäre und für ihre ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Den Herren Arne Ramsperger, Dr. Dirk Barth und Dr. Andreas Eichinger danke ich für ihre Freundschaft und die vielen dienstlichen und außerdienstlichen Unternehmungen, die sehr zum seelischen Wohlergehen in den letzten fünf Jahren beigetragen haben.

Großen Dank verdienen darüber hinaus unsere Sekretärinnen Renate Rüller, Monika Schneider und Gina Beckmann für die Hilfe bei der Überwindung von unzähligen bürokratischen Hürden. Außerdem möchte ich mich bei den Herren Werner Dersch und Ottmar Paul für die Aufrechterhaltung der Funktion vieler Geräte und die Hilfe bei technischen Sonderwünschen sowohl im dienstlichen als auch privaten Bereich bedanken. Bei Frau Marion Heinze möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir die unangenehme Aufgabe der Reinigung jeglicher Laborgeräte abgenommen hat.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. Gleb Bourenkov und Dr. Hans Bartunik vom DESY und Clemens Schulze-Briese vom SLS für die freundliche Betreuung bei der Datenaufnahme zum F3-Projekt.

Abschließend möchte ich mich herzlichst bei meinen Eltern für die finanzielle und mentale Unterstützung in den letzten fünf Jahren bedanken und dafür, dass sie mich immer in meinen Plänen unterstützt haben und mir mit ihren unerschütterlichen Vertrauen in meine Fähigkeiten über manche Zweifel hinweg geholfen haben.

Vielen herzlichsten Dank !!

Teile dieser Arbeit sind bzw. werden publiziert in:

Kyrieleis, O.J.P., Goettig, P., Kiefersauer R., Huber R. and Brandstetter H. (2005). Crystal Structure of the tricorn interacting factor F3 from *Thermoplasma acidophilum*, a zinc aminopeptidase in three different conformations. *JMB*. (akzeptiert).

Kyrieleis, O.J.P., Huber R., Madison E.L., and Jacob U. (2005). Crystal structure of the catalytic domain of DESC-1, a new member of the type II trans-membrane serine proteinase family. (in Vorbereitung).