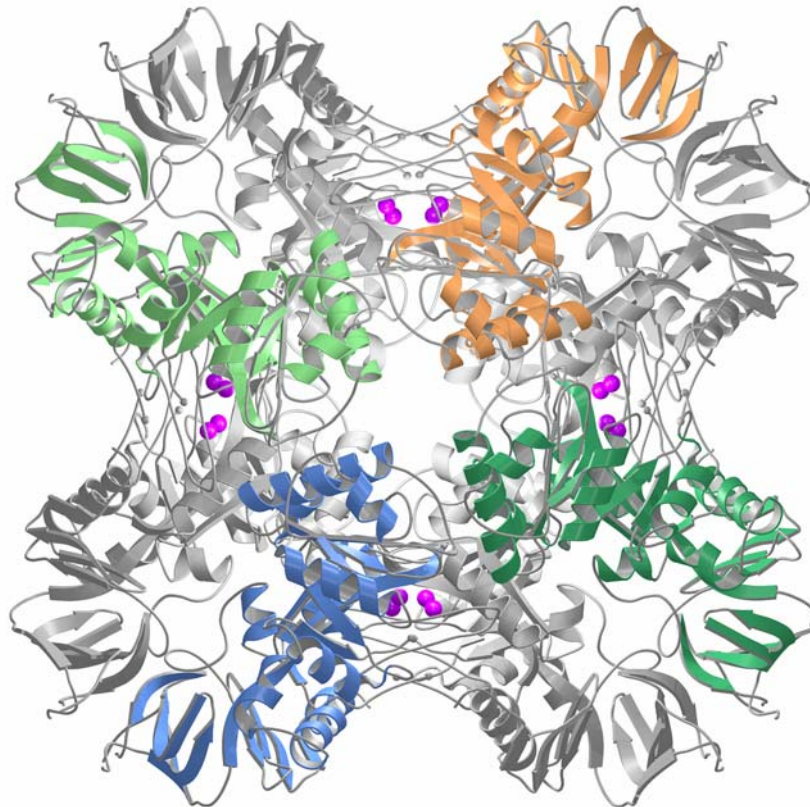


**Biochemische und röntgenkristallographische Untersuchungen der
Dipeptidasen Peptidase V und Isoaspartyl Dipeptidase**

Röntgenstrukturanalyse der Matrixmetalloprotease Kollagenase-1



Daniela Jozic
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung
D-82152 Martinsried

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

**Biochemische und röntgenkristallographische
Untersuchungen der Dipeptidasen PeptidaseV
und Isoaspartyl Dipeptidase**

**Röntgenstrukturanalyse
der Matrixmetalloprotease Kollagenase-1**

Daniela Jozic

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. Wolfgang Hiller

Die Dissertation wurde am 18.09.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 03.11.2003 angenommen.

Für Stephan

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2000 bis Juli 2003 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Robert Huber in der Abteilung Strukturforschung des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Huber für die wohlwollende Unterstützung und Förderung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Durch wertvolle Anregungen, sein stetes Interesse an meiner Arbeit und sein Vertrauen in mich war er ein beständiger Rückhalt.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfram Bode möchte ich mich für die Überlassung der interessanten Themen bedanken sowie für stimulierende Diskussionen, großzügige Unterstützung und viele wertvolle Anregungen.

Bei Herrn Dr. Klaus Maskos möchte ich mich herzlich bedanken. Durch seine fachliche Kompetenz, die Weitergabe nützlicher Ratschläge hat er mich immer bereitwillig bei Fragen und Problemen aller Art unterstützt.

Meinen Bürokollegen Dr. Matthias Bochtler, Dr. Reiner Kiefersauer, Dr. Klaus Maskos, Marianne Braun, Dr. Stefan Strobel, Stephan Henrich, Michael Koch und Dr. Martin Augustin danke ich für die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre. Ebenso möchte ich mich bei meinen Laborkollegen für die angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre bedanken. Auch allen weiteren Mitarbeitern der Abteilung danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Freunden und Kollegen Dr. Clemens Steegborn, Dr. Klaus Maskos, Charlotte Ungewickell, Dr. Manuel Than, Marianne Braun, Dr. Stefan Riedel, Stefanie Bauer, Susanne Stanitzek, Dr. Crystelle Mavoungou, Dr. David Reverter, Dr. Rupert Lang, Werner Atzenhofer, Dr. Martin Augustin, Christine Breitenlechner, Christine Krapf, Rasso Willkom, Irena Bonin, Otto Kyrieleis, Dr. Rainer Friedrich, Dr. Till Rehm, Dr. Dorota Ksiazek, Dr. Kerstin Wendt, Constanze Breithaupt, Tobias Krojer und Monika Schneider für viele angenehme Stunden und die schöne Zeit mit ihnen.

Ein „dickes“ Dankeschön an meine zwei Kolleginnen Mireia Comellas-Bigler „Möhre“ und Iris Fritze „Eule“, u.a. für die unzähligen Caipi-Abende.

Bei Frau Renate Rüller, Frau Monika Schneider, Frau Marion Heinze, Herrn Werner Dersch und Herrn Ottmar Paul bedanke ich mich sehr herzlich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die vielfältige Unterstützung bei Problemen mit Verwaltung, Organisation und Technik.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Ferdi, Hilla und Stephan für die fortwährende Unterstützung und den steten Rückhalt.

Abkürzungen

Å	Ångström, $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	asymmetrische Einheit
bp	Basenpaar
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BSA	Serumalbumin aus Rind
CCD	<i>charge coupled device</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
CIP	Phosphatase aus Kälbermagen
Da	Dalton
ddH ₂ O	<i>aqua bidestilata</i>
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	<i>Extra cellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ϵ	Extinktionskoeffizient
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonsäure
IadA	Isoaspartyl Dipeptidase
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
k_{diss}	Dissoziationskonstante
LB	Luria Bertani
M	Molar (mol/l)
MAD	<i>Multiple Anomalous Dispersion</i>
min	Minute
MIR	multipler isomorpher Ersatz
MR	<i>Molecular Replacement</i>
MMP-1	Matrixmetalloproteinase-1
<i>ncs</i>	<i>non crystallographic symmetry</i>
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda = x \text{ nm}$
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PepV	PeptidaseV
PEX	Hämopexin-ähnliche Domäne
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r.m.s.	Wurzel aus dem Mittelwert der quadrierten Werte
rpm	rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	RT
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SIR	<i>Single Isomorphous Replacement</i>
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase
Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1.1 ProMMP-1	1
1.2 PeptidaseV	2
1.3 Isoaspartyl Dipeptidase	3
2. Einleitung	5
2.1 Proteolytische Enzyme	5
2.2 Metalloproteasen	6
2.3 Matrixmetalloproteasen	7
2.3.1 Domänenaufbau der MMPs.....	9
2.3.2 Aktivierung und Regulation.....	12
2.3.3 ProMMP-1.....	14
2.4 Vergleich von Mono- und Dizinkpeptidasen	16
2.4.1 PeptidaseV.....	17
2.4.2 Isoaspartyl Dipeptidase.....	19
2.5 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	22
2.5.1 Überblick.....	22
2.5.2 Kristallisation.....	22
2.5.3 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen.....	23
2.5.4 Berechnung der Elektronendichte.....	24
2.5.5 Lösung des Phasenproblems.....	25
2.5.5.1 Isomorpher Ersatz.....	26
2.5.5.2 Multiple anomale Dispersion.....	27
2.5.5.3 Molekularer Ersatz.....	28
3. Methoden	29
3.1 Materialien	29
3.1.1 Chemikalien.....	29
3.1.2 Bakterien.....	29
3.1.3 Plasmide.....	30
3.1.4 Enzyme.....	30
3.1.5 Oligonukleotide.....	30
3.1.6 Geräte.....	30
3.1.7 Medien.....	31
3.2 Molekularbiologische Methoden	31
3.2.1 Sequenzanalysen, -vergleiche und Datenbanksuchen.....	31
3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten.....	32
3.2.4 DNA-Isolierung aus Gelen.....	33
3.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	33

3.2.6	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	33
3.2.7	Dephosphorylierung von DNA	33
3.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	33
3.2.9	Transformation von <i>E. coli</i>	34
3.2.9.1	<i>Transformation chemisch kompetenter Zellen</i>	34
3.2.9.2	<i>Elektroporation</i>	34
3.2.10	Präparation von Plasmid-DNA	34
3.2.11	DNA-Sequenzierung.....	34
3.3	<i>Mikrobiologische Methoden</i>	35
3.3.1	Bakterienkulturen.....	35
3.3.1.1	<i>Flüssigkulturen von Bakterien</i>	35
3.3.1.2	<i>Plattenkulturen von Bakterien</i>	35
3.3.1.3	<i>Glycerinkulturen</i>	36
3.4	<i>Heterologe Expression von rekombinantem Protein in E. coli</i>	36
3.4.1	Expression der PeptidaseV	36
3.4.2	Expression der Isoaspartyl Dipeptidase	36
3.4.3	Aufschluß von <i>E. coli</i> Zellen	37
3.5	<i>Proteinchemische Methoden</i>	37
3.5.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	37
3.5.1.1	<i>Colorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford</i>	37
3.5.1.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration anhand des Absorptionskoeffizienten</i>	37
3.5.2	Proteinfällung.....	38
3.5.3	Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen	38
3.5.4	Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
3.5.5	Western-Blot und Detektion der Proteine auf der Membran	40
3.5.6	N-terminale Sequenzierung nach Edman	41
3.5.7	Dynamische Lichtstreuungsexperimente (<i>Dynamic Light Scattering, DLS</i>).....	41
3.5.8	Proteinpräparation.....	41
3.5.8.1	<i>Proteinreinigung der PeptidaseV</i>	41
3.5.8.2	<i>Proteinreinigung der Isoaspartyl Dipeptidase</i>	42
3.6	<i>Kristallographische Methoden</i>	43
3.6.1	Kristallisation	43
3.6.2	Montieren der Kristalle	43
3.6.3	Datensammlung und –reduktion	44
3.6.4	Phasierung	44
3.6.5	Modellbau und Verfeinerung	45
3.6.6	Modellanalyse und graphische Darstellung	45
4.	Ergebnisse	47
4.1	<i>Kristallstruktur der ProMMP-1</i>	47
4.1.1	Kristallisation der ProMMP-1	47
4.1.2	Molekulargewichtsbestimmung der ProMMP-1.....	47
4.1.3	Datenaufnahme	48
4.1.4	Phasenbestimmung, Modellbau und Strukturverfeinerung	49
4.1.5	Strukturbeschreibung der ProMMP-1	51
4.1.5.1	<i>Struktureller Vergleich von humaner ProMMP-1 und Schweine-MMP-1</i>	60

4.1.5.2	<i>Interaktion zwischen Prodomäne und Hämoexin-ähnlicher Domäne von ProMMP-1</i>	61
4.1.5.3	<i>Dimerisierung der ProMMP-1</i>	61
4.2	<i>Kristallstruktur der PeptidaseV</i>	65
4.2.1	Expression und Reinigung der PeptidaseV.....	65
4.2.2	Kristallisation der PeptidaseV.....	65
4.2.3	Strukturlösung	66
4.2.4	Strukturbeschreibung der PeptidaseV.....	70
4.2.4.1	<i>Das Aktivzentrum der PeptidaseV</i>	75
4.2.4.2	<i>Mögliche Substratbindung</i>	79
4.3	<i>Kristallstruktur der Isoaspartyl Dipeptidase</i>	80
4.3.1	Klonierung, Expression und Reinigung der Isoaspartyl Dipeptidase	80
4.3.2	Kristallisation der Isoaspartyl Dipeptidase	80
4.3.3	Aufklärung der Raumstruktur der Isoaspartyl Dipeptidase.....	81
4.3.4	Modellbau und Verfeinerung	83
4.3.5	Strukturbeschreibung der Isoaspartyl Dipeptidase	86
4.3.6	Aktives Zentrum des nativen Enzyms	90
4.3.7	Zinkumgebung bei der Inhibitorbindung	91
4.3.8	Strukturelle Homologie mit anderen Enzymen.....	94
5.	Diskussion	97
5.1	<i>ProMMP-1</i>	97
5.1.1	Modell für die Erkennung und Prozessierung von tripelhelikalem Kollagen	100
5.1.2	Modell der α 2-Integrin/MMP-1 Interaktion.....	103
5.2	<i>PeptidaseV</i>	104
5.3	<i>Isoaspartyl Dipeptidase</i>	108
6.	Literaturverzeichnis	112

1. Zusammenfassung

1.1 ProMMP-1

Innerhalb der Matrixmetalloproteasen gibt es drei klassische Kollagenasen, die hauptsächlich für den Abbau von fibrillärem Kollagen verantwortlich sind. Dabei wird interessanterweise das Kollagen nur an einer Stelle gespalten, was zu einer $\frac{3}{4}$ - $\frac{1}{4}$ Aufteilung führt. Die Spaltprodukte können dann von Proteasen weiter zerlegt werden. Somit sind die Kollagenasen in vielerlei physiologische wie auch pathologische Prozesse involviert.

Die hier beschriebene Struktur entspricht dem vollständigen humanen Proenzym von MMP-1 (Kollagenase-1). Neben ProMMP-2 ist sie somit erst die zweite Struktur einer vollständigen Matrixmetalloprotease. Das Proenzym besteht aus drei deutlich unterscheidbaren Regionen, einer Prodomäne, die sich aus einem Cluster von drei α -Helices zusammensetzt, einer katalytischen Domäne mit zentralem β -Faltblatt sowie einer Hämopexin-ähnlichen Domäne (PEX-Domäne), die an einen vierblättrigen Propeller erinnert. Die katalytische Domäne ist über ein 16 Aminosäuren langes Peptid mit der PEX-Domäne verbunden. Das Linkerpeptid liegt in fast gestreckter Konformation vor und besitzt eine hohe Anzahl von Prolinen. Die Elektronendichte zeigt, daß dieser Bereich sehr flexibel ist und zudem keine Sekundärstrukturen aufweist. Eine Vielzahl von vorangegangenen Untersuchungen legt nahe, daß für die effektive Prozessierung von Kollagen wahrscheinlich ein kompliziertes Zusammenspiel aus katalytischer Domäne, Linkerpeptid und PEX-Domäne notwendig ist.

Dies ist das erste Mal, daß auch eine Interaktion zwischen einer Prodomäne und der Hämopexin-ähnlichen Domäne beobachtet wurde. Der Kontakt ist hauptsächlich hydrophober Natur und stabilisiert eine etwas kompaktere Anordnung der Domäne als zuvor bei aktiver Schweine-MMP-1 beobachtet wurde. Diese Interaktion stabilisiert und schützt möglicherweise einen Teil der Prodomäne vor Prozessierung und hat somit Einfluß auf das Aktivierungsgeschehen.

In der hier vorliegenden Struktur kann ein kristallographisches Dimer beobachten werden, das durch Gelfiltrationsstudien auch *in vitro* bestätigt werden konnte. Die Dimerisierung wird durch die PEX-Domäne vermittelt, hauptsächlich durch das Propellerblatt IV. Größere Verschiebungen der Propellerblätter III und IV gehen im Zuge der Dimerisierung einher, das Resultat ist ein Homodimer, das bereits bei MMP-9 beobachtet wurde. Ein Modell des PEX1/PEX9 Heterodimers gibt Aufschluß über eine mögliche Interaktion zwischen beiden Domänen, die schon *in vivo* beobachtet wurde.

Da die Hämopexin-ähnliche Domäne von MMP-1 zusammen mit dem Linkerpeptid die Interaktion mit $\alpha 2$ -Integrin ermöglicht, wurden Modelling Experimente mit den bekannten $\alpha 2$ -Integrin-Strukturen durchgeführt. Eine Eingrenzung der möglichen Bindungsvarianten auf den biochemisch beschriebenen ternären Komplex mit $\alpha 2$ -Integrin und Kollagen lieferte ein Modell, bei dem wiederum der exponierte Strang von Propellerblatt IV eine entscheidende Position einnimmt. Zudem kommt die Disulfidbrücke, die an der Grenze zwischen Linker und PEX-Domäne liegt, dem Kollagen sehr nahe, so daß sowohl die letzte Aminosäure des Linkers als auch die C-terminale Aminosäure eine Rolle bei dieser Interaktion spielen könnten.

Eine offene Frage ist und bleibt der Mechanismus, durch den Kollagen gebunden, aufgewunden und gespalten wird. Da sich die Domänenanordnung von humaner ProMMP-1 zu Schweine-MMP-1 nur geringfügig unterscheidet, liegt der Verdacht nahe, daß sich eine minimale Änderung der relativen Orientierung der Domänen zueinander vollzieht, wahrscheinlich nur so viel, um die Tripelhelix ein wenig zu knicken. Das weitere Auseinanderwinden könnte dann durch hydrophobe Interaktion zwischen der hydrophoben Region in der Tripelhelix und der Region an der Domänengrenze bewerkstelligt werden.

1.2 PeptidaseV

Milchsäurebakterien sind Organismen, die u.a. in der Lage sind, das Milchprotein Casein abzubauen. Sie haben ein komplexes proteolytisches System entwickelt, um Casein zu kleinen Peptiden bzw. Aminosäuren zu degradieren. Heutzutage werden sie als Starterkulturen für die Milchfermentation eingesetzt und sind von großer ökonomischer Bedeutung für die Lebensmittelindustrie.

PeptidaseV (PepV) aus *Lactobacillus delbrueckii* ist eine binukleare Zinkpeptidase, die früher als eine unspezifische Aminodipeptidase charakterisiert wurde. Das Protein konnte mit einem Mimetikum des tetraedrischen Übergangszustands des Substratdipeptids Asp-Ala (Asp ψ [PO₂CH₂]AlaOH) kristallisiert werden. Es umfaßt zwei Domänen, eine katalytische und eine sogenannte Deckeldomäne, die mit ihren Grenzflächen eine interne Kavität bilden, die den Phosphat-inhibitor beinhaltet. Die katalytische Domäne ähnelt mit ihrem Faltungsmotiv den katalytischen Domänen verschiedener Amino- bzw. Carboxypeptidasen, während die Deckeldomäne unter den verwandten Strukturen einzigartig ist.

PepV scheint eine unspezifische Dipeptidase zu sein, da sie nur das Peptidrückgrat erkennt und fixiert und eine eindeutige Präferenz für bestimmte Seitenketten nicht ersichtlich ist. Der

Inhibitor-Komplex verdeutlicht zudem die Rollen der zwei Zinkionen, nämlich die Stabilisierung des tetraedrischen, geladenen Übergangszustands sowie die Aktivierung des katalytisch essentiellen Wassermoleküls.

Die Vielfalt an biochemischen Reaktionen, die innerhalb der Aminoacylase-1 Familie ausgeführt werden, unterstützt die Feststellung, daß es im wesentlichen die Beschaffenheit der Substratbindungstasche ist, die die Spezifität der Reaktion bestimmt.

Die Kristallstruktur von PepV im Komplex mit einem Phosphinatinhibitor ermöglicht somit definierte Mutationsstudien, durch die die genaue Substratspezifität analysiert bzw. gezielt verändert werden kann. Folglich hat diese Struktur sowohl im biotechnologischen Bereich als auch in der Grundlagenforschung eine Bedeutung.

Der Abbau von Carnosin durch bakterielle Dipeptidasen vergleichbar zu PepV, könnte sogar einen pathologischen Einfluß während bakterieller Infektionen besitzen. Diese Hypothese basiert auf Beobachtungen, daß Carnosin die Konzentration von freiem Zink im Gewebe reguliert und auf diese Weise zinkabhängige Schädigungen speziell im Gehirn verhindert.

1.3 Isoaspartyl Dipeptidase

Durch spontane Deamidierung, Isomerisierung und Racemisierung können L-Aspartyl- und L-Asparaginyln-Reste in Proteinen zu β -verknüpften Aspartaten umgewandelt werden. Um eine Ansammlung von Isoaspartyl-Dipeptiden, die während der Proteindegradation entstehen, zu vermeiden, haben einige Bakterien spezialisierte Isoaspartyl/ β -Aspartyl Zinkpeptidasen entwickelt, die in begrenztem Rahmen auch α -Aspartyl-Dipeptide abbauen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isoaspartyl Dipeptidase (IadA) aus *E. coli* kloniert, exprimiert und kristallisiert. Es ist gelungen, das Enzym in An- und Abwesenheit des Übergangszustandanalogs Asp ψ [PO₂CH₂]LeuOH zu kristallisieren. Die Kristallstruktur von IadA wurde mit multipler anomaler Dispersion gelöst und bei 2,0 Å Auflösung verfeinert. Das Protein umfaßt zwei Domänen und besitzt eine multimeren Form. Die Struktur zeigt ein Oktamer mit 422 Punktsymmetrie. Das Monomer der IadA bildet ein (α/β)₈-barrel, das den katalytischen Domänen von TIM-barrel Enzymen ähnlich ist sowie eine seitlich angrenzende Domäne, die die Form eines U-förmigen β -sandwichs besitzt. An den C-terminalen Enden der β -Stränge des barrels befinden sich zwei Zinkionen, die durch vier Histidine, ein carbamoyliertes Lysin und ein Aspartat gebunden werden. Das Aspartat übernimmt zusätzlich die Rolle des *proton-shuttles*. Ein sehr langer *hairpin-loop*, der aus dem barrel herausragt, ist in der freien Struktur ungeordnet, in der inhibierten Struktur jedoch geordnet, was auf einen

Zugangskontrollmechanismus schließen läßt. Zudem wird der Übergangszustand durch Interaktionen mit Ser289 des *hairpin-loops* stabilisiert.

Die IadA zeigt eine starke Ähnlichkeit zu den α -Untereinheiten der Binickel-Ureasen, zu binuklearen Zink-Dihydroorotasen, zu Hydantoinasen und Phosphotriesterasen sowie zu den mononuklearen Adenosin- und Cytosindeaminasen. Diese katalysieren die hydrolytische Spaltung von Kohlenstoff- bzw. Phosphatzentren.

Die Natur hat also scheinbar das Faltungsmotiv und den Hydrolaseapparat von binuklearen Amidohydrolasen adaptiert, um diese Dipeptidase hervorzubringen, was somit einer divergenten Evolution entspricht.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Daniela Jozic, Gleb Bourenkov, Hans Bartunik, Henning Scholze, Vincent Dive, Bernhard Henrich, Robert Huber, Wolfram Bode, Klaus Maskos (2002) Crystal Structure of the dinuclear zinc aminopeptidase PepV from *Lactobacillus delbrueckii* unravels its preference for dipeptides. *Structure* **10**, 1097-1106.

Daniela Jozic, Jens T. Kaiser, Robert Huber, Wolfram Bode, Klaus Maskos (2003) X-ray structure of isoaspartyl dipeptidase from *E. coli*: A dinuclear zinc peptidase evolved from amidohydrolases. *Journal of Molecular Biology*, **332**, 243-256.

Daniela Jozic, Gleb Bourenkov, Ngee Lim, Hideaki Nagase, Wolfram Bode, Klaus Maskos (2003) X-ray structure of human proMMP-1: New insights into collagenase action. Manuskript in Vorbereitung.

2. Einleitung

2.1 *Proteolytische Enzyme*

Enzyme, die Amidbindungen in Peptiden oder Proteinen hydrolysieren können, werden im allgemeinen als Peptidasen oder Proteasen bezeichnet. Sie gehören zu der am längsten bekannten Klasse von Enzymen und stellen zudem einen außerordentlich wichtigen Teil im biologischen System dar.

Proteasen können anhand ihrer reaktiven Gruppe im Aktivzentrum wie folgt eingeteilt werden:

1. Metalloproteasen
2. Serinproteasen
3. Cysteinproteasen
4. Aspartatproteasen
5. N-terminale nukleophile Proteasen

Je nach Angriffspunkt innerhalb der Peptidkette des Substrats unterscheidet man zwischen Endopeptidasen (diese spalten innerhalb der Peptidkette, wie z.B. Pepsin) und Exopeptidasen (diese spalten Aminosäuren vom N- oder C-Terminus ab (Amino- oder Carboxypeptidasen)). Die meisten Proteasen zeichnen sich durch ihre ausgeprägte Substratspezifität aus.

Neben unspezifischen Aufgaben wie dem Abbau von defekten oder unerwünschten Proteinen, weiß man inzwischen, daß Proteasen eine wichtige Rolle als Regulationsmaschinerie übernehmen, z.B. in der Differenzierung und Zell-Homöostase. Wichtige Vertreter sind hier die Caspasen, die eine entscheidende Aufgabe in der Initiation und Ausführung des programmierten Zelltods (Apoptose) spielen und auf diese Art und Weise eine enorme Bedeutung bei Krankheiten wie Multiple Sklerose (MS) und Krebs haben, um nur wenige Beispiele zu nennen.

Darüber hinaus übernehmen sie auch eine wichtige Funktion in der Hämostase. Fast alle an der Blutgerinnung und Fibrinolyse beteiligten Enzyme sind trypsinartige Serinproteasen. Sie besitzen eine hohe Spezifität und müssen präzise reguliert werden. Sowohl eine Unter- als auch Überfunktion führt zu erheblichen Erkrankungen des Organismus.

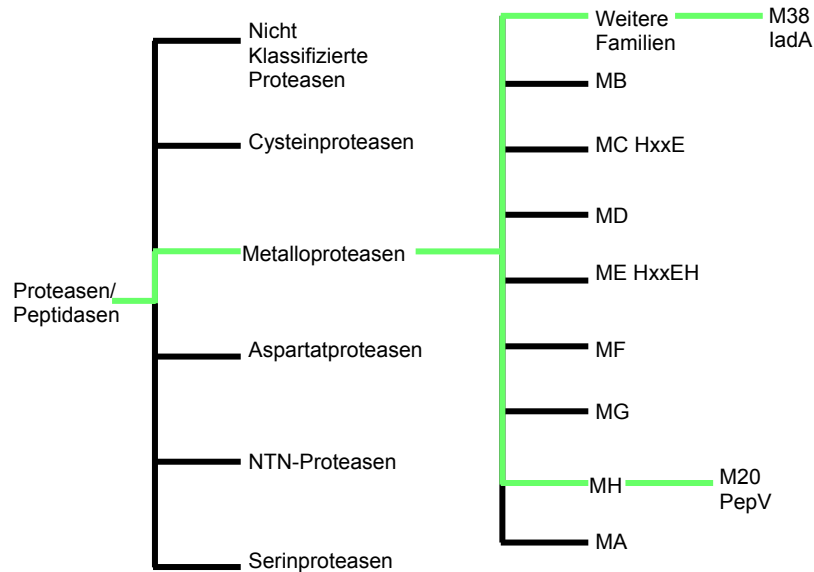


Abbildung 2-1: Übersicht über die verschiedenen Proteaseklassen.

2.2 Metalloproteasen

Metalloproteasen enthalten bis auf wenige Ausnahmen ein Zink als Metall im Aktivzentrum. Ein Grund hierfür sind die zahlreichen Bindungsmöglichkeiten dieses Metalls, welches bis zu sechs Bindungspartner in unterschiedlichen Geometrien akzeptieren kann. Weiterhin besitzt Zink eine vollbesetzte d-Schale und ist somit keiner Oxidations- bzw. Reduktionsreaktion ausgesetzt, wie z.B. die benachbarten Metalle Kupfer oder Eisen.

Zinkliganden sind in den meisten Fällen Histidine, Glutamate und Aspartate sowie Cysteine in Proenzymen, bei denen sie zur Stabilisierung der inaktiven Form beitragen. Eine Einteilung der Metalloproteasen erfolgt nicht nur durch die Art wie das aktive Metall komplexiert wird, sondern auch durch die Zahl der beteiligten Ionen (1 Ion = katalytisch; 2 Ionen = kokatalytisch). Sowohl die Geometrie der zinkbindenden Reste, als auch ihre eingeschränkte Mobilität, scheinen die Grundlage für eine starke Bindung des Ions im aktiven Zentrum zu sein ($K_{\text{diss}} \sim 10^{-12} \text{ M}$) (Auld, 1997).

Ein weiterer Ligand eines Zinkions ist ein Wassermolekül, das eine zentrale Rolle bei der hydrolytischen Spaltung eines (Poly-) Peptids spielt. Das Wassermolekül wird dabei vom sogenannten aktiven Zink und einem benachbarten Rest, der in der Regel ein Glutamat oder ein Aspartat ist, ausgerichtet und polarisiert. Befindet sich das Peptid in einer geeigneten Konformation im aktiven Zentrum, kann das polarisierte Wassermolekül den Carbonylkohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung nukleophil angreifen und über einige Zwischenschritte zur Hydrolyse des Peptids führen (Abbildung 2-2).

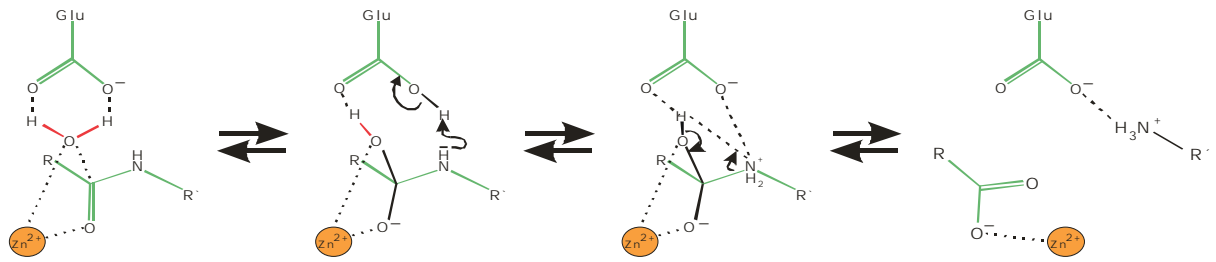


Abbildung 2-2: Reaktionsmechanismus der hydrolytischen Spaltung einer Amidbindung (eines Peptids oder Proteins) durch Metalloproteasen.

2.3 Matrixmetalloproteasen

Die Zinkine werden weiter unterteilt. Die Eingruppierung erfolgt nach der Art der Liganden.

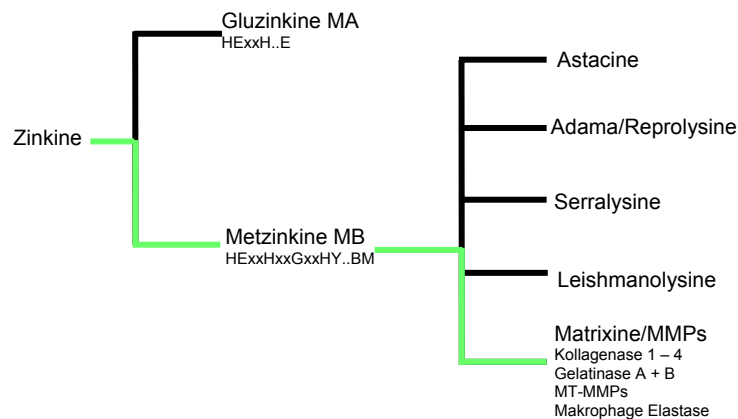


Abbildung 2-3: Übersicht über die weitere Untergliederung der Zinkine.

Die Gluzinkine weisen ein konserviertes HExxH-Motiv auf, welches sich in der Helix des aktiven Zentrums befindet. In der Überfamilie der Metzinkine wird das Zink von drei Histidinen koordiniert. Die erweiterte Konsensussequenz dieser Überfamilie lautet: HExxHxxGxxHY...BM (Abbildung 2-3).

Anhand weiterer Unterscheidungsmerkmale können Metzinkine in fünf Familien unterteilt werden, die Leishmanolysine, die Astacine, die Serralysine, die Adamalysine und die Matrixine (MMPs).

Jedes dieser Enzyme entwickelt seine proteolytische Aktivität als sekretiertes Protein außerhalb der lebenden Zelle. Es handelt sich bei vielen um Endopeptidasen, von denen insbesondere die MMPs am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind.

Die Matrixmetalloproteasen (MMPs) sind eine Familie von mehr als 25 Zink-abhängigen proteolytischen Enzymen und können in mehrere Kategorien eingeteilt werden, wie z.B.

Gelatinasen, Stromelysine, Kollagenasen und membranassoziierte Matrixmetalloproteasen (Jiang & Bond, 1992; Rawlings & Barrett, 1993; Stöcker et al., 1993; Vallee & Auld, 1993).

Die Kristallstrukturen von Astacin und Adamalysin II können als Prototypen ihrer Familie betrachtet werden (Bode et al., 1992; Gomis-Rüth et al., 1993a; Gomis-Rüth et al., 1993b; Stöcker et al., 1993; Gomis-Rüth et al., 1994a). 1993 wurden die MMPs aufgrund der herausragenden Ähnlichkeiten in ihren Topologien in die Überfamilie der Metzinkine zusammengefaßt (Bode et al., 1993). Neben der oben genannten Konsensussequenz in der Zinkbindungsregion, teilen all diese Proteine auch eine strikt konservierte, Methionin enthaltende 1,4- β -Schleife (*met-turn*) (Bode et al., 1993).

Heutzutage ist bekannt, daß die MMPs sowohl in eine Reihe von physiologischen wie auch pathologischen Vorgängen involviert sind (Sternlicht & Werb, 2001). MMPs bauen alle Komponenten der Extrazellulärmatrix (ECM) ab, die aus verschiedenen Proteinen wie den Kollagenen, Glycoproteinen, Proteoglycanen und Glycosaminoglycanen aufgebaut ist (Mignatti & Rifkin, 1993). Dadurch spielen sie eine entscheidende Rolle bei invasiven Prozessen, die im menschlichen Körper stattfinden. Die Fähigkeit von Zellen, anatomische Grenzen wie Basalmembranen, interstitielles Stroma und interzelluläre Verbindungen, die die verschiedenen Gewebsteile verbinden, zu überschreiten, wird als Invasivität bezeichnet (Parsons et al., 1997; Curran & Murray, 1999; Koblinski et al., 2000). Solche Prozesse finden sowohl im Embryo- als auch im Erwachsenenstadium statt, z.B. bei der Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese), sie können aber auch unter pathologischen Bedingungen stattfinden, wie z.B. bei rheumatoider Arthritis und Tumorentwicklung (Basset et al., 1997; Stetler-Stevenson, 1999; McCawley & Matrisian, 2000; Nelson et al., 2000).

Während des Tumorwachstums, bei dem maligne Zellen auf normales benachbartes Gewebe übergreifen, wird der Tumor selbst von normalen vasculären Zellen, Endothelzellen angrenzender Kapillargefäße, angegriffen. Auf diese Weise bildet sich aber das vasculäre Netzwerk des Tumors. Durch die neugebildete Gefäßwand finden zwei Prozesse statt. Auf der einen Seite können Immunzellen aus den Gefäßen ins Neoplasma infiltrieren, auf der anderen Seite können aber auch Tumorzellen in das Kapillarlumen (Intravasion) und in den Blutkreislauf einwandern. Einige dieser malignen Zellen verweilen in Kapillareinbettungen entfernt vom Primärtumor. Hier können sie durch die Gefäßwand in das umgebende Gewebe eindringen (Extravasion) und Metastasen bilden. Invasive Prozesse sind üblicherweise mit dem Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) verbunden.

Neben Tumorinvasionen, Metastasenbildung, rheumatoider Arthritis (RA) und Osteoarthritis (OA) (Werb, 1989; Harris, 1990) spielen MMPs auch bei Hornhautgeschwüren (Gelatinase und Stromelysin (Burns et al., 1989)), Lungenemphysemen (Wahl et al., 1990), Multipler Sklerose (Gijbels et al., 1992) und Periodontitis scheinbar eine wichtige Rolle.

Als einheitliche Nomenklatur wird die Abkürzung MMP in Kombination mit einer simplen Durchnummerierung verwendet (Okada et al., 1986).

2.3.1 Domänenaufbau der MMPs

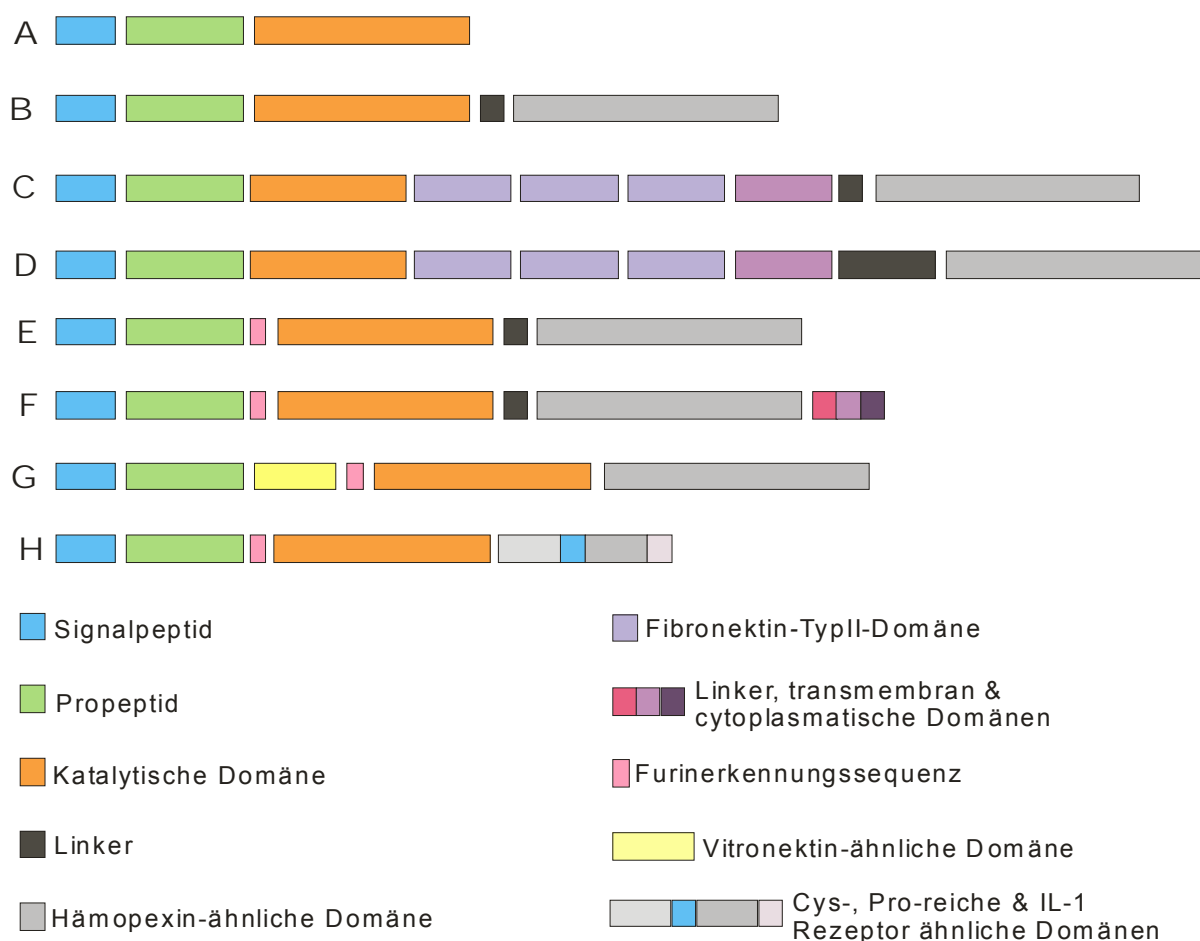


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der Domänenzusammensetzung der MMP-Familie.

Alle MMPs besitzen eine regulatorische Domäne (Prodomäne) mit einem stark konservierten Motiv von acht Aminosäuren (PRCGVPDV), welches für die Latenz verantwortlich ist, indem es mit einem Cystein an das aktive Zink bindet (Birkedal-Hansen et al., 1993). Somit kann das für die katalytische Aktivität essentielle Wasser aus sterischen Gründen nicht in die richtige Position gelangen. Weiterhin besetzt das acht Aminosäuren lange Propeptid das aktive Zentrum in umgekehrter Orientierung wie das Substrat, was zu einer Blockade der

Substratbindungsstelle führt. Auf die Prodomäne folgt die katalytische Domäne, die alle zinkbindenden und katalytischen Reste enthält. In die katalytische Domäne ist im Falle der Gelatinasen noch eine Fibronectin-TypII-Domäne in dreifacher Ausführung eingefügt (Elkins et al., 2002). Fast alle Mitglieder der MMP-Familie verfügen über eine Hämapexin-ähnliche Domäne, die Sequenzhomologien zu Hämapexin (Faber et al., 1995) und zu Vitronectin (Knäuper et al., 1993) aufweist. Sie besteht aus ca. 200 Aminosäuren, besitzt eine vierfache interne Sequenzwiederholung von jeweils 45 Aminosäuren und hat die Form eines vierblättrigen Propellers. Jedes Propellerblatt besteht aus vier antiparallelen β -Strängen und einer α -Helix (Gomis-Rüth et al., 1996).

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

Tabelle 2-1: Mitglieder der MMP-Familie und deren Domänenzusammensetzung.

Die Hämapexin-ähnliche Domäne übernimmt eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung mit den jeweiligen Substraten. Wenn diese Domäne entfernt wird, ist das Enzym zwar aktiv, jedoch ist die Substratspezifität in den meisten Fällen stark verändert (Sanchez-Lopez et al., 1993; Murphy & Knäuper, 1997). Eine weitere Funktion dieser Domäne ist die Beteiligung an der Bindung der spezifischen Inhibitoren der MMPs, der TIMPs.

Entscheidend für die Aktivität vieler MMPs ist auch das verbindende Linkerpeptid zwischen der katalytischen und der Hämapexin-ähnlichen Domäne. Die genaue Aufgabe ist jedoch weiterhin unklar, bemerkenswert ist der hohe Anteil an Prolinen in dieser Domäne, die ansonsten eine hohe Variabilität sowohl in der Aminosäurezusammensetzung als auch in der Länge aufweist.

Bis heute umfaßt die MMP-Familie 26 humane MMPs (Ohuchi et al., 1997; Parsons et al., 1997; Curran & Murray, 1999; Nagase & Woessner, 1999; Pei, 1999; Valasco et al., 2000). Die Mitglieder dieser Familie werden aufgrund ihrer funktionellen und strukturellen Eigenschaften in weitere Untergruppen eingeteilt:

1. Minimal-MMPs: Zu dieser Untergruppe zählen MMP-7 und MMP-26. Sie zeichnen sich durch das Fehlen der Hämapexin-ähnlichen Domäne aus und besitzen lediglich die katalytische Domäne im aktiven Zustand.
2. Die Kollagenasen-1 bis -3 besitzen die Fähigkeit, in Zusammenarbeit mit ihrer Hämapexin-ähnlichen Domäne interstitielles Kollagen des Typs I, II und III abzubauen.
3. Gelatinase A und B besitzen eine 170 Reste lange Insertion (Fibronektin-TypII) in der katalytischen Domäne.
4. Stromelysin-1, -2 und -3
5. Membrangebundene MMPs (MT-MMPs) -1, -2, -3 und -5, die C-terminal der Hämapexin-ähnlichen Domäne eine Transmembran-Helix und eine cytosolische Domäne besitzen, bzw. im Falle von MT4-MMP und MT6-MMP mit einem GPI-Anker-Motiv versehen sind.
6. Eine Gruppe mit divergenten Eigenschaften, zu denen MMP-11, MMP-12, MMP-19, MMP-23 und MMP-28 zählen.

Bis heute sind elf Strukturen der katalytischen Domänen von MMPs bekannt.

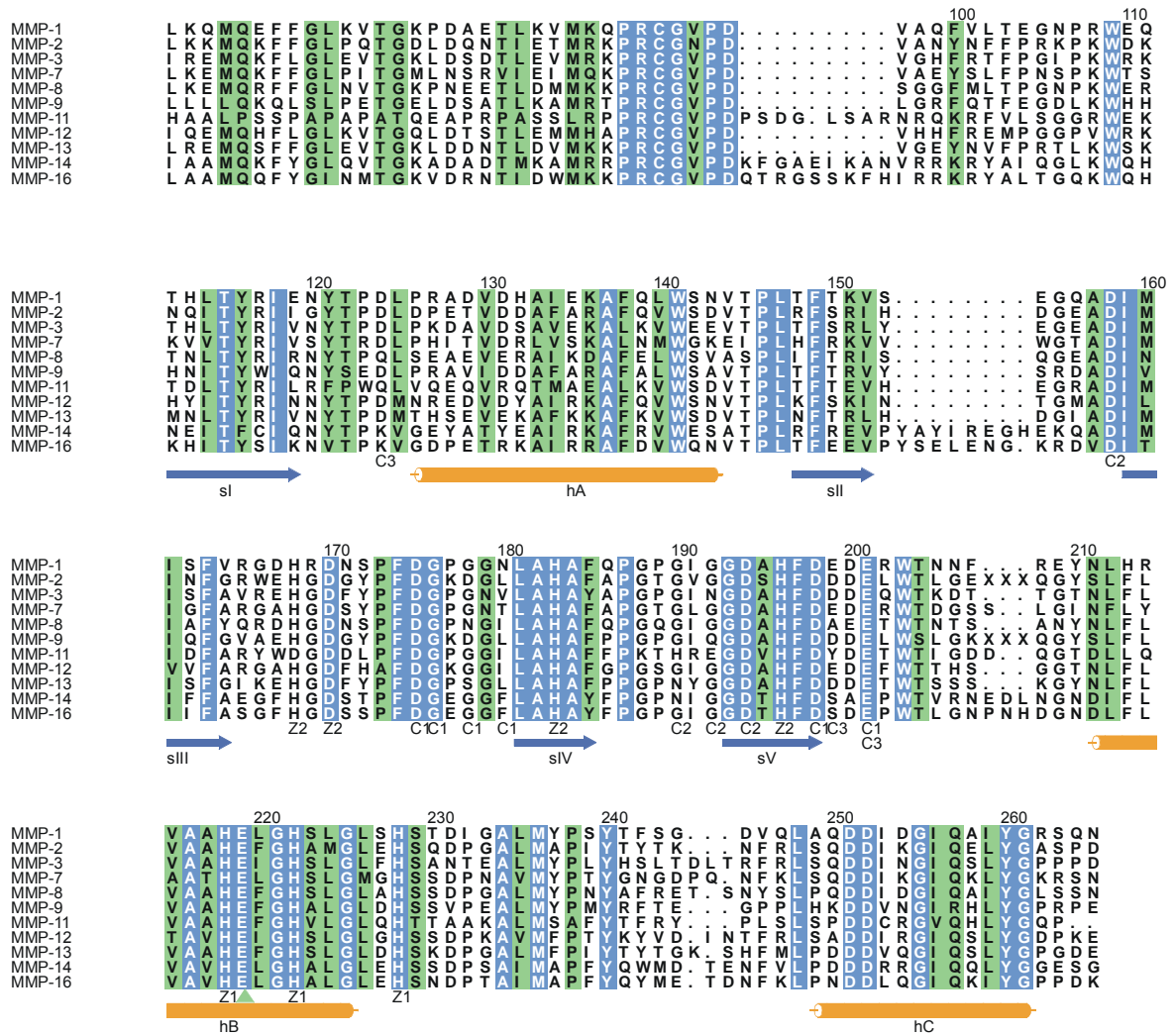


Abbildung 2-5: Strukturbasiertes Sequenzalignment der katalytischen Domänen ausgewählter MMPs. Die Pfeile (β -Stränge) und Zylinder (α -Helices) beschreiben die Sekundärstruktur von MMP-12. Reste, die an der Koordination des katalytischen (Z1) und strukturellen Zinks (Z2) sowie der Calciumionen (C1, C2 und C3) beteiligt sind, sind markiert.

2.3.2 Aktivierung und Regulation

Die Aktivierung des latenten Proenzym zu einer aktiven Form ist in der Familie der MMPs außerordentlich gut untersucht (Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990). Im latenten Enzym befindet sich das Propeptid in der *active-site cleft* und bindet mit einem einzeln stehenden konservierten Cystein an das Zink des aktiven Zentrums. Die exakte Regulation der MMPs ist aufgrund ihrer proteolytischen Eigenschaften besonders wichtig. Die Aktivierung erfolgt dann über den sogenannten *cystein-switch* Mechanismus, der in der folgenden Abbildung beschrieben wird.

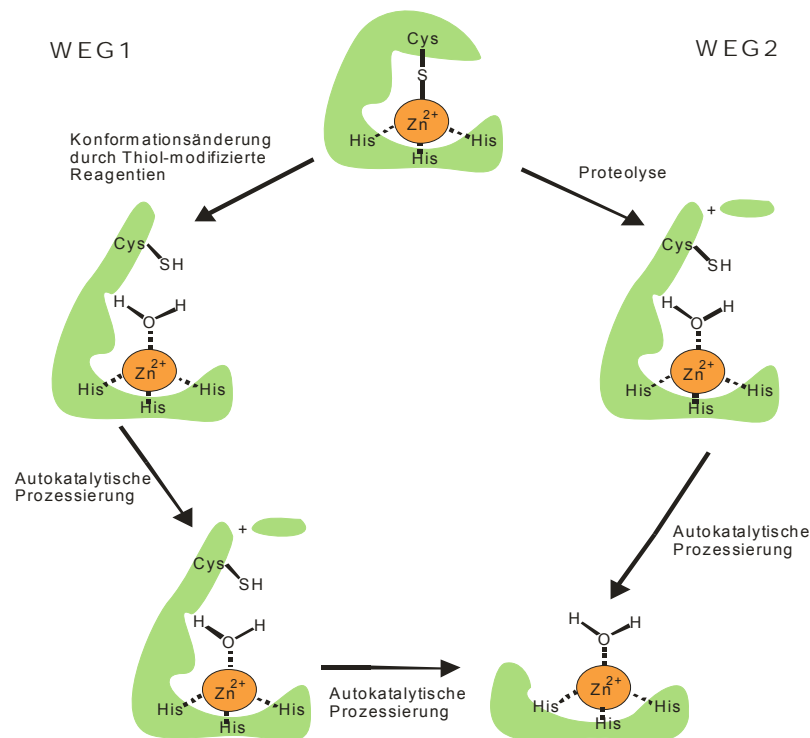


Abbildung 2-6: Allgemeines Schema zur Aktivierung von MMPs über den *cystein-switch* Mechanismus (Springman et al., 1990).

Eine weitere Erhöhung der Aktivität wurde bei den Kollagenasen MMP-1 und MMP-8 beobachtet (Murphy et al., 1977; Nagase et al., 1983; Hasty et al., 1986). Bei dieser Art der Aktivierung bildet der N-Terminus der katalytischen Domäne eine Salzbrücke zu einem strikt konservierten Aspartat der C-terminalen Helix (Superaktivierung) (Nagase, 1997). Die Salzbrücke kann nur dann gebildet werden, wenn der N-Terminus die richtige Länge besitzt. So ergibt sich z.B. eine ca. 3,5 fache Aktivität für die als Phe79-MMP-8 bezeichnete Variante im Vergleich zur Met80-MMP-8 Form (Knäuper et al., 1993).

Weitere Regulationen erfolgen auf:

1. transkriptionaler Ebene durch eine genau gesteuerte Produktion der als inaktive Zymogene sezernierten MMPs.
2. einem Gleichgewicht zwischen den aktiven Proteasen und ihren physiologischen Inhibitoren.

Diese Inhibitoren werden in zwei Klassen unterteilt:

1. Zur ersten Klasse gehören die TIMPs, welche die MMPs spezifisch hemmen. Derzeit sind vier verschiedene TIMPs bekannt (TIMP-1 bis -4) (Douglas et al., 1997;

Fernandez-Catalan et al., 1998). TIMP-1 und -2 werden in löslicher Form sezerniert, während TIMP-3 assoziiert an die extrazelluläre Matrix vorliegt.

2. Zur zweiten Klasse gehören die unspezifischen Inhibitoren, wie z.B. α 2-Makroglobulin. Diese spielen u.a. eine Rolle bei Entzündungsprozessen (Birkedal-Hansen et al., 1993; Cawston, 1996), wobei die vorwiegend im Serum vorkommenden unspezifischen Inhibitoren nur in begrenztem Maße vorhanden sind (Nagase, 1997).

Die sogenannten *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases* (TIMPs) stellen eine Familie von mittlerweile vier Proteinen dar, die je nach Glykosylierung ein Molekulargewicht von 20 bis 30 kDa aufweisen (Brew et al., 2000). Sie werden häufig von denselben Zelltypen exprimiert, die auch die MMPs hervorbringen (Overall, 1994). Heutzutage weiß man, daß sie neben ihrer Rolle als Inhibitoren der MMPs, mitogene bzw. Apoptose-induzierende Aktivität besitzen (Takigawa et al., 1990; Bertaux et al., 1991; Hayakawa et al., 1992; Moses, 1997).

Die Struktur der TIMPs besteht aus zwei Domänen mit ca. 125 Aminosäuren für die N-terminale und ca. 65 Aminosäuren für die C-terminale Domäne. Beide Domänen sind jeweils durch das Vorhandensein von drei Disulfidbrücken stabilisiert und besitzen verschiedene funktionelle Eigenschaften.

Die N-terminale Domäne komplexiert das aktive Zinkion mit der Carbonyl- und Aminogruppe von Cys1 und verhindert somit die Bindung des katalytisch erforderlichen Wassers. Darüber hinaus werden die Substratbindetaschen durch die folgenden drei Aminosäuren des N-Terminus und weitere Aminosäuren, die dem Disulfidbrückenbindungspartner von Cys1 vorangehen, blockiert. Der C-terminale Abschnitt der TIMPs geht gleichzeitig eine Bindung mit der Hämopexin-ähnlichen Domäne der MMPs ein, was die im nanomolaren Bereich liegende Dissoziationskonstante um mindestens eine weitere Größenordnung verkleinert (Kleine et al., 1993).

2.3.3 ProMMP-1

Matrixmetalloproteasen (MMPs) spielen eine wichtige Rolle in der Gewebsumgestaltung, welche mit verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen assoziiert ist, wie z.B. Morphogenese, Gewebsreparatur, Arthritis und Tumordinvasion (Stetler-Stevenson, 1999; McCawley & Matrisian, 2000; Itoh & Nagase, 2002).

Die MMPs können in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden, wie z.B. die Membran-assoziierten MMPs (MT-MMPs), Stromelysine, Gelatinasen und Kollagenasen. Die kleinsten

MMPs setzen sich aus einer Prodomäne sowie einer katalytischen Domäne zusammen. Ein Vertreter dieser Minimal-MMPs ist z.B. Matrilysin. Bei den meisten MMPs schließt sich an die katalytische Domäne noch eine C-terminale Hämopexin-ähnliche Domäne an, die durch ein Linkerpeptid von unterschiedlicher Länge (16 – 62 Aminosäuren) mit der katalytischen Domäne verbunden ist. Die Kooperation zwischen Linkerpeptid, Hämopexin-ähnlicher Domäne (PEX-Domäne) und katalytischer Domäne ist für den Abbau von fibrillärem, tripelhelikalem Kollagen notwendig (Murphy et al., 1992; Knäuper et al., 1997; Chung et al., 2000). Diese Domänenanordnung wird bei den Gelatinasen durch eine Insertion von drei Fibronektin-TypII-Domänen in die katalytische Domäne erweitert (Morgunova et al., 1999). Weitere Modifikationen sind extrem verlängerte Linkerpeptide wie in der Kollagen-TypV-ähnlichen katalytischen Domäne von Gelatinase B (Elkins et al., 2002), zusätzliche Peptidsegmente am Ende der Hämopexin-ähnlichen Domäne (z.B. MMP-19), eine komplett unterschiedliche C-terminale Domäne, wie z.B. bei MMP-23 (Pei, 1999; Valasco et al., 1999), sowie die Bindung an die Zelloberfläche über eine Transmembranhelix und eine nachfolgende kleine cytoplasmatische Domäne, wie sie bei den MT-MMPs beobachtet werden kann (Sato et al., 1994).

Zur Zeit sind drei humane Vertreter der Kollagenasen besonders gut untersucht, nämlich Kollagenase-1, -2 und -3 (MMP-1, -8 und -13), die alle in der Lage sind, fibrilläres Kollagen (Kollagen I – III) abzubauen, obgleich mit unterschiedlicher Effizienz (Lauer-Fields et al., 2000). Weitere MMPs, die gleichfalls diese Funktion besitzen, sind die Gelatinasen und MT1-MMP (Kahari & Saarialho-Kere, 1999). Die interstitiellen Kollagenasen besitzen die Fähigkeit, Kollagen TypI an der spezifischen Position Gly-Leu/Ile zu spalten (Netzel-Arnett et al., 1991). Es entstehen dabei zwei Bruchstücke im Größenverhältnis $\frac{1}{4}$ und $\frac{3}{4}$. Die Spaltprodukte können dann von Proteasen, wie z.B. Gelatinasen und Serinproteasen, u.a. neutrophiler Elastase (Kafienah et al., 1998) weiter zerlegt werden.

MMP-3 sowie verschiedene Serinproteasen wie Plasmin und Trypsin-2 sind in der Lage Kollagenase-1 bis -3 zu aktivieren (Davis et al., 2001; Moilanen et al., 2003).

Humane Kollagenase-3 (MMP-13) baut TypII Kollagen ab, welches bei Gelenkrheumatismus hauptsächlich zerstört wird (Freije et al., 1994; Mitchell et al., 1996). Dabei übertrifft MMP-13 MMP-1 mit einer Effizienz, die um ein 10 faches höher liegt. Sie stellt somit eine weitere hochregulierte Kollagenase bei Gelenkrheumatismus dar (Knäuper et al., 1996). MMP-1 scheint innerhalb der Kollagenasefamilie am deutlichsten auf den Abbau von Kollagen spezialisiert zu sein, da sie u.a. eine um 8 – 44 mal niedrigere Aktivität im Vergleich zu den klassischen Kollagenasen MMP-8 und MMP-13 beim Abbau von Gelatin

zeigt (Knäuper et al., 1996). Die Präferenz für tripelhelikales Kollagen wird weiterhin hervorgehoben durch die 10 – 100 mal niedrigere Aktivität gegenüber chromogenen Substraten in Vergleich zu MMP-8 und MMP-13 (Knäuper et al., 1996).

Eine weitere Besonderheit von MMP-1 ist die Interaktion mit der Domäne I von $\alpha 2$ -Integrin, welches an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Untersuchungen haben gezeigt, daß MMP-1 sowohl in der aktiven wie auch inaktiven Form an die Domäne I von $\alpha 2$ -Integrin binden kann, während MMP-3 und MMP-13 dazu nicht in der Lage sind (Stricker et al., 2001). Untersuchungen mit PEX1/DomäneI- $\alpha 2$ -Integrin-Chimären zeigen, daß für eine Bindung sowohl das Linkerpeptid (*hinge-region*) wie auch die Hämopexin-ähnliche Domäne erforderlich sind (Stricker et al., 2001). Die Bindung von $\alpha 2$ -Integrin an TypI Kollagen induziert die Expression von MMP-1 in Keratinozyten, wobei MMP-1 für die $\alpha 2$ -Integrin abhängige Wanderung von Keratinozyten auf Kollagen notwendig ist (Pilcher et al., 1999).

Ein weiteres Enzym, das die Fähigkeit besitzt, die Expression von MMP-1 zu induzieren, und die anschließende Positionierung an die Zelloberfläche zu vermitteln, ist CD147/EMMPRIN (Guo et al., 2000). Eine Anhäufung von EMMPRIN ist auf der Zelloberfläche von Krebszellen zu beobachten. Es ist in der Lage, die Expression von MMP-1 Molekülen in benachbarten Fibroblasten zu induzieren, und diese anschließend zu binden. Die Folge ist eine Anhäufung von MMP-1/EMMPRIN-Komplexen an der Zelloberfläche von Tumorzellen, welche wahrscheinlich die Tumordinvasion fördern (Guo et al., 2000).

MMP-1 ist somit neben MMP-2, -3, -9 und -14 ein Hauptagonist in der Tumordinvasion, Metastasenbildung und Angiogenese (Sternlicht et al., 2000).

Die hier vorliegende Kristallstruktur von ProMMP-1 ist die zweite vollständige MMP-Struktur. Sie gibt Aufschluß über bislang unbekannt Eigenschaften von ProMMP-1 wie z.B. die Dimerisierung und einen PRO-PEX-Domänen Kontakt.

2.4 Vergleich von Mono- und Dizinkpeptidasen

Die strukturelle und funktionelle Einheit aus Zink, Wasser und Glutamat findet man sowohl in der Thermolysin- und Metzinkin-Gruppe, wie auch in Carboxypeptidase A, B, und T, was für eine konvergente Evolution spricht. Der katalytische Mechanismus ist für Thermolysin am besten untersucht worden (Matthews, 1988).

Im Gegensatz zu Monozinkpeptidasen ist über Dizinkpeptidasen bezüglich der Struktur und des katalytischen Mechanismus nur sehr wenig bekannt. In früheren Zeiten hat man dem zweiten Zink eine „modulierende“ bzw. „regulierende“ Funktion zugesprochen. Bis heute

sind folgende Kristallstrukturen von Vertretern der Dizinkpeptidasen bekannt: Leucin-Aminopeptidase (LAP) (Burley et al., 1990; Burley et al., 1991; Sträter & Lipscomb, 1995), PepA (Sträter et al., 1999), Aminopeptidase aus *Aeromonas proteolytica* (AAP) (Chevrier et al., 1994) und *Streptomyces griseus* (Gilboa et al., 2000), Kobalt/Zink Methionyl-Aminopeptidase Typ-I aus *E. coli* (Roderick & Matthews, 1993) und Typ-II aus *Pyrococcus furiosus* (Tahirov et al., 1998) sowie die Prolin-spezifische Aminopeptidase aus *E. coli* (Wilce et al., 1998). Sie weisen signifikante Unterschiede auf, zeigen dennoch Ähnlichkeiten bezüglich des Dizink-Aktivzentrums: Die Anwesenheit eines exakt koordinierten Wassermoleküls, das in Wechselwirkung zu beiden Zinkionen steht sowie einer freien Koordinationsposition in beiden Zinkionen, und eine gemeinsame Bindung beider Zinkionen durch die Seitenkette einer Aminosäure, die üblicherweise ein Aspartat oder ein Glutamat ist. AAP und LAP scheinen einen ähnlichen katalytischen Mechanismus zu besitzen, dabei hat Glu151 in AAP eine ähnliche Funktion wie das Wasser/Hydroxid-Molekül in LAP, nämlich die Rolle der Base und des *proton-shuttles*, ähnlich wie das katalytische Glutamat in Monozinkdipeptidasen (Matthews, 1988).

Beide Zinkionen besitzen somit eine katalytische Funktion in bezug auf die Aktivierung und als Nukleophil. Weiterhin nimmt ein Zinkion bei diesen Aminopeptidasen an der Substraterkennung und Bindung durch Wechselwirkung mit der unprotonierten terminalen Aminogruppe des Substrats teil.

2.4.1 PeptidaseV

Für die Fermentation von Milch sind vor allem die Milchsäurebakterien als Starterkulturen von großer Bedeutung. Sie sind auxotroph für viele Aminosäuren und Vitamine, was die Wichtigkeit ihrer Fähigkeit, das Milchprotein Casein effizient abzubauen, unterstreicht (Kok & DeVos, 1994).

Sie besitzen ein komplexes proteolytisches System, um Casein zu kleinen Peptiden und Aminosäuren zu degradieren. Die Qualität der fermentierten Milchprodukte hängt entscheidend davon ab, welche Peptide und Aminosäuren beim Abbau entstehen. Die große ökonomische Bedeutung solcher Prozesse für die Lebensmittelindustrie erfordert ein besseres Verständnis der Enzyme (Proteasen), die hier involviert sind. Gentechnische Veränderung solcher Starterkulturen könnten eine Erhöhung der Produktqualität und –vielfalt und eine Verbesserung der Prozeßfolgen und –sicherheit sowie die Reduktion hygienischer Risiken ermöglichen. Medizinisch relevant könnte die Feststellung sein, daß durch

Lactobacillus helveticus fermentierte Milch eine blutdrucksenkende Wirkung besitzt (Yamamoto et al., 1999).

Dipeptidasen stellen eine wichtige Komponente dieses Proteinabbausystems dar, da sie die finale Zerlegung von Dipeptiden, die durch andere Proteasen dieses Systems erzeugt wurden, übernehmen. Eine dieser Dipeptidasen in *Lactococcus lactis* ist PepV. Eine Deletion des *pepV* Gens in *Lactococcus lactis* führt zu einer signifikant verringerten Wachstumsrate, ändert jedoch nichts an der finalen Zelldichte (Hellendoorn et al., 1997).

PeptidaseV (PepV) aus *Lactobacillus delbrueckii* wurde ursprünglich als Carnosinase beschrieben, welche das ungewöhnliche Peptid β -Ala-His (Carnosin) spaltet (Barrett, 1998). PepV besteht aus 470 Aminosäuren und wurde als relativ unspezifische Dipeptidase charakterisiert. Sie spaltet eine Reihe von Dipeptiden, vorzugsweise solche mit einem N-terminalen β -Ala- oder D-Ala-Rest sowie N-terminale Aminosäuren aus einigen Tripetiden (Vongerichten et al., 1994). Interessanterweise ist PepV nicht nur zu Proteasen, sondern auch zur Acetylnithin-Deacetylase und Succinyldiaminopimelat-Desuccinylase verwandt und wurde daher vor kurzem als ein Mitglied der Aminoacylase-1 Familie beschrieben (Biagini & Puigserver, 2001). Diese Enzyme teilen die Eigenschaft, Amidbindungen mit Hilfe von Zink bzw. Kobalt zu hydrolysieren.

In der Einteilung der Peptidasen gehört PepV der binuklearen Peptidasefamilie M20 an (Chevrier et al., 1994; Barrett et al., 1998). Diese Familie gehört zum Klan MH, welcher folgende weitere Enzyme umfaßt: Eine bakterielle und eine aus Hefe stammende Carboxypeptidase, die sogenannten Carboxypeptidasen G1 und G2 (CPG1 und CPG2) aus *Pseudomonas stutzeri* und *Pseudomonas sp.*, eine Gly-X Carboxypeptidase aus Hefe sowie mehrere Tripeptidasen (PepT) aus verschiedenen Bakterien (Barrett, 1998). Von diesen Enzymen ist bisher nur die Kristallstruktur von CPG2 bekannt (Rowell et al., 1997). Diese ist von großem Interesse, da das Enzym die Fähigkeit besitzt, ein Glutamat aus Folsäure und Analoga, wie z.B. dem chemotherapeutischen Agens Methotrexat, abzuspalten.

Weitere Kristallstrukturen von binuklearen Zink-Amino-peptidasen sind von den zur M28 Familie gehörenden Amino-peptidasen bekannt, wie z.B. die Amino-peptidasen aus *Aeromonas proteolytica/Vibrio proteolyticus* (Chevrier et al., 1994; Stamper et al., 2001) und *Streptomyces griseus* (Greenblatt et al., 1997; Gilboa et al., 2000).

2.4.2 Isoaspartyl Dipeptidase

Proteine unterliegen verschiedenen chemischen Modifikationen während sie altern. Zu den bekanntesten Modifikationen von Peptiden und Proteinen zählen die Spaltung von Peptidbindungen, Trennung von Disulfidbrücken, Oxidation von Cysteinen und Methioninen, Glykosylierung und Carbamoylierung von Aminogruppen und die Deamidierung und Racemisierung von L-Asparagin- und L-Glutaminsäuren (Harding et al., 1989; Wright, 1991; Clarke et al., 1992).

Deamidierungs- und Racemisierungsuntersuchungen an Proteinen und Peptiden (Geiger & Clarke, 1987; Patel & Borchardt, 1990) zeigten, daß unter neutralen und basischen Bedingungen die Reaktion über ein Succinimidderivat verläuft. Die spontane Hydrolyse des Intermediats resultiert schließlich in einem α - oder β -verknüpften Aspartat (Isoaspartat) (Abbildung 2-7). Die Geschwindigkeit der Deamidierung wird stark durch die Seitenketten der C-terminal folgenden Aminosäure beeinflusst. Ein Asn-Gly oder Asn-Ser wurde hierfür als günstig beschrieben (Geiger & Clarke, 1987; Capasso et al., 1996). Das Verhältnis der α - und β -verknüpften Reaktionsprodukte wurde für synthetische Oligopeptide (Meinwald et al., 1986) und für Proteine (Di Donato et al., 1993; Brennan et al., 1994; Capasso et al., 1996) mit etwa 1:3 bestimmt.

In vivo konnten solche posttranslationalen Modifikationen für α A-Crystallin (Fujii et al., 1994; Takemoto & Boyle, 1998) und α B-Crystallin (Fuji et al., 1994) aus jungen und gealterten menschlichen Augenlinsen, für das β -Amyloid-Peptid aus Gehirnzellen eines an Alzheimer erkrankten Patienten (Roher et al., 1993), für die Mikrotubulin-bindende Domäne von Tau (Watanabe et al., 1999) und für HMAP (*high mass methyl-accepting protein*) aus menschlichen Gehirnzellen (David et al., 1998) nachgewiesen werden.

Strukturell gesehen wurden Isoaspartyl-Reste in einigen gealterten Proteinen, wie z.B. in der Rinder-Ribonuklease A, Hühnereiweiß-Lysozym und Schweine- β -Trypsin (Capasso et al., 1996; Noguchi et al., 1998; Rester et al., 2000) festgestellt. Um solchen Schäden entgegenzuwirken, hat die Natur verschiedene Strategien hervorgebracht. Zum einen wandelt das im Cytosol verbreitete Enzym L-Isoaspartat-(D-Aspartat)-O-Methyltransferase (Clarke, 1985; Galletti et al., 1995) L-Isoaspartyl-Reste in Proteinen wieder zu L-Aspartaten um (Brennan et al., 1994). Dieses Enzym erkennt allerdings Dipeptidyl-Dipeptide nur sehr schlecht (Lowenson & Clarke, 1991). Nur spezielle Enzyme wie die Isoaspartyl Dipeptidase (IadA) aus *E. coli* (Haley, 1968), sind in der Lage sie abzubauen. Die IadA ist somit auf die Hydrolyse von L-Isoaspartat-enthaltenden Dipeptiden spezialisiert (Johnson & Aswad, 1990).

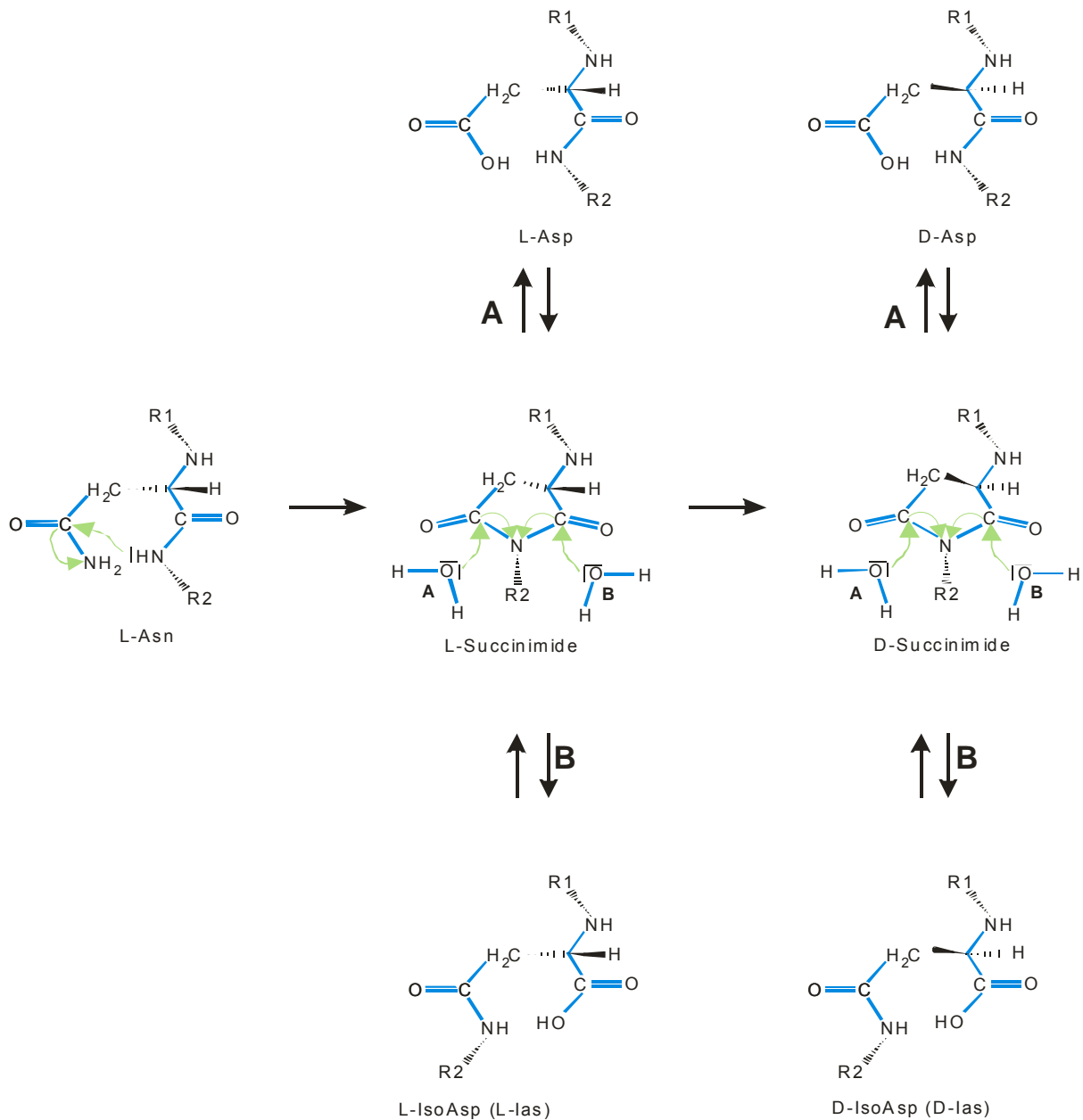


Abbildung 2-7: Schema der spontanen Deamidierung, Isomerisierung und Racemisierung von Asparagin- und Aspartat-Resten nach Watanabe (Watanabe et al., 1999). L-Asparagin (L-Asn) und L-Aspartat (L-Asp) können über ein Succinimid-Intermediat in L-Isoaspartat (L-Ias), D-Aspartat (D-Asp) und D-Isoaspartat (D-Ias) umgewandelt werden.

Neben den bakteriellen Isoaspartyl Peptidasen finden sich derartige Enzyme auch in Eukaryonten. Experimente mit radioaktiv markierten Isoaspartyl-Dipeptiden und Tripeptiden, die an Ratten verfüttert werden, bestätigen, daß eine große Menge dieser Peptide metabolisiert und dann ausgeschieden werden kann (Dorer et al., 1968).

Die Isoaspartyl Dipeptidase konnte aus verschiedenen Organen der Ratte isoliert werden. Das Protein konnte aus der Rattenleber partiell gereinigt werden und hydrolysiert präferentiell

Isoasp-Gly-Dipeptide und auch einige Tripeptide, jedoch in keiner beachtlichen Menge (Dorer et al., 1968). Die vorhandenen Daten lassen darauf schließen, daß sich bakterielles und Säugetierenzyme deutlich unterscheiden.

Vor kurzem haben Gary und Clarke (Gary & Clarke, 1995) die 41 kDa IadA aus *E. coli* isoliert und exprimiert, welche vorzugsweise Isoaspartyl-Dipeptide mit einer C-terminalen hydrophoben Aminosäure spaltet, jedoch inaktiv gegenüber Isoasp-Gly bzw. -His Resten in zweiter Position ist (Haley, 1968; Gary & Clarke, 1995). Das Enzym bildet Oligomere in einer Größe von 120 kDa, wie durch Gelfiltrationsexperimente bestätigt wurde. γ -Glutamyl-Peptide stellen keine Substrate für IadA dar, was die funktionelle Trennung der Aktivität von IadA und γ -Glutamyltranspeptidase bestätigt (Gary & Clarke, 1998). Bei dem Versuch, Peptidasen aus *Salmonella typhimurium* zu isolieren, welche in einem Medium mit Aspartyl-Leucin-Dipeptiden wachsen können, konnte die IadA aus *S. typhimurium* identifiziert werden (Larsen et al., 2001). Diese Dipeptidase zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit zum *E. coli* Enzym und bildet ebenso Oligomere mit einer Masse von ca. 200 kDa. Weiterhin konnten Larsen und Mitarbeiter ein weiteres Isoaspartyl-spaltendes Enzym charakterisieren, welche als Isoaspartyl-Amino-peptidase (IaaA) bezeichnet wird und darüber hinaus Asparaginase-Aktivität besitzt (Larsen et al., 2001; Hejazi et al., 2002). Die Präsenz eines zweiten Isoaspartyl-spaltenden Enzyms liegt in Übereinstimmung mit den Befunden von Gary und Clarke, die herausgefunden hatten, daß IadA Deletions-Stämme weiterhin Isoaspartyl Dipeptidase Aktivität besitzen (Gary & Clarke, 1995).

Inhibitor Studien zeigen, daß IadA eine Zink-abhängige Peptidase ist und Sequenzähnlichkeit zu bakterieller Dihydroorotase besitzt. IadA ist ein Vertreter der M38 Familie der Metalloproteasen (Klan MX) (Haley, 1968; Gary & Clarke, 1998).

2.5 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

2.5.1 Überblick

Die Methode der Strukturaufklärung von Proteinen über die Röntgenkristallographie ist in verschiedenen Lehrbüchern ausführlich behandelt (Blundell & Johnson, 1976; Stout & Jensen, 1989; Drenth, 1994). Für die Analyse der dreidimensionalen Struktur eines Proteins gibt es zur Zeit drei etablierte Methoden.

Die erste Methode ist die Elektronenmikroskopie, die eine dreidimensionale Darstellung der Oberfläche von Molekülen ermöglicht.

Die zweite Methode ist die Kernresonanzspektroskopie NMR (*nuclear magnetic resonance*). Mit dieser Methode können Proteine in Lösung untersucht werden, was den Vorteil hat, daß man wesentlich mehr Informationen über dynamische Prozesse gewinnt. Eine entscheidende Limitation ist jedoch die Beschränkung auf Proteine mit einem Molekulargewicht von maximal 35 kDa.

Die dritte Methode ist die bereits oben erwähnte Röntgenkristallographie. Der Vorteil dieser Methode ist, daß man im Gegensatz zur NMR Proteine mit höherem Molekulargewicht untersuchen kann. Die Voraussetzung allerdings ist die Herstellung von geeigneten Proteinkristallen mit einer hohen Qualität, welche die Röntgenstrahlen beugen können.

2.5.2 Kristallisation

Die Kristallisation von Proteinen sollte möglichst unter physiologischen Bedingungen stattfinden. Darüber hinaus sollte das Protein eine hochreine Qualität besitzen. Heutzutage sind verschiedene Methoden zur Erzeugung von Proteinkristallen bekannt (McPherson, 1990), von denen der Dampfdiffusionsmethode die weitaus größte Bedeutung zukommt. Bei dieser Methode kommt es in einem abgeschlossenen Raum zu einer Gleichgewichtseinstellung zwischen zwei Lösungsvolumina über die Gasphase (Übersichtsartikel: McPherson, 1982). Die Folge ist das Aufkonzentrieren des Proteins bis hin zur Übersättigung und im Idealfall zu einem Abscheiden des Proteins aus der Lösung, zur Kristallisation. Die Kristallisation eines Proteins ist von verschiedenen Bedingungen abhängig, wie z.B. pH-Wert, Salzkonzentration, Art des Fällungsmittels, Temperatur usw. Eine Möglichkeit das Problem der Kristallisation zu lösen, ist die Anwendung von faktoriellen Ansätzen (Carter, 1979; Jancarik & Kim, 1991).

Definitionsgemäß ist ein Kristall eine dreidimensionale Anordnung von Gitterbausteinen. Ein Kristall wird durch Translation der sogenannten Elementarzelle um ganzzahlige Vielfache der Elementarzellvektoren in alle drei Raumrichtungen aufgebaut. Die Elementarzelle wird durch Anwendung aller Symmetrieoperatoren der jeweiligen kristallographischen Raumgruppe auf die kleinste sich wiederholende Einheit, die asymmetrische Einheit, gebildet.

2.5.3 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

Der einfallende Röntgenstrahl regt die Elektronen in der Elektronenhülle der Atome im Proteinkristall an, so daß sie als oszillierende Dipole mit der Frequenz des Röntgenstrahls schwingen. Dabei emittieren sie Sekundärstrahlung, die im Phasenwinkel um 180° zum Primärstrahl verschoben ist, in alle Raumrichtungen. Dies ist die sogenannte kohärente Streuung.

Die durch periodische Wiederholung der Elementarzelle in alle drei Raumrichtungen auftretenden Translationsvektoren bilden in ihrer Gesamtheit das Kristallgitter. Dieses Gitter wird von sogenannten Netzebenen durchzogen, die verschiedene Gitterpunkte enthalten und durch ihre Schnittpunkte mit den Elementarzellachsen identifiziert werden, aus denen die MILLER'schen Indizes gebildet werden. Konstruktive Interferenz ist für eine Netzebene nur dann erfüllt, wenn der Gittervektor der Netzebene vom Ursprung des reziproken Gitters (O) aus aufgetragen die Ewald-Kugel schneidet (P). Verbindet man P mit dem Kristall in O ergibt sich die Richtung des gebeugten Strahls s. Durch die Rotation des Kristalls und somit auch des reziproken Gitters, erfüllen immer andere Gitterpunkte die Beugungsbedingung, die sich in Form des BRAGG'schen Gesetzes formulieren läßt:

$$n = \frac{2d \sin \theta}{\lambda}$$

Hierbei ist d der Abstand zwischen Netzebenenscharen, θ der Streuwinkel und λ die verwendete Wellenlänge. Eine graphische Formulierung des BRAGG'schen Gesetzes ist in Abbildung 2-8 dargestellt.

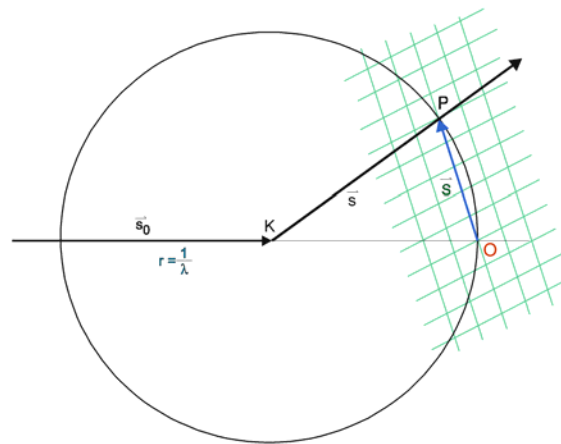


Abbildung 2-8: EWALD-Konstruktion (Ewald, 1921). Um den in Punkt K befindlichen Kristall wird eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ konstruiert. Der Vektor des einfallenden Röntgenstrahls ist mit s_0 gekennzeichnet. Der Ursprung des reziproken Gitters befindet sich nun in O, wo der über den Kristall hinaus verlängerte Vektor s_0 die Ewald-Kugel schneidet. Der einfallende Strahl wird um 2θ gebeugt und wird zu s .

Um Prinzipien der Röntgenkristallographie vereinfacht zu beschreiben, ist das reziproke Gitter hilfreich. Es wird gebildet aus der Ansammlung aller Normalenvektoren dieser Netzebenenscharen mit der Länge des reziproken Netzebenenabstands.

Es gilt $d_{hkl} \sim 1/\sin \theta_{hkl}$. Diese Vektoren sind um so kürzer, je größer die hkl-Indizes und die Beugungswinkel werden. Durch die Achsenabschnitte a/h , b/k und c/l werden die Endpunkte des Vektors definiert. Wird statt dem normalen Gitter ein Koordinatensystem mit reziproken Achsen $a^* = 1/a$, $b^* = 1/b$ und $c^* = 1/c$ verwendet, ergibt sich, da die hkl-Indizes immer ganzzahlig sind, aus den Endpunkten der reziproken Netzebenen-Abstandsvektoren $d^* = 1/d_{hkl}$ ein weiteres echtes Gitter, das reziproke Gitter. Jeder Gitterpunkt entspricht einem möglichen Reflex hkl.

2.5.4 Berechnung der Elektronendichte

Da die Röntgenstrahlen an der Elektronenhülle der Atome gebeugt werden, ergeben sich aus der Strukturanalyse nicht sofort die genauen Atompositionen sondern die dreidimensionale Verteilung der Elektronen der Atome, die als **Elektronendichteverteilung** bezeichnet wird. Die Elektronendichteverteilung ρ an jedem Punkt (x,y,x) in einem Kristall läßt sich aus der Strukturfaktoramplitude $F(h,k,l)$, die proportional zur Quadratwurzel der gemessenen

Intensität I für den Reflex (h,k,l) ist, der entsprechenden Phase ϕ_{hkl} und dem Volumen V der Einheitszelle durch inverse *FOURIER*-Transformation berechnen:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Der Gangunterschied ϕ_{hkl} eines Reflexes ist hierbei einer direkten Messung nicht zugänglich, da aus den integrierten Reflexintensitäten lediglich die Strukturamplituden $|F_{hkl}|$ bestimmt werden können. Diese Unbestimmtheit wird in der Proteinkristallographie als **Phasenproblem** bezeichnet.

2.5.5 Lösung des Phasenproblems

Die *PATTERSON*-Summation ist eine Funktion, die zur Lösung des Phasenproblems herangezogen wird, selbst aber nicht von den Phasen abhängt:

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

Die *PATTERSON*-Funktion $P(u, v, w)$ ist eine Fouriersynthese, die die gemessenen Intensitäten (Strukturfaktoramplituden) ohne Phasenwinkel ($\alpha = 0$) direkt als Fourierkoeffizienten einsetzt. Dabei sind u, v und w die Achsen der *PATTERSON*-Zelle. Die Dimensionen der *PATTERSON*-Zelle sind identisch mit den Dimensionen der realen Einheitszelle x, y und z . Der dadurch entstehende *PATTERSON*-Raum mit den Koordinaten (u, v, w) wird durch alle von einem Punkt aus aufgetragene interatomare Abstandsvektoren aufgespannt, welchen am Ende eine Elektronendichte zugeordnet ist. In bestimmten Bereichen dieser Dichtekarte kommt es durch kristallographische Symmetrieoperationen zu einer Häufung von Abstandsvektoren. Diese Bereiche werden *HARKER*-Ebenen genannt.

Es gibt vier Methoden um das Phasenproblem zu lösen:

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

2.5.5.1 Isomorpher Ersatz

Bei der Methode des Isomorphen Ersatzes wird ein Datensatz eines Proteinkristalls (NATI) und mindestens ein Datensatz eines sogenannten 'isomorphen Derivates' (DERI) aufgenommen. Notwendige Eigenschaft ist eine gute Kristallisomorphie sowie eine geordnete Bindung von Schweratomen im Kristall. Die Atompositionen der Schweratome können über Differenz-Patterson-Funktionen aus den Strukturfaktoramplituden (ΔF) von DERI und NATI erhalten werden. Voraussetzung ist, daß die Anzahl der gebundenen Atome nicht zu hoch ist. Eine aus den Strukturfaktoramplituden (ΔF) berechnete *PATTERSON*-Dichte sollte somit interpretierbar sein, aufgrund der wesentlich geringeren Anzahl der Schweratome. Initiale Phasenwinkel für die Proteinstrukturfaktoren können durch den Vergleich von Nativ-, Derivat- und Differenzstrukturfaktoramplituden mit den komplexen Strukturfaktoren aus dem Schweratommodell bestimmt werden (Abbildung 2-9).

In einigen Fällen kann man bereits mit einem Derivat hinreichende Proteinphasen bestimmen (*single isomorphous replacement*, SIR), oft benötigt man mehrere unabhängige Derivate (*multiple isomorphous replacement*, MIR).

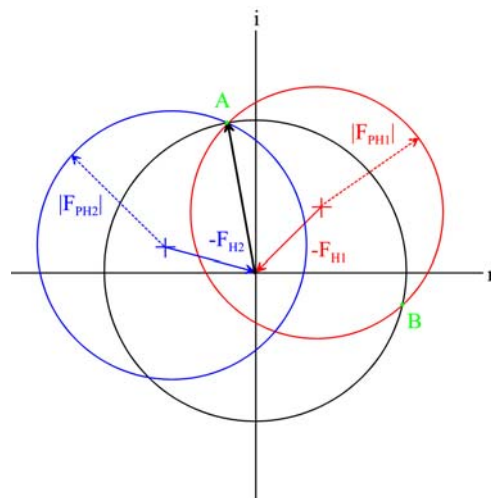


Abbildung 2-9: *HARKER*-Konstruktion (Harker, 1956). Für jeden Reflex wird um den Ursprung ein Kreis mit dem Radius $|F_P|$ gezeichnet (schwarz). Dieser wird im Falle eines Derivates $|F_{PH1}|$ von dessen Kreis (rot) an zwei Punkten A und B geschnitten, so daß der Phasenwinkel nicht eindeutig bestimmt werden kann. Erst ein weiteres Derivat $|F_{PH2}|$ (blau) hebt diese Doppeldeutigkeit auf. Am gemeinsamen Schnittpunkt A ergibt sich die Proteinphase eindeutig.

2.5.5.2 Multiple anomale Dispersion

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung von Proteinphasen nutzt das Phänomen der anomalen Streuung aus. Diffraktionsphänomene werden normalerweise durch Streuung an freien Elektronen beschrieben, wobei die gestreute Welle der einfallenden gegenüber um 180° phasenverschoben ist. In der Nähe einer Absorptionskante eines Elements gilt diese Näherung nicht mehr, und der Atomfaktor ist nicht mehr länger eine reelle, sondern eine komplexe Zahl. Dieses bedingt, daß die *FRIEDEL*-Paare F_{PHN^+} und F_{PHN^-} (Reflexe mit identischen Strukturfaktoramplituden und Phasenwinkel mit umgekehrten Vorzeichen) weder betragsmäßig noch in ihrem Phasenwinkelbetrag identisch sind, also die Strukturfaktoren F_{PHN^+} und F_{PHN^-} keine komplex-konjugierten Zahlen mehr sind (Abbildung 2-10). Somit kann aus den Amplitudendifferenzen (*BIJVOET*-Differenzen) dieser Reflexe eine *PATTERSON*-Dichte berechnet werden, aus der sich ein Modell der Substruktur aller bei einer bestimmten Wellenlänge anomal streuenden Atome erstellen läßt.

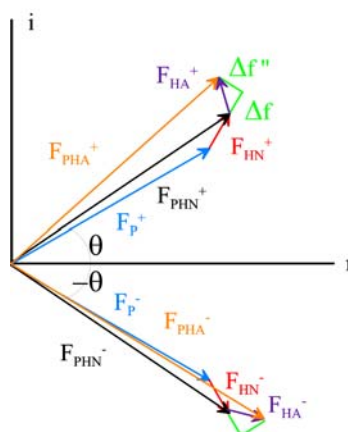


Abbildung 2-10: Der Einfluß der anomalen Dispersion auf Strukturfaktoren mit entgegengesetzten Vorzeichen für den Phasenwinkel. Ohne anomale Streuung gilt $F_{\text{PHN}^+} = F_{\text{PHN}^-}$. Diese Strukturfaktoren setzen sich aus einem Beitrag des Proteins F_P und einem „normalen“ Beitrag F_{HN} des Schweratoms zusammen. Im Falle anomaler Streuung addiert sich eine reale Komponente Δf in Verlängerung zu F_{HN} und senkrecht dazu eine imaginäre Komponente $\Delta f''$, die stets einen kleinen Phasenwinkel dazu addiert. Als Folge davon weisen die kombinierten Strukturfaktoren aus „normalen“ und „anormalen“ Beiträgen F_{PHA^+} und F_{PHA^-} sowohl unterschiedliche Amplituden als auch Phasenwinkel auf.

Analog zum *MIR*-Fall können nun durch eine *HARKER*-Konstruktion initiale Proteinphasenwinkel bestimmt werden.

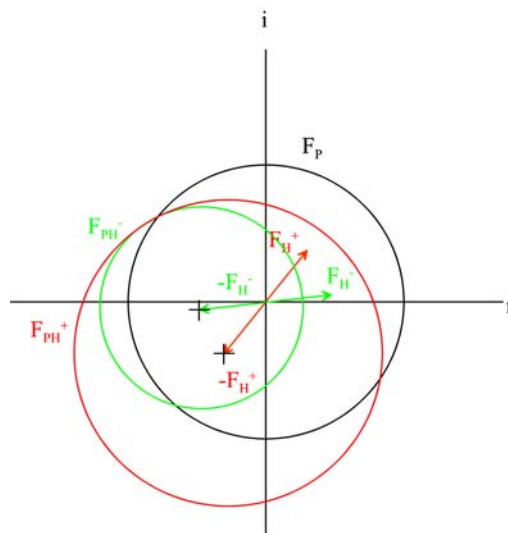


Abbildung 2-11: Vereinfachte *HARKER*-Konstruktion, die die Ableitung eines eindeutigen Phasenwinkels mit Hilfe der anomalen Streuung erlaubt. Der Vektor für die „normalen“ Strukturfaktoramplituden ist mit F_P gegeben. Die beiden *BIJVOET*-Paare sind mit F_H^+ und F_H^- gekennzeichnet. F_H^- ist vereinfacht mit einem Phasenwinkel mit entgegengesetztem Vorzeichen dargestellt, damit sich die drei Kreise in einem Punkt schneiden. Im MAD Experiment wird F_P durch Messung eines *remote* Datensatzes bestimmt, dessen Wellenlänge weit von der Absorptionskante entfernt ist.

2.5.5.3 Molekularer Ersatz

Bei der Methode des Molekularen Ersatzes (*molecular replacement*) wird die notwendige Phaseninformation durch den Einsatz eines Strukturmodells mit hinreichend hoher Homologie mit Hilfe der *PATTERSON*-Funktion bestimmt. Anhand der Koordinaten des bekannten Modells können, nach Positionierung in der zu lösenden Struktur, die Strukturfaktoramplituden F_{calc} und die Phasen ϕ_{calc} berechnet werden. Mit den Modellphasen und den experimentell erhaltenen Strukturfaktoramplituden F_{obs} wird eine Elektronendichtekarte für die zu bestimmende Kristallstruktur errechnet. Die Positionierung des orientierten Modells kann über eine Realraumsuche der Translation, über eine Analyse der *HARKER*-Ebenen oder durch Korrelationssuchen von intermolekularen *PATTERSON*-Vektoren erfolgen.

3. Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel de Häen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Hampton Research (Laguna Hills, USA), Millipore (Eschborn), Qiagen (Hilden), Stratagene (Heidelberg), BioRad (München) und Sigma (Deisenhofen) bezogen und waren mindestens von analytischem Reinheitsgrad.

3.1.2 Bakterien

Sämtliche molekularbiologischen Arbeiten sowie heterologe Expression rekombinanter Proteine wurden in folgenden Derivaten des *E. coli* Stammes K12 durchgeführt:

Klonierung:

E. coli DH5 α (Stratagene GmbH, Heidelberg)

Genotyp: F⁻, *deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*(r_k⁻m_k⁺), *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*, Δ (*lacZYA-argF*), ϕ 80*lacZ* Δ M15F⁻ λ ⁻

Expression:

E. coli BL21(DE3) (Novagen, INC. Madison, Wisconsin, USA)

Genotyp: F⁻, *ompT*, *hsdS_B*, (r_B⁻m_B⁻), *gal*, *dcm*, (DE3)

E. coli BL21(DE3)RIL (Novagen, INC. Madison, Wisconsin, USA)

Genotyp: F⁻, *ompT*, *hsdS_B*, (r_B⁻m_B⁻), *gal*, *dcm*, (DE3)

E. coli BL21(DE3)RP (Novagen, INC. Madison, Wisconsin, USA)

Genotyp: F⁻, *ompT*, *hsdS_B*, (r_B⁻m_B⁻), *gal*, *dcm*, (DE3)

E. coli M15(pREP4) (Qiagen, Hilden)

Genotyp: *lac*, *ara*, *gal*, *mtl*, *recA*⁺, *uvr*⁺, Str^R, (pREP4: Kan^R, *lacI*)

E. coli RosettaTMDE3 (Novagen, INC. Madison, Wisconsin, USA)

Genotyp: F⁻, *ompT*, *hsdS_B*, (ir_B⁻m_B⁻), *gal dom lacY1*, pRARE(CmR)

3.1.3 Plasmide

pKV104

(Expressionsplasmid für PepV zur Verfügung gestellt von Prof. Henrich, Kaiserslautern)

pTrc99a

(Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden)

3.1.4 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim), Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Alkalische Phosphatase aus Kälbermagen wurde bei Boehringer Mannheim und T4-DNA-Ligase bei New England Biolabs gekauft. Pwo-Polymerase wurde von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) bezogen.

3.1.5 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden verwendet, um die codierende Sequenz der Isoaspartyl Dipeptidase aus genomischer *E. coli* W3110 DNA zu amplifizieren. Für die Klonierung wurden Restriktionsschnittstellen eingebaut.

5'-*iada* 5'CAAGGAGTTATCATGATTGATTATACCGCAGCCGG3' 35mer (BspHI)

3'-*iada* 5'CGGGCGGGCTGACAAGCTTTTAAGCCTGTTCAAACGTTCC3' 39mer (HindIII)

3.1.6 Geräte

Zentrifugen waren von den Firmen Beckmann, Sorvall, Hettich und Eppendorf, Pipetten der Marke Gilson und Eppendorf. PCR wurden auf einem Gradient Robocycler (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Chromatographiert wurde mit Hilfe von FPLC oder ÄKTA (Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden). Röntgendiffraktion wurde auf Drehanoden RU200 (RIGAKU) mit MAR Research *image plate* Detektoren oder mit Synchrotronstrahlung am DESY (Hamburg), *beamline* BW6 mit einem MAR Research CCD-

3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung des *IadA* Gens wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) angewandt. Anhand der bekannten Sequenz wurden die Primer 5'-*iadA* und 3'-*iadA* generiert. Durch eine PCR-Reaktion (Saiki et al., 1986) mit den entsprechenden Primern konnten die Restriktionsschnittstellen *BspHI* und *HindIII* in die codierende Sequenz eingeführt werden.

PCR-Ansätze mit jeweils 30 µl Volumen enthielten 50 – 100 ng *template*-DNA, je 4 pmol der 5'- und 3'-Primer, 2,5 µl 10x Pwo-Polymerase-Puffer, je 250 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP und 5 U Polymerase. Die Ansätze wurden in einem RoboCycler Gradient 96 (Stratagene, Heidelberg) dem folgenden Temperaturprogramm unterworfen:

1x	94 °C	5 min
30x	94 °C	5 min
	42 – 58 °C	1 min
	72 °C	1 – 3 min
1x	72 °C	12 min

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte in Agarosegelen. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 0,8 – 2,0 % Agarose (w/v) (Biozym) in Laufpuffer aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Die gelöste Agarose wurde mit H₂O wieder auf das Ausgangsvolumen gebracht. Die Agarose konnte dann in eine vorbereitete Elektrophoresekammer gegossen und nach dem Erstarren mit Laufpuffer überschichtet werden. Die zu trennenden Proben wurden mit 6x Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 8 - 10 mA/cm Elektrodenabstand. Die aufgetrennte DNA wurde unter UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) detektiert.

TAE-Puffer: 40 mM Tris
 20 mM Essigsäure
 1mM EDTA, pH 8,0

6x Auftragspuffer: 10 ml 1x TAE-Puffer
 80 ml Glycerin (87 %ig)
 0,2 g Bromphenolblau
 0,2 g Xylencyanol

3.2.4 DNA-Isolierung aus Gelen

Die DNA-Banden wurden mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem Qiagen Gel Extraction Kit nach der mitgelieferten Anleitung aus dem Gel extrahiert.

3.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

DNA-Mengen im Agarose-Gel wurden anhand der Bandenstärke und des Molekulargewichts grob abgeschätzt. Die genaue Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgt bei 260 nm mit einem Spektrophotometer. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1,0 einer Konzentration von 50 μg DNA/ml.

3.2.6 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Plasmidische oder genomische DNA wurde mit 1 - 2 U des entsprechenden Restriktionsenzym pro μg DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 1 - 3 h inkubiert.

3.2.7 Dephosphorylierung von DNA

Verdaute Plasmide wurden mit alkalischer Phosphatase (CIP, NEB) behandelt, um eine Religation partiell verdauter Plasmide zu minimieren. Nach dem Restriktionsverdau wurden 0,2 U alkalische Phosphatase pro μg DNA eingesetzt und in dem vom Hersteller gelieferten Puffer 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reinigung der dephosphorylierten DNA-Fragmente erfolgte über ein Agarose-Gel.

3.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, geschnittene Vektor-DNA und Insert-DNA, mit komplementären 3'- und 5'-Enden wurden kovalent miteinander verbunden, indem 15 ng der Vektor-DNA im molaren Verhältnis von 1:5 mit der Insert-DNA gemischt und mit 10x T4-DNA-Ligase Puffer sowie 1 U T4-DNA-Ligase versetzt wurden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16 °C.

3.2.9 Transformation von *E. coli*

3.2.9.1 *Transformation chemisch kompetenter Zellen*

100 µl chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 – 2 µg plasmidischer DNA versetzt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen 45 sec auf 42 °C erhitzt und wiederum 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 800 µl Antibiotika freiem LB-Medium versetzt und 60 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen zur Selektion von Transformanden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum ausgestrichen oder in LB-Medium mit Selektions-Antibiotikum weiter inkubiert.

Ampicillin: 100 µg/ml

Kanamycin: 15 µg/ml

3.2.9.2 *Elektroporation*

50 µl elektrokompente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in einer auf 4 °C gekühlten Elektroporationsküvette (1 mm) mit 1 µl Ligationsansatz oder plasmidischer DNA versetzt. Elektroporation erfolgte bei 1650 V mit einem Elektroporator1000 (BioRad, München). Die Zellen wurden mit LB-Medium aus der Küvette gespült und 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte entweder Platten- oder Flüssigkultur.

3.2.10 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde der *E. coli* Stamm DH5α mit dem gewünschten Plasmid transformiert und damit 10 ml bzw. 50 ml LB-Medium + Selektionsantibiotikum angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Qiagen Mini Kit bzw. Qiagen Maxi Prep Kit nach der mitgelieferten Vorschrift.

3.2.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt (Sanger et al., 1977). Für die Sequenzierungsreaktion wurden 4 µl Big Dye Terminator Mix

(Applied Biosystems, München), 3,5 pmol Primer und 0,5 µg Template-DNA mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion wurde in einem RoboCycler Gradient 96 (Stratagene, Heidelberg) mit dem folgenden Temperaturprotokoll durchgeführt:

30x	96 °C	30 sec
	48 °C	30 sec
	60 °C	4 min

Anschließend wurden die Reaktionsprodukte mittels Micro-Spin S-200 Säulchen (Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) gereinigt und eine Ethanol-fällung durchgeführt. Die Gelelektrophorese mit anschließender Analyse wurde von Marius Boicu (MPI für Biochemie, Martinsried) mit einem ABI Prism DNA-Sequenator (Modell 373, Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

Nach Beendigung des Sequenzierung-Services am Max-Planck-Institut für Biochemie wurde die Sequenzierungsreaktion zur Firma Qiagen geschickt.

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Bakterienkulturen

3.3.1.1 Flüssigkulturen von Bakterien

Eine Einzelkolonie wurde mit einer sterilen Impföse von einer Agarplatte abgenommen und in 5 ml steriles LB-Medium mit einem Selektionsantibiotikum okuliert. Die Kulturen wurden über Nacht in einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur kann für Plasmidpräparationen oder zum Animpfen von größeren Kulturen im Verhältnis 1:100 bis 1:1000 genutzt werden.

3.3.1.2 Plattenkulturen von Bakterien

LB-Medium wurde mit 15 g/l Agar versetzt und autoklaviert. Vor dem Giessen der Platten wurde das bis auf unter 60 °C abgekühlte Medium mit den erforderlichen Konzentrationen Antibiotikum versetzt. Nach dem Ausplattieren von Bakterien wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bis zur Verwendung wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

3.3.1.3 Glycerinkulturen

0,85 ml einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Bakterienkultur wurden mit 150 µl einer 87 %igen, sterilen Glycerinlösung gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gelagert wurden die Glycerinkulturen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4 Heterologe Expression von rekombinantem Protein in *E. coli*

3.4.1 Expression der PeptidaseV

Der *E. coli* Stamm JM109 wurde mit dem Expressionsvektor pKV104 transformiert und eine Plattenkultur auf einer LB-Kan-Agarplatte angelegt. Von einer Einzelkolonie wurde eine Vorkultur mit 150 ml LB-Kan angeimpft und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 6 l LB-Kan-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 2 l Schikanekolben. Nachdem eine OD_{600} von 1,5 erreicht war, wurde die Kultur mit 1 mM Endkonzentration IPTG induziert und für 6 h weiter inkubiert. Die Zellen wurden durch Abzentrifugation (4200 rpm, 20 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) geerntet.

3.4.2 Expression der Isoaspartyl Dipeptidase

Die für IadA codierende DNA-Sequenz wurde mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *BspHI* und *HindIII* in den pTrc99a Vektor kloniert. Mit diesem Plasmid wurde der *E. coli* Stamm JM109 transformiert und eine Plattenkultur auf LB-Amp-Agarplatte angelegt. Eine Vorkultur mit 150 ml LB-Amp wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 12 l LB-Amp-Medium im Verhältnis 20 ml Vorkultur auf 1 l Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 2 l Schikanekolben. Nachdem eine OD_{600} von 1,0 erreicht war, wurde die Proteinexpression in *E. coli* Zellen durch Zugabe von 1 M IPTG-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 mM IPTG in der Kultur gestartet. Nach der Induktion wurde die Kultur weitere 12 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und die Zellen durch Abzentrifugation (4200 rpm, 20 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) geerntet.

3.4.3 Aufschluß von *E. coli* Zellen

Nach dem Ernten durch Abzentrifugation (4200 rpm, 20 min, 4 °C) wurden die Zellen in 10 ml Aufschlußpuffer pro Liter Kulturmedium resuspendiert. Danach wurden die Zellen entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt, oder sofort aufgeschlossen.

Durch Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und 30 min Inkubation bei RT unter ständigem Rotieren wurden die Zellwände aufgebrochen, so daß die Zellen durch Sonifikation (Branson, Macrotip, Stufe 9, *duty cycle* 50 %, insgesamt 20 min) im Eisbad vollständig aufgeschlossen werden konnten. Abschließend wurde das Zelllysate 30 min bei 20000 rpm und 4 °C abzentrifugiert.

Aufschlußpuffer: 10 mM Tris
 150 mM NaCl
 5 mM EDTA, pH 8,0

3.5 *Proteinchemische Methoden*

3.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.5.1.1 *Colorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)*

Zu 200 µl des käuflichen Bradfordreagens BIO-ASSAY (Biorad, München) wurden 800 µl Wasser gegeben, gemischt und die Proteinprobe (0,5 bis 5 µg) hinzugefügt und erneut gemischt. Nach 5 min Inkubation wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm gemessen und mit einer Eichkurve (BSA in Wasser) verglichen.

3.5.1.2 *Bestimmung der Proteinkonzentration anhand des Absorptionskoeffizienten*

Zur Proteinbestimmung kann auch die hauptsächlich durch Tyrosine und Tryptophane hervorgerufene Absorption bei 280 nm herangezogen werden (Mach et al., 1992). Die Extinktion der Probe, welche im Bereich von 0,1 bis 1,0 liegen sollte, wird bei 280 nm bestimmt und die Proteinkonzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet:

$$E = \epsilon_{280\text{nm}} \cdot c \cdot d$$

c – gesuchte Konzentration

d – Schichtdicke der Küvette (cm)

ϵ_{280} – Extinktionskoeffizient bei 280 nm, (Gill & Von Hippel, 1989) aus der Anzahl von Tyrosinen, Tryptophanen und Cysteinen berechenbar.

3.5.2 Proteinfällung

Zur Beurteilung einer niedrig konzentrierten Proteinlösung in einer SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine zuvor nach der Methode von Wessel (Wessel & Flugge, 1984) gefällt, um das Auftragsvolumen zu verringern. 100 μ l einer Proteinlösung wurden in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 400 μ l Methanol versetzt. Nach dem Zentrifugieren (10 sec, 15000 rpm, 4 °C) wurden weitere 100 μ l Chloroform zugegeben, die Lösung gemischt und erneut zentrifugiert. Nach Zugabe von 300 μ l Wasser und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 1 min bei 12000 rpm abzentrifugiert. Die obere Phase wurde entfernt und die restliche Lösung mit 300 μ l Methanol vermischt. Nach Zentrifugation (60 sec, 12000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Proteinpellet getrocknet.

3.5.3 Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen

Zum Pufferwechsel wurden Proteinlösungen durch Gelfiltration (NAP-Säulen) entsalzt und anschließend für die Vorbereitung der Kristallisationsexperimente durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Verwendet wurden Zentrifugationskonzentratoren des Typs Centriprep (V = 15 ml) und Centricon (V = 2 ml) (Millipore, Eschborn). Die eingeeengten Proteinlösungen (7–10 mg/ml) wurden abschließend durch Filtration (0,22 μ m) mit einer Filtrationseinheit Ultrafree (Millipore, Eschborn) von Schwebstoffen befreit und bei 4 °C gelagert.

3.5.4 Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts wurde durch eine diskontinuierliche, denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erreicht (Laemmli et al., 1970). Die durch SDS aus dem Probenpuffer stark negativ geladenen Proteine (ca. 1,4 g SDS pro g Protein) werden unter den denaturierenden und reduzierenden Bedingungen in einem vernetzten Polyacrylamidgel durch ein elektrisches Feld ihrer Größe nach getrennt. Dabei ist die Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion ihres

Molekulargewichts. Dieser Zusammenhang kann zur Bestimmung der relativen Molekülmasse der Proteine genutzt werden.

Die SDS-PAGE wurde mit einem 5 %igen Sammelgel und einem 12 %igen Trenngel durchgeführt. Es wurden jeweils acht Gele (8,5 x 8 cm²) in einer Gelgießkammer (Eigenbau, MPI Martinsried) gegossen.

AA:	Acrylamid	40,0 % (w/v)
	Bisacrylamid	0,8 % (w/v)
Trenngelpuffer, 8x:	Tris/HCl, pH 8,8	3 M
	SDS	0,8 % (w/v)
Sammelgelpuffer, 8x:	Tris/HCl, pH 6,3	1,1 M
	SDS	0,8 % (w/v)
APS:	Ammoniumperoxodisulfat	10 % (w/v)

Die Trenngellösung wurde nach Zugabe von 100 µl TEMED und 100 µl (0,1 g/ml) APS in die vorbereitete Gelgießapparatur gegossen und mit wenig Isopropanol blasenfrei überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Alkoholschicht entfernt, das Sammelgel mit 100 µl TEMED und 100 µl (0,1 g/ml) APS versetzt und in den Gießstand eingefüllt. Die Kämme für zehn bis zwölf Geltaschen wurden luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt. Die ausgehärteten Gele wurden in Haushaltsfolie luftdicht verschlossen und bis zu drei Wochen bei 4 °C gelagert.

Für die Gelelektrophorese wurden die Proteinproben mit 10x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 96 °C inkubiert. Die Trennung der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung von 15 mA je Gellänge im SDS-Laufpuffer. Zur Molekulargewichtsbestimmung der getrennten Proteine wurde ein SDS-PAGE-Größenstandard (*low-range* SDS-Marker BioRad, München) mitgetrennt.

Auftragspuffer, 10x:	Tris/HCl, pH 6,8	100 mM
	Dithiothreitol	200 mM
	Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
	Glycerin	20 % (w/v)
Laufpuffer:	Tris/HCl, pH 8,3	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1 % (w/v)

Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt. Dazu wurden die Gele in Färbelösung in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt und

10 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurden sie in Entfärberlösung überführt, welche alle 2 h gewechselt wurde, bis der Hintergrund entfärbt war.

Färbelösung:	Coomassie Brilliant Blue R-250	0,1 % (w/v)
	Ethanol	25,0 % (v/v)
	Essigsäure	12,5 % (v/v)
Entfärberlösung:	Ethanol	25,0 % (v/v)
	Essigsäure	12,5 % (v/v)

3.5.5 Western-Blot und Detektion der Proteine auf der Membran

Durch ElektrobloTTing wurden Proteine elektrophoretisch aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Trägermembran übertragen und dort fixiert. Der Membrantransfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen wurde in einer Transblot-Transfer-Cell durchgeführt (Towbin et al., 1979). Die hydrophobe PVDF-Membran wurde zunächst 1 min mit Methanol benetzt und anschließend in ddH₂O gewaschen. Die Transfermembran wurde danach für weitere 5 min im Transferpuffer inkubiert. Der Aufbau des „*Blotting-Sandwiches*“ war wie folgt:

- 6 Lagen 3 MM-Filterpapier (Whatman, Maidstone, England) getränkt mit Anodenpuffer I (300 mM Tris, pH ~ 10,4; 20 % (v/v) Methanol)
- 3 Lagen 3 MM-Filterpapier getränkt mit Anodenpuffer II (25 mM Tris pH ~ 10; 20 % (v/v) Methanol)
- 1 Lage PVDF-Membran (Porendurchmesser 0,45 µm) getränkt mit 60 % (v/v) Methanol, mit Wasser gewaschen
- das Gel
- 6 Lagen 3 MM-Filterpapier getränkt mit Kathodenpuffer (25 mM Tris pH ~ 10; 40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % (v/v) Methanol)

Die Proteine wurden durch Elektrophorese für 1,5 h bei einem Stromfluß von 50 mA (ca. 0,8 mA/cm² Gelfläche) auf die PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde 2 min in Membranfärbelösung gefärbt und zur Entfärbung 5 min in Membranentfärber inkubiert.

Membranfärbelösung:	50 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure
	0,1 % (v/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
Membranentfärber:	30 % (v/v) Methanol
	7 % (v/v) Essigsäure

3.5.6 N-terminale Sequenzierung nach Edman

Nach der Methode des *EDMAN*-Abbaus (Edman & Henschen, 1975) wird die N-terminale Aminosäure mit Phenylisothiocyanat umgesetzt und dabei als Phenylthiohydantoin-Derivat abgespalten. Nach einer HPLC-Auftrennung wird die Aminosäure durch Vergleich eines mitgetrennten Standard-Aminosäuregemischs identifiziert.

Die durch Elektroblothing (siehe 3.5.5) an PVDF-Membranen fixierten Proteine wurden mit Coomassie Brilliant R Blue G-250 gefärbt und einer N-terminalen Sequenzanalyse zugeführt. Zur Sequenzanalyse gereinigter rekombinanter Proteine wurden 60 bis 100 µg Protein in einem Gesamtvolumen von maximal 100 µl auf eine mit 10 µl Methanol vorbehandelte ProSorb PVDF-Membran (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA) pipettiert und dort immobilisiert.

Die anschließende Sequenzierung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Mann am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried auf einem Applied Biosystems Sequenzierer 470A durchgeführt.

3.5.7 Dynamische Lichtstreuungsexperimente (*Dynamic Light Scattering, DLS*)

Für dynamische Lichtstreuexperimente wurde ein „DynaPro“ *Light Scattering* System (Protein Solutions, Charlottesville, USA) verwendet. Das Protein wurde zu einer Konzentration von etwa 1 mg/ml im jeweiligen Puffer verdünnt und vor Meßbeginn das Probenvolumen (20 µl) filtriert (0,1 µm Porengröße), um Aggregate und Staubpartikel zu entfernen. Die Auswertung der Meßdaten erfolgte mit dem Programmen Dynamics und DynaLS (Protein Solutions, Charlottesville, USA).

3.5.8 Proteinpräparation

3.5.8.1 *Proteinreinigung der Peptidase V*

Das abzentrifugierte Zellysat wurde im Verhältnis 100 ml Lysat auf 200 ml Auftragspuffer verdünnt und durch eine PVDF-Membran (Porendurchmesser 0,22 µm) filtriert. An einer FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) wurde das verdünnte Lysat bei RT mit einer Flußrate von 2 ml/min auf eine DE52 Säule (Whatman, Maidstone,

England) aufgetragen. Danach wurde die Säule mit Auftragspuffer (10 mM Natriumcitrat, pH 6,0) gewaschen, bis kein Protein mehr von der Säule eluierte. In einem linearen Gradienten von 0 - 450 mM NaCl konnte PepV bei ~300 mM von der Säule eluiert werden. Die PepV enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und über Nacht gegen 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 bei 4 °C dialysiert. Als nächstes wurde das Protein auf eine Resource Q (6 ml, Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Bei einer Flußrate von 2 ml/min und einem Gradienten von 0 - 1 M NaCl eluierte PepV bei 400 mM. Das eluierte Protein wurde mit einem Ultrafree-Konzentrator (cutoff 3 oder 5 kDa; Millipore, Eschborn) bis ~30 mg/ml Protein eingengt und 2 ml des konzentrierten Proteins auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierten High Load Superdex TM75 26/60 (Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Bei einer Flußrate von 3,5 ml/min eluierte das Protein und wurde fraktioniert gesammelt. Die vereinigten Fraktionen von PepV wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.5.8.2 *Proteinreinigung der Isoaspartyl Dipeptidase*

Die Reinigung der Isoaspartyl Dipeptidase erfolgte mittels eines dreistufigen Chromatographieprotokolls. Die Zellen wurden zunächst abzentrifugiert, mit dem entsprechenden Aufschlußpuffer und anschließender Ultraschallbehandlung lysiert. Das Rohlysat wurde dann zunächst über Nacht gegen 10 mM Tris, pH 8,0 dialysiert und anschließend auf einen Ionenaustauscher DE52 aufgetragen. Die Elution von Isoaspartyl Dipeptidase erfolgte mit 500 ml eines Gradienten von 0 – 500 mM NaCl in 10 mM Tris, pH 8,0 bei ca. 300 mM NaCl. In dem zweiten Chromatographieschritt, der hydrophoben Interaktionschromatographie, wurde das Protein aufgrund seiner hydrophoben Wechselwirkung mit der Gelmatrix getrennt. Hierfür wurde eine Phenyl Sepharose High Performance (10 ml, Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) verwendet. Diese wurde zunächst mit 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 10 mM Tris, pH 8,0 äquilibriert. Weiterhin wurde die Ammoniumsulfatkonzentration in den Isoaspartyl Dipeptidase enthaltenden Fraktionen von 0 M auf 1 M durch Zupipettieren von 4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erhöht, anschließend abzentrifugiert und auf die Säule aufgetragen.

Im letzten Schritt wurde das Protein durch Gelfiltrationschromatographie mittels einer High Load Superdex TM75 26/60 (Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) nach Größe getrennt. Der Ablauf der Proteinreinigung wurde durch Verfolgen der Proteinabsorption bei 280 nm und durch SDS-PAGE Gele kontrolliert. Die Proteinlösungen

wurden gegebenenfalls über Ultrafiltration an semipermeablen Membranen aufkonzentriert. Je nach Volumen wurden dazu Centricon-, Centriprep-Gefäße oder Amicon-Zellen verwendet.

3.6 Kristallographische Methoden

3.6.1 Kristallisation

Alle Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode durchgeführt, bei der es zu einer Gleichgewichtseinstellung zwischen zwei über einen Gasraum verbundenen Lösungen kommt. Die damit verbundene langsame Änderung der Präzipitans- und Proteinkonzentrationen kann zur Kristallisation genutzt werden (Übersicht: McPherson, 1982). Die Kristallisationsansätze erfolgten in Kristallisationsplatten (CrysChem, Charles Supper Company) mit sitzenden Tropfen. Dabei wurden verschiedene Volumina Proteinlösung in den CrysChem-Platten ausgetestet. Zu dem Proteintropfen wurden verschiedene Volumina Reservoirlösung gegeben und vorsichtig miteinander vermischt. Das Volumen der Reservoirlösung betrug 0,4 ml. Es wurde mit einer Vielzahl von Kristallisationspuffern gearbeitet, um ein möglichst großes Spektrum an Fällungsmitteln (PEG, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Phosphat, Citrat usw.) und pH-Werten (4,0 – 10,0) abzudecken. Weiterhin wurden keimbildende Bedingungen (Mikrokristalle, verwachsene Kristalle, Sphaerolyten) durch gezielte Veränderung einzelner Parameter (pH, Additive, Protein-, Präzipitanskonzentration etc.) optimiert. Beim Ausbleiben von Hinweisen von geeigneten Bedingungen wurde versucht, die Reinigung des Proteins weiter zu verbessern.

3.6.2 Montieren der Kristalle

Für Messung bei RT wurden die Kristalle mit einem geeigneten Erntepuffer (Reservoirlösung) überschichtet und in silikonisierten Quarzkapillaren (1,0 mm Ø, Mark-Röhrchen, Berlin) montiert. Zur Silikonisierung von Glaskapillaren wurde eine 0,5 %ige Silikon-Imprägniermittellösung (Carl Roth KG, Chemische Fabrik, Karlsruhe) erstellt. Die Kapillaren wurden mehrmals mit der Imprägnierlösung gespült, die anschließend für 15 - 20 min bei 300 °C eingebrannt wurde.

Kristalle, die groß genug erschienen, wurden aus dem Kristallansatz vorsichtig in diese hydrophoben Kapillaren gesogen und mit ausgezogenen Pasteurpipetten und dünnen

Filterpapierstreifen bis auf einen kleinen Rest um den Kristall herum von der Mutterlauge getrennt. Die Kapillare wurde mit etwas Präzipitanslösung gefüllt, ohne dabei den Kristall zu erreichen, auf beiden Seiten mit Glaswachs (Harvard, Berlin) verschlossen, auf einen Kapillarteller aufgesetzt und mit einem Goniometerkopf (3 Translations- und 2 Rotationsschritten) auf einem Einkreisdiffraktometer befestigt.

Die Justierung des Kristalls in dem Röntgenstrahl erfolgte mit Hilfe des Goniometerkopfs und eines Teleskoparms. Für die Messung bei 100 K an einer Cryostat-Anlage (Oxford Cryosystems, Oxford, England) wurden die ProMMP-1, PepV bzw. IadA Kristalle in 30 % Glycerin, 10 % Glycerin bzw. 20 % PEG 300 inkubiert, um durch das zusätzliche Cryoprotektans die Bildung von Eiskristallen zu verhindern. Die Kristalle wurden dann in *Cryo-Loops* (Hampton Research, Laguna Hills, USA) im Strahlengang montiert.

Diffraktionsdaten wurden auf einem *image plate* Detektor (MAR Research, Hamburg) unter Verwendung monochromatischer CuK α -Strahlung (Graphit-Monochromator, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) von einem rotierenden Drehanoden-Röntgenstrahlgenerator RU200 (Rigaku, Tokio, Japan) gesammelt.

3.6.3 Datensammlung und –reduktion

Zur Messung von MAD-Daten wurden sowohl die Kristalle von ProMMP-1, PepV als auch die von IadA in Schlaufen aus Zahnseide (Hampton Research) geangelt, in Cryopuffer eingelegt (siehe oben) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Detektiert wurde bei PepV mit einer MAR Research *image plate* 345 mm als Detektor, bei IadA und ProMMP-1 mit einem 135 mm MAR Research CCD-Detektor. Die aufgenommenen Diffraktionsbilder wurden mittels DENZO (Otwinowski & Minor, 1993) bzw. MOSFLM, V. 6.01 (Leslie, 1990) indiziert und integriert. Die Reduktion der Daten erfolgte mit SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1993) und TRUNCATE (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

3.6.4 Phasierung

Eine Verbesserung der Phasen läßt sich durch Modifikation der Elektronendichte erzielen. Eine Methode ist das sogenannte *solvent flattening*. Dabei nützt man die Tatsache aus, daß es in Proteinkristallen getrennte Bereiche von Protein und Lösungsmittel gibt. Diese Bereiche können nach einem Algorithmus von Wang (Wang, 1985) bestimmt werden und die

Elektronendichte des Lösungsmittelbereichs wird auf null gesetzt. Eine Erweiterung des *solvent flattening* stellt das *solvent flipping* dar (Abrahams & Leslie, 1996).

Die Zinkpositionen wurden mit RSPS (CCP4: Collaborative Computational Project Number 4, 1994) bestimmt und zur Phasierung mit MLPHARE (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) benutzt. Die resultierenden Phasen wurden durch Elektronendichtemodifikation mit dem Programm DM (Cowtan, 1994) weiter verbessert.

3.6.5 Modellbau und Verfeinerung

Atommodelle wurden mit dem Programm MAIN (Turk, 1996) in die Elektronendichtekarten eingepaßt. Hierbei wurde die Realraum-Verfeinerungsoption benutzt, um eine gute Anpassung an die Elektronendichte zu erhalten.

Verfeinert wurde mit CNS (Brünger et al., 1998) unter Anwendung des *maximum-likelihood-targets* unter Berücksichtigung der experimentellen Hendrickson-Lattman-Koeffizienten gegen beobachtete Strukturfaktoren, wobei 5 % als TEST-Satz zur Ermittlung des freien R-Faktors dienen. Es wurde eine globale, anisotrope B-Faktor Korrektur sowie eine Lösungsmittelkorrektur angewandt. Positionelle Verfeinerung und *simulated-annealing* (SA) alternierten mit visueller Inspektion der Elektronendichte und manueller Intervention bis zu einem Absinken des R-Faktors unter 30 %. Danach wurde Lösungsmittel automatisch mit CNS gebaut.

3.6.6 Modellanalyse und graphische Darstellung

Abweichungen der Bindungslängen und –winkel von den Zielwerten wurden mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) überprüft. Überlagerungen und *least-square-fits* von Koordinaten wurden mit TOP3D (CCP4: Collaborative Computational Project Number 4, 1994) durchgeführt.

Die Darstellung von Modellen geschah mit den Programmen MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), BOBSCRIPT (Esnouf, 1997), und RASTER3D (Merritt & Murphy, 1994). Moleküloberflächen wurden mit dem Programm GRASP berechnet und dargestellt (Nicholls et al., 1993).

Die graphische Darstellung von Sequenzvergleichen geschah mit dem Programm ALSCRIPT (Barton, 1993). Bilder und Schematazeichnungen wurden mit CorelDraw9

(Corel Corporation Limited, 1998) und PHOTOSHOP (Adobe System Inc., USA) bearbeitet und erstellt.

4. Ergebnisse

4.1 Kristallstruktur der ProMMP-1

4.1.1 Kristallisation der ProMMP-1

Kristallisationsbedingungen für ProMMP-1 wurden durch *sitting drop* Dampfdiffusionsexperimente bei 18 °C gefunden. Eine geeignete Reservoirolösung wurde mit Hilfe von *incomplete factorial screens* (Carter, 1979) identifiziert und schließlich zu 1,5 M Li₂SO₄ und 0,1 M Hepes, pH 7,4 verfeinert. 2 µl Proteinlösung (30 mg/ml in 50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 mM CaCl₂) wurden mit 2 µl Reservoirolösung gemischt. Kristalle der Dimension 0,3 x 0,3 x 0,4 mm³ wuchsen innerhalb von vier Wochen (Abbildung 4-1). Da diese Kristalle nur bis 6 Å streuten, wurden Kristallansätze bei 4 °C angesetzt, die nach ca. acht Monaten Kristalle lieferten, die bis 3 Å streuten.

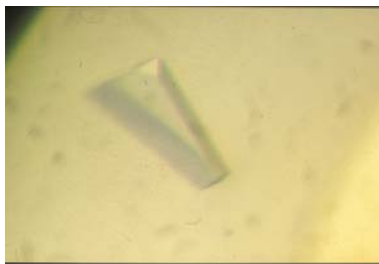


Abbildung 4-1: Kristall der ProMMP-1. Der Kristall wurde durch Dampfdiffusion gegen 0,1 M Li₂SO₄ und 0,1 M Hepes, pH 7,4 erhalten. Eine Größe von 0,3 x 0,3 x 0,4 mm³ hatte der Kristall nach acht Monaten erreicht.

4.1.2 Molekulargewichtsbestimmung der ProMMP-1

Um das Molekulargewicht des gereinigten Proteins zu bestimmen, wurde eine analytische Gelfiltration mit einer Superdex S-200 (0,5 ml/min, Volumen 200 µl) an einem SMART System durchgeführt. Die Retentionszeit der ProMMP-1 lag ungefähr in Übereinstimmung mit der des 158 kDa Eichproteins. Das Ergebnis dieses Experiments zeigt, daß das Protein in 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 10 mM CaCl₂ bei pH 7,5 möglicherweise als Dimer von ca. 150 kDa vorliegt. Die Diskrepanz zwischen der beobachteten und erwarteten Molekularmasse in der Gelfiltration (Trimer vs. Dimer) läßt sich durch die langgestreckte Form des Moleküls erklären, die zu einem höheren effektiven Radius in der Gelpermeationschromatographie führt.

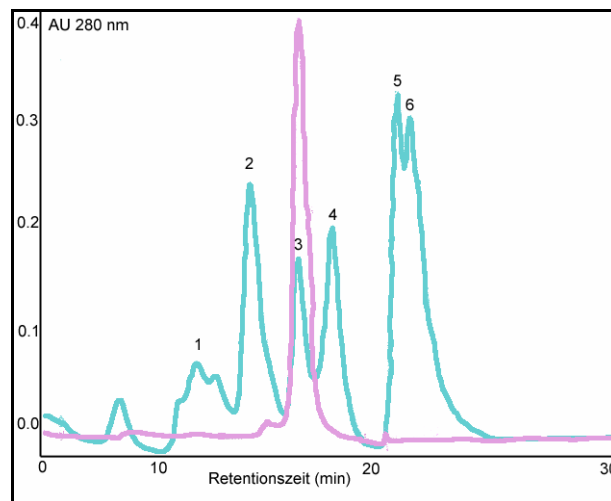


Abbildung 4-2: Analytische Gelfiltration zur Abschätzung des Molekulargewichts der ProMMP-1. Die analytische Gelfiltration wurde mit einer Superdex S-200 (0,5 ml/min) an einem SMART System mit einer Flußrate von 0,5 ml/min durchgeführt (50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 mM CaCl₂). Der Peak der ProMMP-1 ist in purpur dargestellt. Eichproteine: Peak 1: Ausschlußvolumen; Peak 2: Thyroglobulin (670 kDa); Peak 3: IgG (158 kDa); Peak 4: Ovalbumin (44 kDa); Peak 5: Myoglobin (17 kDa) und Peak 6: Vitamin B₁₂ (1,35 kDa).

4.1.3 Datenaufnahme

Ein Datensatz bis 3,6 Å Auflösung konnte unter dieser Bedingung aufgenommen werden. Nach dem Einfrieren eines Kristalls konnte an der *beamline* BW6 am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY, Hamburg) ein vollständiger Datensatz mit 2,2 Å Auflösung mit einem MAR Research CCD-Detektor aufgenommen werden (Tabelle 4-1; Abbildung 4-3).

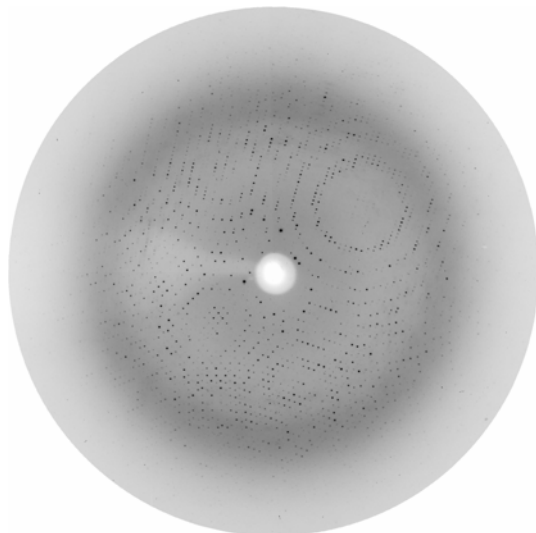


Abbildung 4-3: Diffractionsbild eines ProMMP-1-Kristalls. Das Diffractionsbild wurde an der *beamline* BW6 (Deutsches Elektronensynchrotron DESY, Hamburg) bei $\lambda = 1,28200 \text{ \AA}$ mit einem MAR Research CCD-Detektor aufgenommen. Der Drehwinkel betrug $0,5^\circ$. Der Plattenrand entspricht einer Auflösung von $2,2 \text{ \AA}$.

Die Auswertung der Diffraktionsdaten ergab ein tetragonales Kristallgitter mit Zellkonstanten $a = b = 142,746 \text{ \AA}$, $c = 295,308 \text{ \AA}$. Da keinerlei systematische Auslöschungen zu beobachten waren, wurde das Vorhandensein einer Schraubenachse ausgeschlossen, und die Raumgruppe zu $I422$ bestimmt. Das Verhältnis von Zellvolumen zum Molekulargewicht des Proteins betrug bei zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit $3,44 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, woraus ein Solvensgehalt des Proteinkristalls von 64 % resultierte.

Tabelle 4-1: Datensammlung und Statistik der Phasierung

Datensammlung	f' -Minimum ($\lambda 2$)	f'' -Maximum ($\lambda 1$)	<i>remote point</i> ($\lambda 3$)
Wellenlänge (\AA)	1,28200	1,28380	1,0500
Auflösung (\AA)	20,0 – 2,01	20,0 – 2,01	20,0 – 2,01
Multiplizität	5,46	5,46	5,46
Zahl der Reflexe	113629	115602	147278
Vollständigkeit (%)	99,8	99,7	99,8
(äußerste Schale) (%)	99,8	99,7	99,9
(2.44-2.40) \AA			
I/σ	27,26	26,75	28,14
R_{sym}^a (%)	7,0	9,5	7,5

$$^a R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I \rangle_{hkl}|}{\sum | \langle I \rangle_{hkl} |}$$

4.1.4 Phasenbestimmung, Modellbau und Strukturverfeinerung

Die Diffraktionsdaten der ProMMP-1 Kristalle wurden mit der Methode der multiplen anomalen Dispersion (MAD) phasiert. Es wurden drei verschiedene Datensätze (Tabelle 4-1) bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Um die Vollständigkeit der *FRIEDEL*-Paare zu gewährleisten, wurde jeder Datensatz in zwei um 180° versetzte Sektoren von jeweils 65° bei einer Rotation von $0,5^\circ$ pro Bild aufgenommen. Die Lokalisierung der zwei Zink-Lagen erfolgte mit dem Programm RSPS (Knight, 2000). Mit dem Programm MLPHARE (Otwinowski, 1991) konnten die Lagen unter Einbeziehung der anomalen Daten verfeinert und experimentelle Phasen bei $2,2 \text{ \AA}$ Auflösung mit einer *figure of merit* von $0,58$ berechnet werden. Es folgte eine Optimierung der Phasen sowie ein *solvent flattening* mit mehreren Zyklen mit dem Programm DM (Cowtan, 1994).

In der asymmetrischen Einheit befinden sich zwei Moleküle, die die Aminosäuren 30 – 466 umfassen. Das Strukturmodell wurde bei einer Auflösung von $2,2 \text{ \AA}$ zu einem R-Faktor von 22,5 % und einem freien R-Faktor von 25,9 % verfeinert.

Tabelle 4-2: Verfeinerungsstatistik der ProMMP-1	
Raumgruppe	1422
Zellkonstanten (Å)	a = b = 142,746, c = 295,308
Wassergehalt (%)	64
Matthewskoeffizient (Å ³ /Da)	3,44
Anzahl der Reste in der asymmetrischen Einheit	830
Proteinatome	6679
Anzahl der Wassermoleküle	498
Anzahl der Zinkionen	4
Anzahl der Calciumionen	8
B-Faktoren	
Proteinatome (Å ²)	36,7
Lösungsmittelatome (Å ²)	57,7
Zinkionen (Å ²)	46,1
Calciumionen (Å ²)	53,6
Auflösungsbereich (Å)	20,0 – 2,2
¹ R-Faktor (%)	22,5
² Freier R-Faktor (%)	25,9
R.m.s. Abweichungen von Idealwerten	
Bindungslängen	0,01 Å
Bindungswinkel	1,14°
$^1 \text{ R-Faktor} = \frac{\sum \ F_{obs} - k F_{calc} \ }{\sum F_{obs} }$	
² Der freie R-Faktor R _{free} wurde mit 10 % der gemessenen Daten berechnet, die nicht für die Verfeinerung verwendet wurden.	

In 2F_o-F_c-Dichten wurde durchgängige Elektronendichte für die gesamte Hauptkette erhalten, außer für zehn Reste am N-Terminus (20 – 29), die Reste 99 – 106 sowie drei Reste am C-Terminus (467 – 469), die scheinbar sehr flexibel sind. Die stereochemischen Parameter des verfeinerten Modells weisen nur geringe Abweichungen von Standardwerten (Engh & Huber, 1991) auf (Tabelle 4-2). Alle dihedralen Hauptkettenwinkel ϕ und ψ , abgesehen von einigen der variableren Glycinreste, liegen in energetisch günstigen Bereichen des Ramachandran-Plots, 89,8 % davon im günstigsten Bereich (Ramachandran & Sasisekharan, 1968).

4.1.5 Strukturbeschreibung der ProMMP-1

Das Monomer der ProMMP-1 besteht aus drei Domänen (Abbildung 4-4): der Prodomäne (20 – 99), der katalytischen Domäne (100 – 270) und der Hämapexin-ähnlichen Domäne (290 – 469), die durch einen funktionell wichtigen Linker (262 – 277) zusammengehalten werden. Der durchschnittliche B-Faktor für das gesamte Protein zusammen mit den 498 Wassermolekülen liegt bei $38,6 \text{ \AA}^2$, $32,8 \text{ \AA}^2$ für die Prodomäne, $34,3 \text{ \AA}^2$ für die katalytische Domäne und $42,8 \text{ \AA}^2$ für die Hämapexin-ähnliche Domäne (PEX-Domäne).

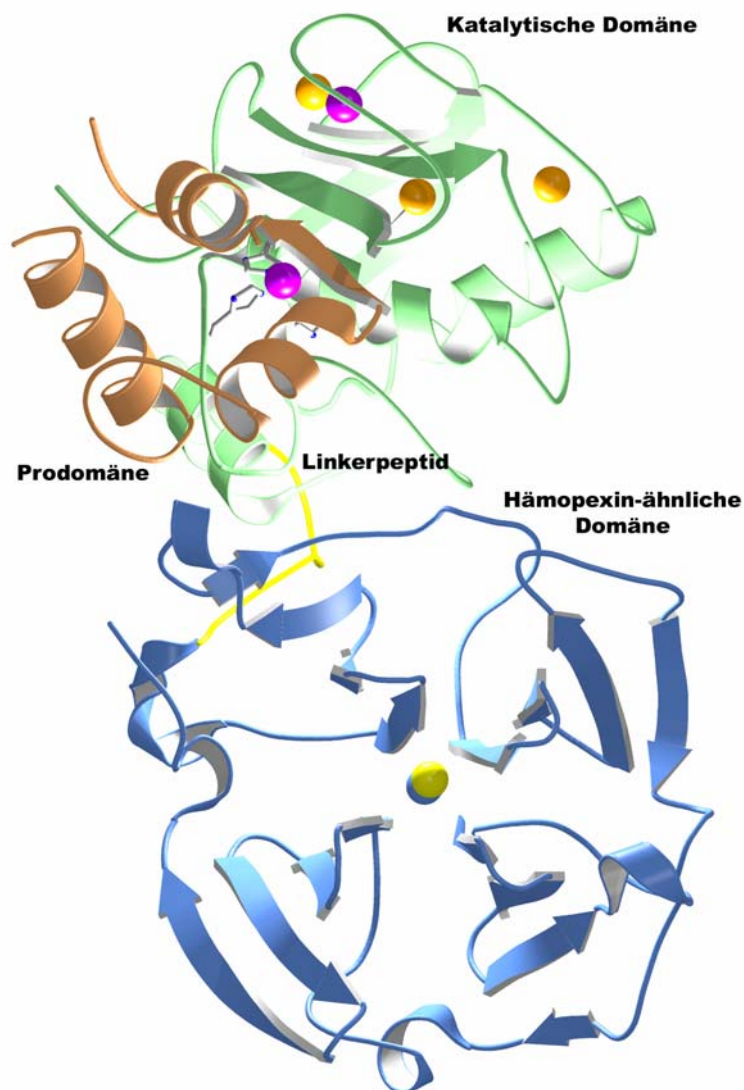


Abbildung 4-4: Ribbondarstellung der ProMMP-1. Die Hämapexin-ähnliche Domäne ist in blau, die Prodomäne in orange und die katalytische Domäne in grün dargestellt. Die Calcium-, Zink-, Natrium- und Chloridionen sind in orange, purpur, gelb und blau gekennzeichnet.

In der Kristallstruktur von ProMMP-1 ist die katalytische Domäne ab Aminosäure 107 in der Elektronendichte sichtbar. Die Struktur der katalytischen Domäne von ProMMP-1 (wie auch anderer MMPs) hat die Form eines abgeflachten Ellipsoids mit der Ausdehnung von ca. 40 Å. Sie wird durch eine Einkerbung, die sich über die komplette Front des Enzyms hinzieht, die sogenannte *active-site cleft*, in zwei Subdomänen unterteilt. In der Standardorientierung (Abbildung 4-5) erstreckt sich diese *active-site cleft* horizontal und zeigt auf den Betrachter. Ein Substratpeptid bindet von links (N-Terminus) nach rechts (C-Terminus).

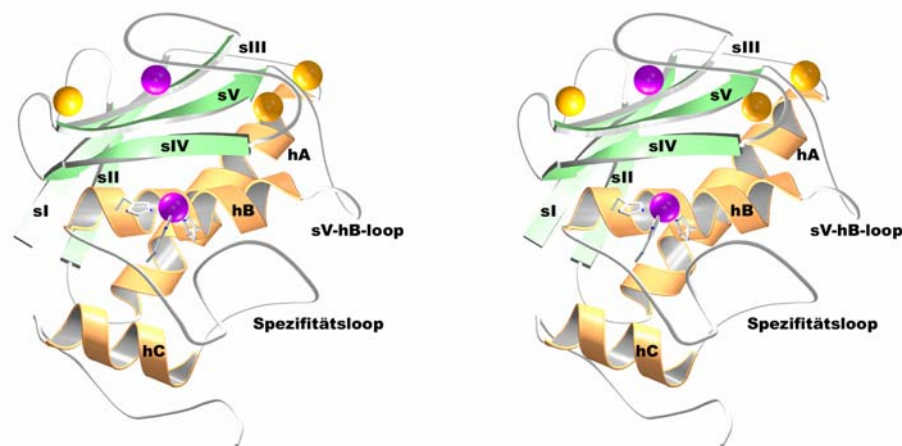


Abbildung 4-5: Ribbondarstellung der katalytische Domäne von ProMMP-1. Die Liganden des katalytischen Zinks (His218, His222 und His228) sind als Stäbchenmodell gekennzeichnet. Die Zink- und Calciumionen sind als Kugeln dargestellt (purpur bzw. orange). Die Protease ist in Standard-Orientierung gezeigt.

Die obere Subdomäne wird dominiert von einem fünfsträngigen stark gebogenem β -Faltblatt, das auf der Oberseite von drei Oberflächenloops flankiert wird und auf der unteren Seite mit zwei α -Helices ein hydrophobes Zentrum umfaßt. Vier der fünf β -Stränge liegen parallel zueinander, ausgenommen ist der β -Strang sIV, der antiparallel ausgerichtet ist und einen Teil der oberen *active-site cleft* Begrenzung darstellt. Zwischen Strang sIII und sIV befindet sich der sogenannte *S-loop*, der mit dem β -Faltblatt durch das strukturelle Zinkion und einem der drei Calciumionen interagiert. Das Ende des *S-loops* nimmt an der Begrenzung des oberen Teils der *active-site cleft* teil (*bulge-edge*). Die *loop*-Segmente, die die β -Stränge sIV und sV, sowie sII und sIII verbinden, komplexieren „sandwich“-artig das zweite Calciumion. Das dritte Calciumion ist zwischen dem *loop*, der den Strang sI und die Helix hA verbindet, sowie dem β -Strang sV gebunden. Die Peptidkette verläuft nach Strang sV in einen Oberflächenloop und endet dann in die lange horizontale *active-site* Helix hB. In dieser Helix sind zwei der

drei Histidine lokalisiert (His218 und His222), die das katalytische Zinkion koordinieren. An das erste Histidin schließt das katalytische Glutamat Glu219 an. Mit Gly225 endet die Helix hB, und die Peptidkette folgt dann einem Bogen nach unten, wo sich der dritte Zinkligand, nämlich His228 befindet, und bildet einen weiteren Bogen, der einer weiten Spirale ähnelt und bei Met236 endet (*met-turn*). Dieses Strukturelement war auch namensgebend für die ganze Familie der Metzinkine. Die Peptidkette begrenzt im folgenden mit der für MMPs typischen Sequenz Pro-X-Tyr die rechte untere Seite der *active-site cleft*. Bei ProMMP-1 lautet die Sequenz Pro238-Ser-Tyr. An diese Region schließt sich ein langer *loop* mit einer flexiblen Konformation an, der die S1'-Spezifitätstasche nach unten begrenzt, der sogenannte *specificity loop*. Die nachfolgende Helix hC vervollständigt die Struktur der katalytischen Domäne. Nach Gly261 biegt die Kette in entgegengesetzte Richtung ab, so daß das folgende Linkerpeptid fast gestreckt zur PEX-Domäne verläuft.

Insgesamt drei Calciumionen sind in der katalytischen Domäne gebunden. Das erste Calciumion (Ca1), das sich zwischen dem zweiten Teil des *S-loops* und dem β -Faltblatt befindet, wird von den Carbonylsauerstoffen von Gly176, Gly178 und Asp180 sowie von je einem Sauerstoff der Carboxylgruppen von Asp198, Asp195 und Glu201 in einem fast idealen Oktaeder gebunden. Die drei C α -Carbonylgruppenbindungsängen variieren mit 2,20 – 2,36 Å weniger als die Bindungsängen der Carboxylsauerstoffe zum Calciumion (2,06 – 2,51 Å). Das zweite Calciumion (Ca2) ist ebenfalls oktaedrisch durch sechs Sauerstoffatome koordiniert, nämlich drei Carbonylgruppen (Asp158, Gly192, Gly190), durch Asp194 O δ 1 und zwei Wassermoleküle. Das dritte Calciumion (Ca3) wird durch zwei Carbonylgruppen (Glu199 und Glu201), sowie durch O ϵ 1 von Glu199 und O δ 1 und O δ 2 von Asp124 (bidental) und ein Wassermolekül koordiniert. Somit ist das dritte Calciumion ebenfalls von sechs Liganden umgeben.

Die Prodomäne bildet eine kleine globuläre Domäne mit ca. 20 Å Durchmesser, die im engen Kontakt sowohl mit der katalytischen als auch der Hämopexin-ähnlichen Domäne steht. Die Prodomäne besitzt ein eiförmiges Profil und steht mit der abgerundeten Seite im Kontakt mit der katalytischen Domäne. Die Sekundärstruktur der Prodomäne setzt sich aus einem Cluster von drei α -Helices zusammen, die senkrecht zueinander liegen und einem Segment, das diese mit der katalytischen Domäne verbindet und auf Höhe der Helix h3 in das Aktivzentrum interkaliert (Abbildung 4-6).

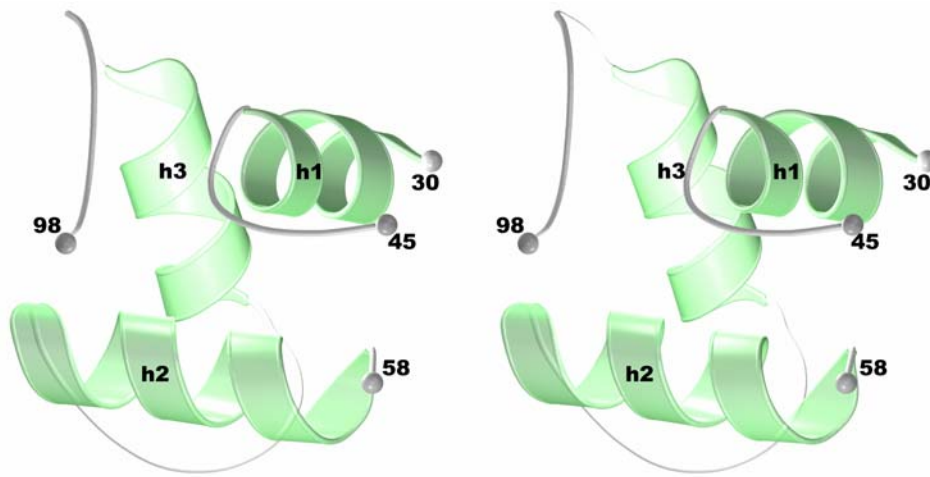


Abbildung 4-6: Stereodarstellung der Prodomäne von ProMMP-1.

Im Zymogen bindet ein ungepaartes Cystein der Prodomäne an das Zink im aktiven Zentrum. Dadurch ist die proteolytische Aktivität der ProMMP-1 blockiert, da eine Wechselwirkung mit dem für die katalytische Aktivität notwendigen Wassermolekül nicht möglich ist und die Substratbindestellen durch die Prodomäne blockiert sind. Die ersten zehn N-terminalen Reste der Prodomäne von ProMMP-1 sind ungeordnet, die definierte Region beginnt mit Rest Asp30, der ersten Aminosäure von Helix h1.

Die Prodomäne wird durch hydrophobe Interaktionen sowie Wasserstoffbrücken stabilisiert. Helix h1 wird durch einen vorwiegend ungeordneten Oberflächen/*loop* mit der zweiten α -Helix (h2) verknüpft. Der zweite *loop* (Phe71-Phe81) wird durch zwei interne Wasserstoffbrücken stabilisiert, und wird im Zuge der Aktivierung gespalten (Nagase et al., 1990), und verbindet Helix h2 mit Helix h3. Dieser *loop* ist wahrscheinlich für die Stabilität des Proenzym verantwortlich, da er hydrophobe Seitenketten beinhaltet, die sowohl das Aktivzentrum wie auch die *cystein-switch* Region vom Lösungsmittel abschirmen (Morgunova et al., 1999). In dem Segment nach Helix h3 ist das hoch konservierte Pro90 lokalisiert, welches einen Knick ermöglicht und so das nachfolgende Peptid Arg91-Cys-Gly-Val-Pro-Asp96 in die *active-site cleft* einbiegen läßt. Dieser Bereich der Prodomäne (Arg91-Cys92-Gly93 und Asp96 sind hoch konserviert) bindet in die S2-S3'-Substratbindungstaschen (einschließlich Val97), jedoch in entgegengesetzter Orientierung wie ein Substrat. Ab dem konserviertem Valin entfernt sich die Peptidkette von der katalytischen Domäne und ist bis auf Ala98 gut in der Dichte definiert. Die X99-/Tyr100 Spaltstelle und der sogenannte *rocker arm* mit dem hoch konservierten Pro107 sind in der vorliegenden Struktur wahrscheinlich zu mobil oder nehmen alternative Konformationen ein und sind somit nicht sichtbar. Eine nennenswerte Spaltung in diesem Bereich konnte durch

SDS-PAGE nicht bestätigt werden. Stabilisiert wird der *loop*, der das ungepaarte Cystein trägt durch die Salzbrücke Arg91-Asp96 und fünf Wasserstoffbrücken, die dieser in der *active-site groove* mit zwei relativ parallelen Regionen (Gly179-Ala182 und Pro238-Tyr240) ausbildet (Abbildung 4-7).

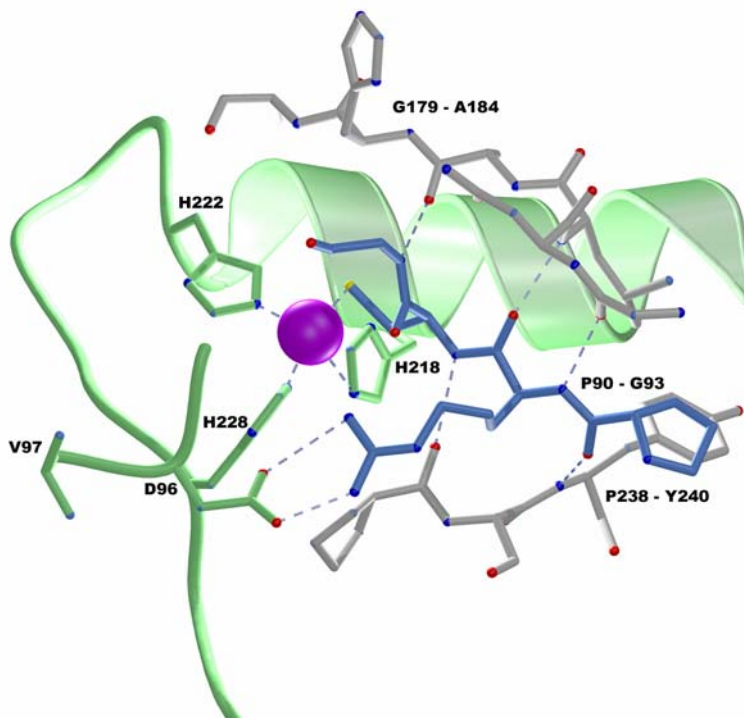


Abbildung 4-7: Ribbondarstellung der *active-site cleft* von ProMMP-1. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als blaue Linien gekennzeichnet. Die Kohlenstoffatome der Prodomäne sind in blau dargestellt, die der katalytischen Domäne in grau und grün.

Die Salzbrücke zwischen Asp96 und Arg91 wird zudem durch die Seitenketten von Tyr37, Tyr41 und Tyr42 eingepackt. Dieses strukturelle Motiv zeigt eine gewisse Ähnlichkeit zu der N-terminalen Domäne der D-alanyl-D-alanyl-spaltenden Carboxypeptidase aus *Streptomyces albus* (Dideberg et al., 1982). Ein Vergleich der Prodomänen von ProMMP-2 (Morgunova et al., 1999), ProMMP-9 (Elkins et al., 2002), ProMMP-3 (Becker et al., 1995) und ProMMP-1 zeigt, daß das zentrale Peptid Pro90-Asp96 bei allen gleich lokalisiert ist (Abbildung 4-8).

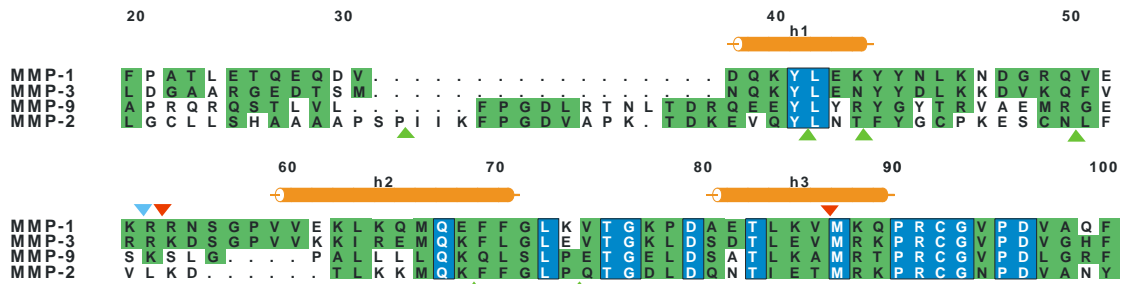


Abbildung 4-8: Sequenzalignment der ProMMP-1, ProMMP-2, ProMMP-3 und ProMMP-9. Die α -Helices (Zylinder; orange) sind für ProMMP-1 dargestellt. Die Aktivierungsspaltstellen von ProMMP-1 sind als rote, für ProMMP-3 als blaue und für ProMMP-2 als grüne Dreiecke gekennzeichnet.

Die helikalen Regionen sind bei allen vier Enzymen ähnlich, während die *loop* Regionen sich deutlich unterscheiden. Die Peptidregionen, die im Zuge der Aktivierung gespalten werden, sind in diesen *loop* Regionen lokalisiert (Nagase et al., 1990; Bergmann et al., 1995). Die Aktivierungsspaltstellen von ProMMP-1, -2 und -3 sind in Abbildung 4-8 eingezeichnet.

Das katalytische Zink wird durch drei Imidazol-Ne ϵ 2-Atome von His218, His222 und His228 gebunden. Den vierten Liganden stellt die S γ -Seitenkette von Cys92 dar, welche aus der Prodomäne herausragt (Abbildung 4-9).

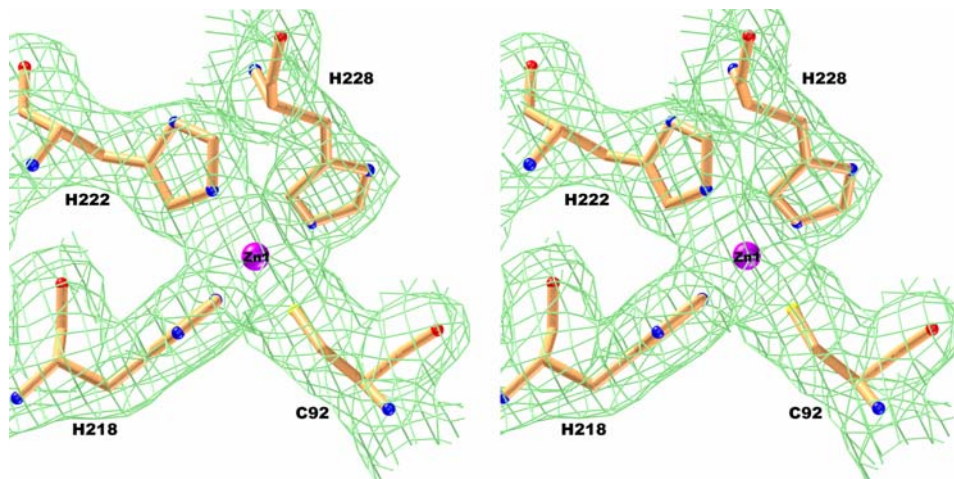


Abbildung 4-9: 2F $_o$ -F $_c$ -Elektronendichte um die Koordinationssphäre des katalytischen Zinkions (konturiert bei 1 σ).

Ein weiteres strukturelles Zink wird ebenfalls von drei Histidin-Liganden koordiniert. His168 (2,07 Å) befindet sich im *loop*, der die β -Stränge β 3 und β 4 verbindet, His183 (2,03 Å) und His196 (2,14 Å) befinden sich auf den benachbarten Strängen β 4 und β 5. Das zweite Zink

wird somit tetraedrisch von einem N δ 1- und zwei N ϵ 2-Imidazol-Stickstoffen von His196, His168 und His183 sowie vom O δ 1-Atom der Asp170 Seitengruppe koordiniert.

Die PEX-Domäne nimmt an der Substraterkennung teil und ist somit für die Substratspezifität mitverantwortlich. Besonders gut untersucht ist dies bei den Kollagenasen, in denen der Abbau von fibrillärem, tripelhelikalem Kollagen von der PEX-Domäne abhängig ist (Murphy & Knäuper, 1997; Overall, 2002). Die PEX-Domäne von ProMMP-1 hat die Form eines abgeflachten Ellipsoids und ist den Hämopexin-ähnlichen Domänen anderer MMPs sehr ähnlich (Li et al., 1995; Libson et al., 1995; Gohlke et al., 1996; Gomis-Rüth et al., 1996). Sie besitzt die Struktur eines vierblättrigen Propellers (Propellerblatt I bis IV), deren Propellerblätter nahezu symmetrisch um eine zentrale Achse angeordnet sind (Abbildung 4-10 und 4-11).

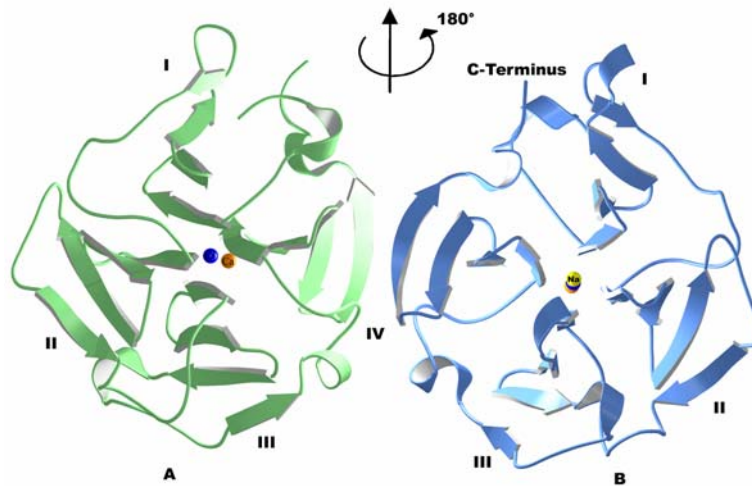


Abbildung 4-10: Ribbondarstellung der PEX1-Dimere. PEX1 Molekül A und Molekül B sind entsprechend in grün und blau dargestellt. Die Ansicht ist senkrecht zur zweizähligen Achse ausgerichtet.

Jedes Propellerblatt wird durch vier antiparallele Stränge gebildet, die in einer W-förmigen Anordnung miteinander verknüpft und in sich stark verdreht sind. Die innersten Stränge des Propellers verlaufen nahezu parallel zueinander, und bilden dabei einen schlauchförmigen Tunnel, der sich zum Ausgang hin weitet. Der Ausgang ist durch die Richtung der Faltblätter definiert. Die vierten β -Stränge der Propellerblätter II und III sind durch die charakteristischen *beta-bulges* unterbrochen, die so eine Anordnung mit den dritten β -Strängen in Phase ermöglichen, anstelle von einer gesamten Faltblattkrümmung. Regionen, die sich am äußersten Rand der Domäne befinden, bilden kurze α -Helices aus. Eine Disulfidbrücke zwischen den zwei hoch konservierten Cysteinen (Cys278 und Cys466)

verbindet Propellerblatt I mit IV. Diese intramolekulare kovalente Bindung ist entscheidend für die strukturelle Integrität aller vierblättrigen Propeller (Cha et al., 2002).

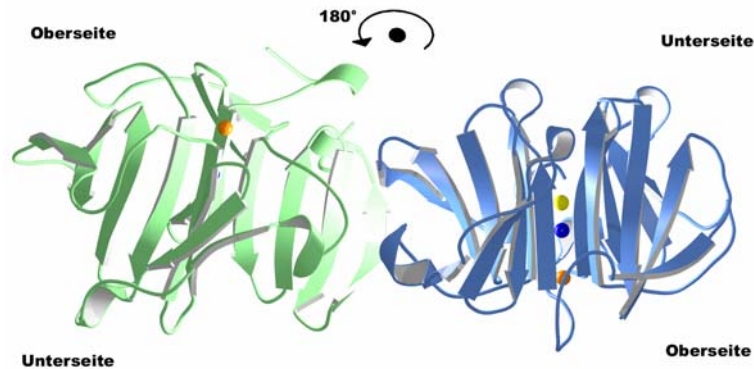


Abbildung 4-11: Ribbondarstellung der PEX1-Dimere um 90° gedreht. PEX1 Molekül A und Molekül B sind entsprechend in grün und blau dargestellt.

Innerhalb des zentralen Tunnels befinden sich verschiedene Ionen. Eine Ansammlung von negativ geladenen Resten ist sowohl am Eingang wie auch am Ausgang des Tunnels zu beobachten (Abbildung 4-12 und 4-13), welche für die Bindung bzw. Anziehung von Kationen verantwortlich sein könnte.

Am Eingang des Tunnels ist ein Calciumion lokalisiert, das tetraedrisch von den ersten vier Carbonylgruppen der innersten Stränge koordiniert wird (Asp427 O: 2,30 Å; Asp378 O: 2,31 Å; Asp285 O: 2,58 Å; Glu329 O: 2,32 Å). Weiterhin sind zwei Wassermoleküle an der Koordination des Calciumions beteiligt, was somit in einer oktaedrischen Anordnung resultiert. Im Zentrum des Tunnels konnte je ein Chloridion und ein Natriumion beobachtet werden. Das Chloridion, das zwischen dem Calciumion und dem Natriumion positioniert ist, wird tetraedrisch koordiniert durch die Stickstoffatome der Amidgruppen (Ile287 N: 3,61 Å; Ala380 N: 3,51 Å; Val429 N: 3,60 Å; Ala331 N: 3,64 Å) derselben Reste, die mit ihren Carbonylgruppen ein Natriumion koordinieren (Ala331 O: 2,39 Å; Val 429 O: 2,51 Å; Cl 7: 2,93 Å; Ile287 O: 2,35 Å und Ala380 O: 2,37 Å). Mit diesen Ionen wird eine weitere Stabilisierung der Propellerstruktur erreicht. Keine der vier Carboxylseitenketten von Asp427, Asp285, Asp378 sowie Glu329, ist zum Calciumion gerichtet, vielmehr sind alle dem Lösungsmittel exponiert und interagieren mit den Seitenketten von Lys425 (Asp427), Lys298 (Asp285) und Lys425 und His376 (Asp378) sowie Lys344 (Glu329), die sich am Eingang befinden (Abbildung 4-12). Am Tunnelausgang ist ebenfalls eine Reihe von Aspartaten zu beobachten, die gleichfalls von positiv geladenen

Seitenketten gebunden werden. Die Paarungen lauten: Lys450/Asp385, Lys432/Asp433, Arg337/Asp336, Arg291/Asp338 und Arg304/Glu293 (Abbildung 4-13).

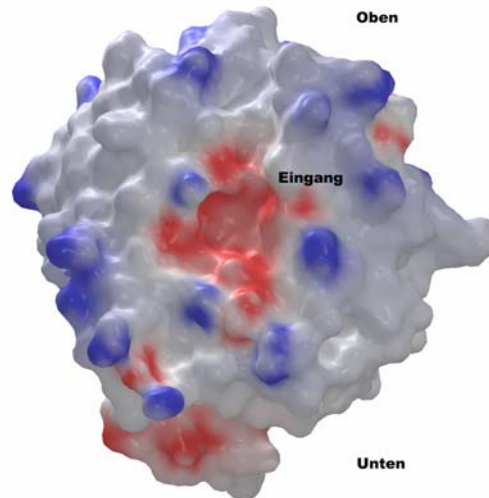


Abbildung 4-12: Ladungsverteilung auf der Oberfläche der Hämopexin-ähnlichen Domäne. Die Orientierung entspricht der Darstellung der Vorderseite. Positive Ladungen auf der Proteinoberfläche sind in blau und negative Ladungen in rot dargestellt. Der Eingang des Tunnels der PEX-Domäne ist gekennzeichnet.

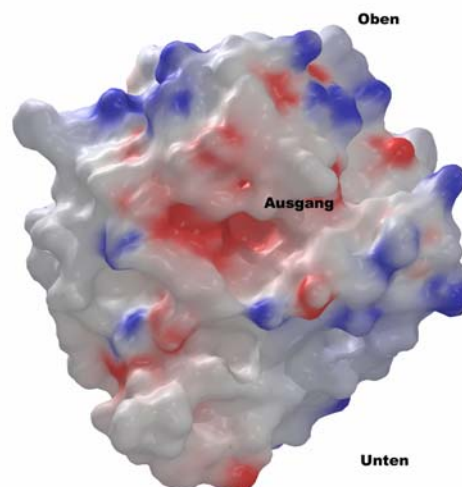


Abbildung 4-13: Ladungsverteilung auf der Oberfläche der Hämopexin-ähnlichen Domäne. Die Orientierung entspricht der Darstellung der Rückseite. Positive Ladungen auf der Proteinoberfläche sind in blau und negative Ladungen in rot dargestellt. Der Ausgang des Tunnels der PEX-Domäne ist gekennzeichnet.

Der 16 Aminosäuren lange Linker zwischen der katalytischen Domäne und der Hämopexin-ähnlichen Domäne krümmt sich nach hinten und verläuft in einer lockeren Anordnung antiparallel zur Helix hC, bevor er in die PEX-Domäne eintritt. Der Linker zeichnet sich bei ProMMP-1 durch vier Proline innerhalb der 16 Aminosäuren aus. In der vorliegenden

Struktur sind die Seitenketten der Aminosäuren Pro266 und Val261 jedoch nicht in der Elektronendichte sichtbar.

Die PEX-Domäne bildet neben der Bindung über das Linkerpeptid auch nichtkovalente Kontakte mit der katalytischen Domäne aus. Dies geschieht zwischen dem äußersten β -Strang des ersten Propellerblattes und der Helix hC der katalytischen Domäne.

4.1.5.1 Struktureller Vergleich von humaner ProMMP-1 und Schweine-MMP-1

Ein Sequenzvergleich von ProMMP-1 mit Schweine-MMP-1 zeigt, daß diese eine Sequenzhomologie von 88 % besitzen. Die katalytischen Domänen überlagern mit einer r.m.s.-Abweichung von 0,45 Å für 140 C α -Atome, während eine Überlagerung der PEX-Domänen eine r.m.s.-Abweichung von 0,5 Å für 180 C α -Atome liefert (Abbildung 4-14).

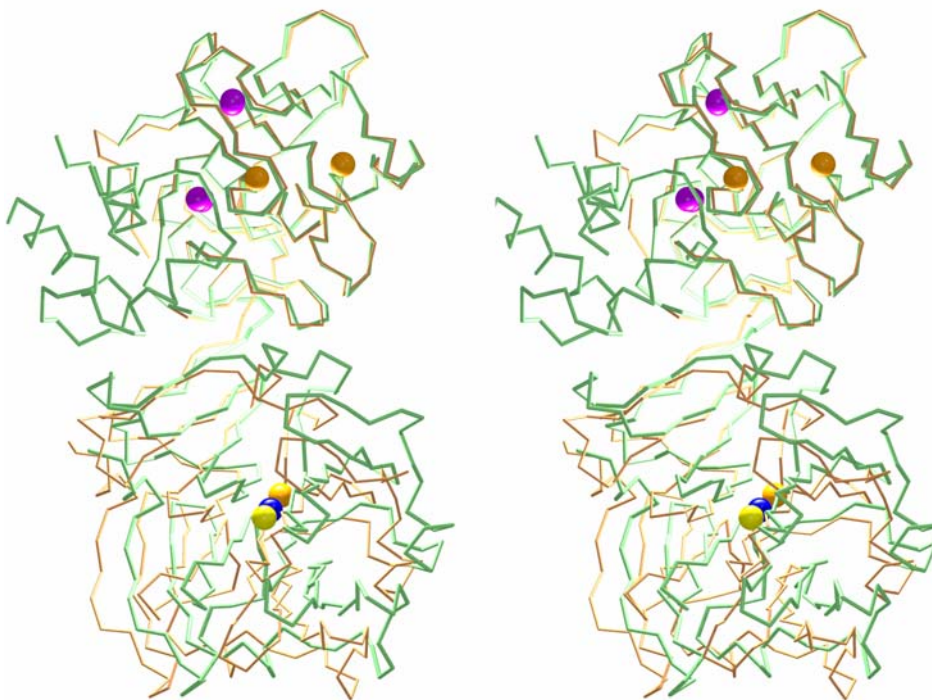


Abbildung 4-14: Vergleich der Strukturen von humaner ProMMP-1 (grün) und Schweine-MMP-1 (orange). Die Calcium-, Zink-, Natrium- und Chloridionen sind in orange, purpur, gelb und blau gekennzeichnet.

Unterschiede zwischen den beiden Molekülen beschränken sich auf die dem Lösungsmittel exponierten *loops* der PEX-Domänen. Die PEX-Domäne von ProMMP-1 ist entlang der Interaktionsfläche zwischen den Domänen in Richtung Prodomäne verschoben. Die größten Verschiebungen können bis zu 9 Å für einige Aminosäuren des Propellerblattes I betragen.

Eine Überlagerung der katalytischen Domänen zeigt, daß die Hämopexin-ähnlichen Domänen um ca. 10° gegeneinander verschoben sind.

4.1.5.2 Interaktion zwischen Prodomäne und Hämopexin-ähnlicher Domäne von ProMMP-1

Die vorliegende Kristallstruktur ist die erste, die eine Interaktion zwischen Hämopexin-ähnlicher Domäne und Prodomäne zeigt (Abbildung 4-15). Dieser Kontakt ist hauptsächlich hydrophober Natur, und involviert die Reste Asn306 und das Segment Phe308-Tyr309-Pro310 des ersten Propellerblattes, die mit den Resten Leu73-Lys74 und Glu82 der Prodomäne interagieren. Glu82 bildet mit der Carboxylgruppe eine Wasserstoffbrücke zum N δ 1-Atom von Asn306 sowie zu der Seitenkette von Tyr309 aus. Darüber hinaus ergibt sich eine Wasserstoffbrücke zwischen den Hauptkettenatomen N von Lys74 und dem Carbonylsauerstoff von Phe308.

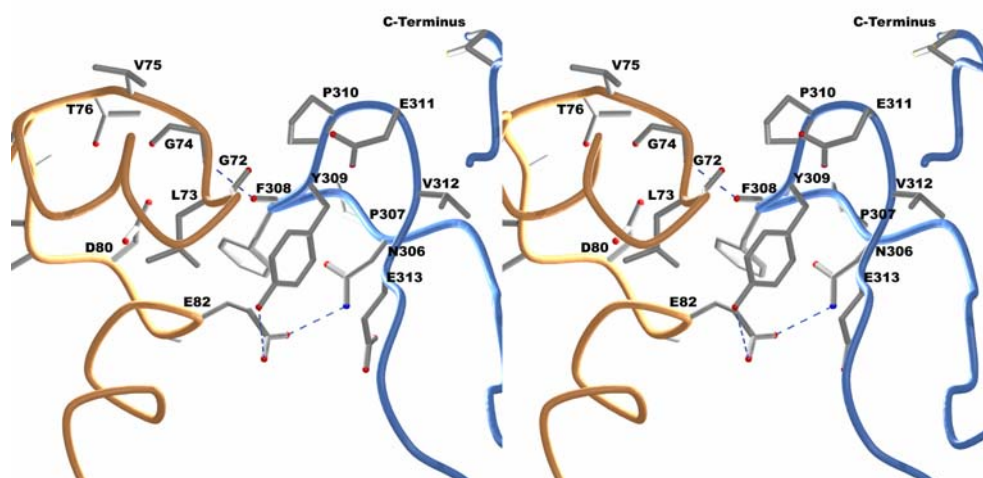


Abbildung 4-15: Detaillierte Ansicht der Interaktionsfläche zwischen Prodomäne (orange) und Hämopexin-ähnlicher Domäne (blau). Reste, die an der Interaktion beteiligt sind, sind als Stäbchenmodell dargestellt. Interaktionen zwischen der Prodomäne und der PEX-Domäne sind als blaue Linien gekennzeichnet.

4.1.5.3 Dimerisierung der ProMMP-1

In der Kristallpackung liegt ProMMP-1 als Homodimer vor, welches durch eine Interaktion der Hämopexin-ähnlichen Domäne entsteht.

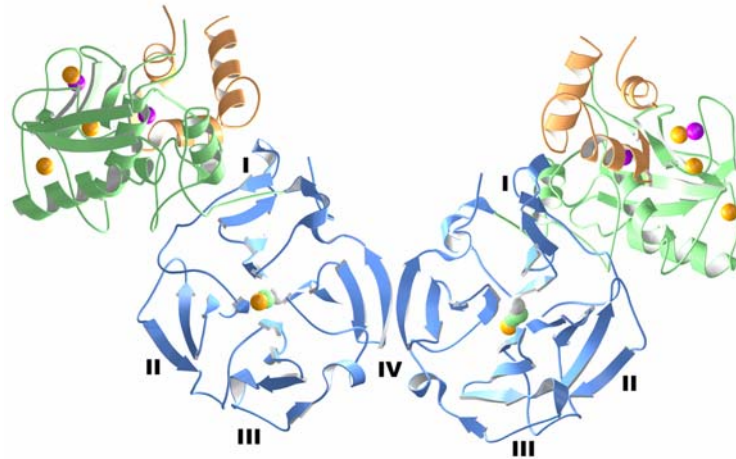


Abbildung 4-16: Darstellung der Anordnung des Homodimers von ProMMP-1. Die Prodomäne ist in orange, die katalytische Domäne in grün und die Hämopexin-ähnliche Domäne in blau dargestellt. Die Calcium-, Zink-, Natrium- und Chloridionen sind in orange, purpur, gelb und blau gekennzeichnet.

Durch Größenausschlußchromatographie konnte die Dimerisierung auch *in vitro* bestätigt werden. Die zwei Propellerachsen der PEX-Domänen sind antiparallel zueinander ausgerichtet. Molekül A und B stehen durch eine 162° Rotation entlang einer Achse, die nahezu senkrecht zu den Propellerachsen verläuft, miteinander in Verbindung (Abbildung 4-16, 4-10 und 4-11). Es ist vor allem das letzte β -Faltblatt des Propellerblattes IV, welches die Dimerisierung ermöglicht. Die β -Stränge von Propellerblatt IV der Moleküle A und B verlaufen nahezu parallel zueinander, sie zeigen jedoch kein ausgeprägtes Wasserstoffbrückennetzwerk, um ein achtsträngiges Faltblatt auszubilden.

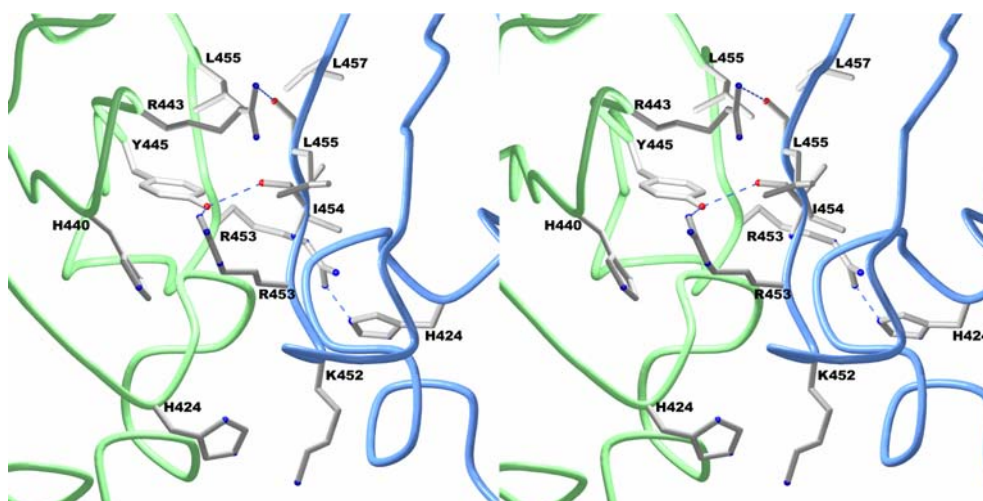


Abbildung 4-17: Detaillierte Ansicht der Interaktionsfläche zwischen PEX1 (A) in grün und PEX1 (B) in blau gekennzeichnet. Reste, die an der hydrophoben Interaktion beteiligt sind, sind als Stäbchenmodell dargestellt.

Eine detaillierte Interaktion ist in Abbildung 4-17 gezeigt. Die Analyse zeigt eine hauptsächlich hydrophobe Interaktion und nur eine Salzbrücke, die von den Resten Tyr445 (A) mit Rest Arg453 (B) ($\text{OH}\cdots\text{NH}_2$) gebildet wird. Molekül A und B zeigen eine r.m.s.-Standardabweichung von 0,43 Å. Die Abweichung kann auf die C-terminalen Reste des Propellerblattes IV (Rest 425 – Rest 466) beschränkt werden, die mit 0,51 Å höher ist als für die Reste, die N-terminal lokalisiert sind (0,34 Å). Die Abweichung kommt somit durch die Dimerisierungsregion zustande. Die Reste, die an dieser beteiligt sind, sind innerhalb der bekannten MMP-1 Sequenzen konserviert, ausgenommen ist hiervon nur der Rest His424, der in anderen MMP-1 Spezies durch ein Aspartat oder Asparagin ausgetauscht ist (Abbildung 4-18).

Ergebnisse

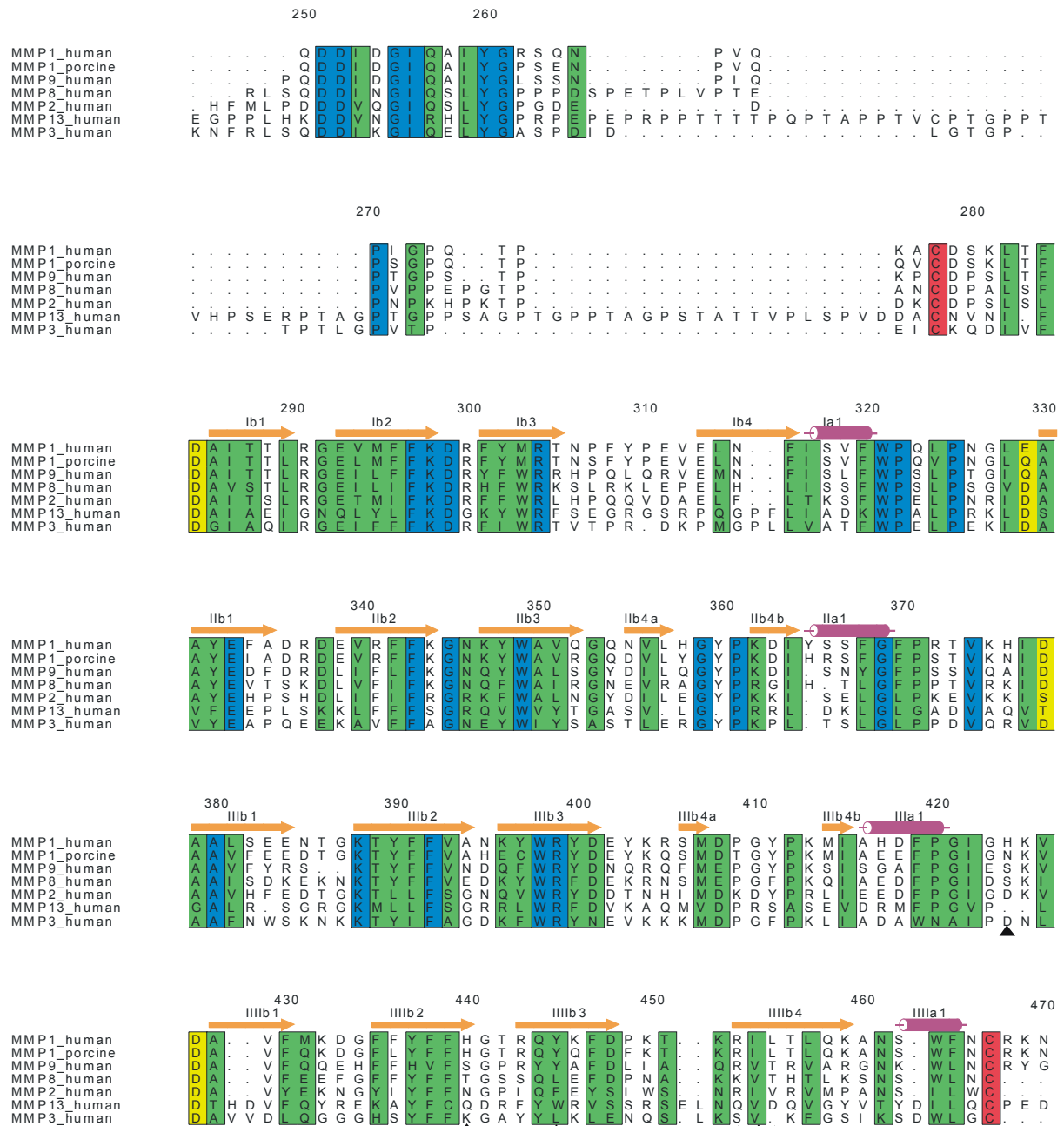


Abbildung 4-18: Sequenzalignment der Hämopexin-ähnlichen Domänen ausgewählter MMPs. Die Pfeile (β -Stränge) und Zylinder (α -Helices) beschreiben die Sekundärstruktur von ProMMP-1. Die Sequenz ist entsprechend der Sequenz von ProMMP-1 nummeriert. Die Sequenzen sind von blau für Sequenzidentität über grün für große Ähnlichkeit unterlegt. Die gelb markierten Sequenzen stellen die Aspartate dar, die am Eingang des Tunnels der Hämopexin-ähnlichen Domäne lokalisiert sind. Rot unterlegt sind die zwei Cysteine Cys278 und Cys466, die eine Disulfidbrücke ausbilden, und auf diese Weise die Anordnung des vierblättrigen Propellers stabilisieren. Schwarze Dreiecke markieren die Reste, die in den bekannten MMP-1 Sequenzen konserviert sind.

4.2 Kristallstruktur der PeptidaseV

4.2.1 Expression und Reinigung der PeptidaseV

PepV aus *E. coli* wurde mit dem Plasmid pK104 in *E. coli* überexprimiert. Die Reinigung zu apparter Homogenität gelang durch Kombination dreier Chromatographieschritte: Anionenaustauschchromatographie an DE52 und ResourceQ und einer abschließenden Gelfiltrationschromatographie (Abbildung 4-19).

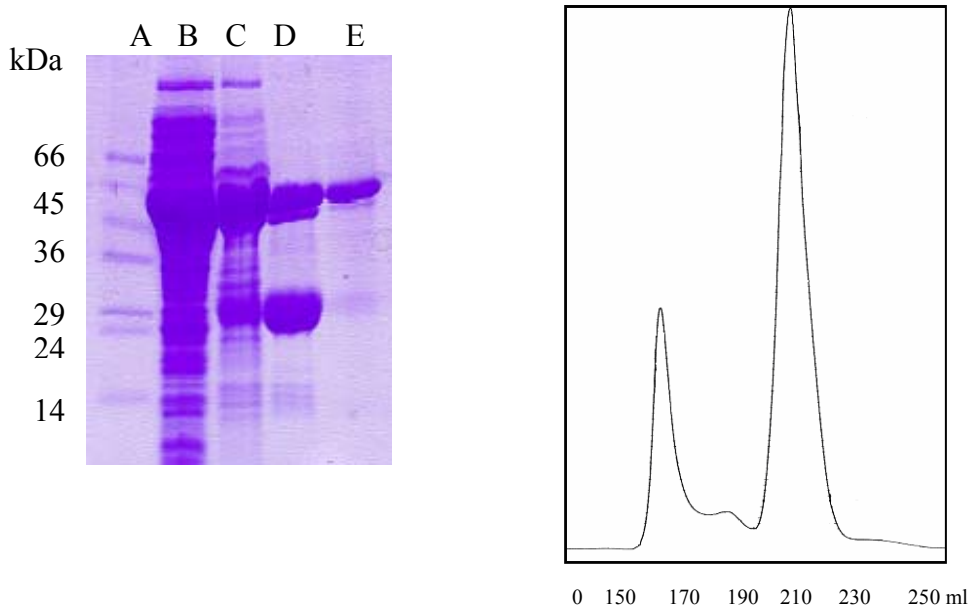


Abbildung 4-19: a) Coomassiegefärbtes, 12 %iges (w/v) SDS-PAGE Gel der einzelnen Reinigungsschritte von PepV: A - *low-range* Marker; B - *E. coli*-Lysat; C - nach DE52; D - nach ResourceQ; E - PepV nach Gelfiltration. b) Elutionsprofil von PepV nach Gelfiltration an Superdex 75.

4.2.2 Kristallisation der PeptidaseV

Die Kristalle von PepV wurden unter Anwendung der Dampfdiffusionsmethode im *sitting drop* Verfahren in Kristallisationsplatten (CrysChem, Charles Supper Company) bei RT gezüchtet. Ausgehend von Standardexperimenten auf der Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen konnten keine geeigneten Bedingungen erhalten werden. Erst die Gegenwart eines Phosphatininhibitors führte schließlich zu folgender Kristallisationslösung: 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01 M MgCl_2 ; 0,05 M MES/NaOH, pH 5,6; 30 % PEG 8000.

Dazu wurde das Protein zunächst auf 25 mg/ml ankonzentriert, und in einem Volumenverhältnis von 1:2 wurde der Phosphatininhibitor AspΨ[PO₂CH₂]AlaOH

dazugegeben. Kristalle entstanden nach ca. einem Monat und hatten eine Größe von etwa $0,4 \times 0,15 \times 0,15 \text{ mm}^3$ (Abbildung 4-20).

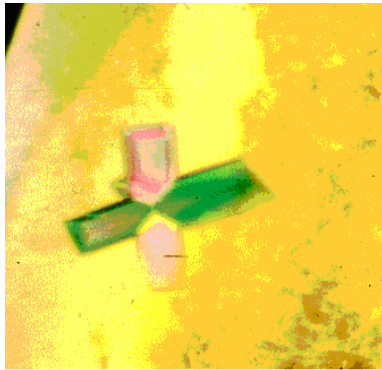


Abbildung 4-20: Kristall von PepV/Inhibitor. Der Kristall wurde durch Dampfdiffusion gegen 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01 M MgCl_2 ; 0,05 M MES/NaOH, pH 5,6; 30 % PEG 8000 erhalten. Seine Größe von $0,4 \times 0,15 \times 0,15 \text{ mm}^3$ hatte der Kristall nach ca. einem Monat erreicht.

4.2.3 Strukturlösung

Es konnte bei 18 °C ein kompletter nativer Datensatz mit einer Auflösung von 2,6 Å auf einem *image plate* Detektor (MAR Research, Hamburg) innerhalb der Arbeitsgruppe aufgenommen werden. Alle Versuche scheiterten, die Struktur mit molekularem Ersatz mit Hilfe von Modellen, die aus ganzen Strukturen, Teilstrukturen und Poly-Ala-Modellen aus der zur Familie gehörenden Carboxypeptidase CPG2 bzw. der strukturverwandten Aminopeptidase AAP aus *Aeromonas proteolytica* zu lösen, da keine ausreichenden Startpositionen für die Phasenbestimmung erhalten werden konnten. Letztlich wurde die Messung eines MAD-Experiments am DESY notwendig. Dieses wurde an der *beamline* BW6 durchgeführt. Dabei mußte nicht nach einem Schwermetallderivat gesucht werden, da aufgrund der Verwandtschaft mit CPG2 zwei Zinkionen im aktiven Zentrum zu erwarten waren.

Es wurde zunächst ein Röntgenfluoreszenzspektrum in der Nähe der K-Kante von Zink aufgenommen. Anhand dieses Fluoreszenzspektrums wurden zwei Meßwellenlängen festgelegt. Es wurden jeweils zwei Datensätze bei Hochauflösung (1,6 Å) und zwei bei Niedrigauflösung (2,5 Å) bei dem Peak ($\lambda_1 = 1,2814 \text{ Å}$, Maximum f''), sowie beim Inflexionspunkt ($\lambda_2 = 1,2821 \text{ Å}$, Minimum f') aufgenommen. *BIJVOET*-Paare bis zu einer Auflösung von 1,6 Å wurden in 1° - und 2° - Schritten, insgesamt je 90° (getrennt durch 180°) für jede Wellenlänge gemessen, um so die Messungen der *BIJVOET*-Differenzen zu optimieren. Zusätzlich wurde ein kompletter Datensatz bei einer von der Zinkkante weit entfernten Wellenlänge ($\lambda_0 = 1,05 \text{ Å}$) aufgenommen. Die aufgenommenen Diffraktionsbilder wurden mittels DENZO/SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1993) indiziert und integriert.

Die Reduktion der Daten erfolgte mit den CCP4-Programmen TRUNCATE, RSPS, MLPHARE (Collaborative Computational Project No.4, 1994). Die Kristalle beugten bis zu einer maximalen Auflösung von 1,6 Å (siehe Abbildung 4-21).

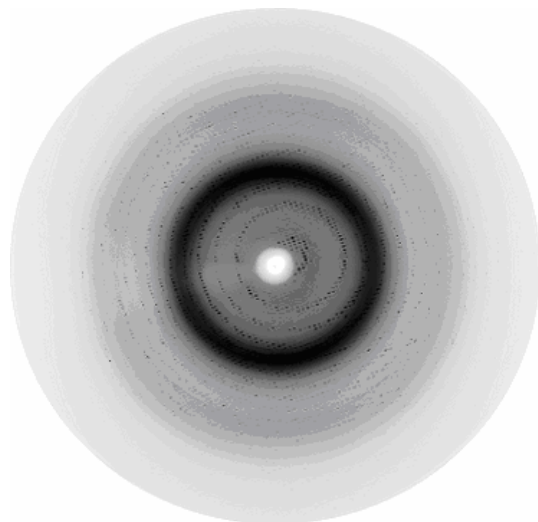


Abbildung 4-21: Diffractionsbild eines PepV-Kristalls. Das Diffractionsbild wurde an der *beamline* BW6 (Deutsches Elektronensynchrotron DESY, Hamburg) bei $\lambda_1 = 1,2814$ Å mit einem *image plate* Detektor (MAR Research, Hamburg) aufgenommen. Der Drehwinkel betrug 1° .

Die Indizierung der Reflexe ergab ein orthorhombisch primitives Kristallgitter mit den Zellkonstanten $a = 67,151$ Å, $b = 77,025$ Å, $c = 89,955$ Å, mit $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Die systematischen Auslöschungen für $h00$ mit $h \neq 2n$, $0k0$ mit $k \neq 2n$ und $l00$ mit $l \neq 2n$ zeigten, daß es sich bei allen drei zweifachen Symmetrieachsen um Schraubenachsen handelt, so daß die Raumgruppe zu $P2_12_12_1$ bestimmt werden konnte.

Tabelle 4-3: Datensammlung und Statistik der Phasierung

Datensammlung	f' -Minimum (λ_2)	f'' -Maximum (λ_1)	<i>remote point</i> (λ_3)
Wellenlänge (Å)	1,28210	1,28140	1,0500
Auflösung (Å)	15,0 – 1,6	15,0 – 1,6	15,0 – 1,6
Multiplizität	4,38	4,36	2,16
Zahl der Reflexe	62080	62044	62025
Vollständigkeit (%)	99,9	99,9	98,8
(äußerste Schale) (%)	99,2	99,2	93,3
(1.63-1.60) (Å)			
I/σ	22,69	23,48	16,15
R_{sym}^a (%)	7,6	6,8	6,1

$$^a R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I \rangle_{hkl}|}{\sum | \langle I \rangle_{hkl} |}$$

Ausgehend von einem PepV Monomer pro asymmetrische Einheit, ergibt sich ein Matthews-Koeffizient von $2,77 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, was einem Solvensgehalt von etwa 55,24 % entspricht. Die restlichen statistischen Werte des Datensatzes sind in Tabelle 4-4 zusammengefaßt.

Tabelle 4-4: Verfeinerungsstatistik der PepV	
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten (Å)	a = 67,151, b = 77,025, c = 89,955
Wassergehalt (%)	55,24
Matthewskoeffizient (Å ³ /Da)	2,77
Anzahl der Reste in der asymmetrischen Einheit	468
Proteinatome	3654
Anzahl der Wassermoleküle	570
Anzahl der Zinkionen	2
Anzahl der Inhibitoratome	15
B-Faktoren (Å²)	
Proteinatome (Å ²)	13,566
Lösungsmittelatome (Å ²)	27,100
Zinkionen (Å ²)	9,185
Inhibitoratome (Å ²)	12,836
Auflösungsbereich (Å)	15,0 – 1,8
¹ R-Faktor (%)	17,43
² Freier R-Faktor (%)	20,46
R.m.s. Abweichungen von Idealwerten	
Bindungslängen	0,009 Å
Bindungswinkel	1,74°
$^1 \text{ R-Faktor} = \frac{\sum \ F_{obs} - k F_{calc} \ }{\sum F_{obs} }$	
² Der freie R-Faktor R _{free} wurde mit 10 % der gemessenen Daten berechnet, die nicht für die Verfeinerung verwendet wurden.	

Das atomare Modell wurde auf einer Graphikworkstation der Firma SiliconGraphics (SGI) mit dem Programm TURBO-FRODO Version 5.5 (Roussel & Cambileau, 1989) in die Elektronendichte eingepaßt.

Dieses Modell wurde mit dem Programm X-PLOR Version 3.85 (Brünger et al., 1998) und REFMAC (Collaborative Computational Project No.4, 1994) verfeinert. Bei der Verfeinerung wurde der kristallographische R-Faktor minimiert, wobei gleichzeitig geometrische Parameter berücksichtigt wurden (Engh & Huber, 1991). Das Verhältnis der Gewichtung von

Streu-factor- und geometrischen Term wurde vor Beginn der Verfeinerung festgelegt. Es erwies sich als vorteilhaft, in den ersten Verfeinerungszyklen der Geometrie-Optimierung gegenüber der R-Faktor-Optimierung den Vorrang zu lassen, und im finalen Verfeinerungsstadium den kristallographischen Term so stark zu gewichten, das die r.m.s.-Abweichung der Bindungslängen bzw. Bindungswinkel von den Zielwerten (Engh & Huber, 1991) maximal 0,009 Å, bzw. 1,74° betrug.

Im Anschluß an die Koordinatenverfeinerung wurden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert. Im Verlauf der Verfeinerung verringerte sich der durch Fourier-Backtransformation berechnete R-Faktor zwischen F_o und F_c von 30 % auf 17,4 %, während der freie R-Faktor, in den 10 % der Reflexdaten eingingen, von 36 % auf 20,4 % fiel. Die Verfeinerungsstatistik des vollständigen und verfeinerten Modells ist in Tabelle 4-4 wiedergegeben. Die Werte der Hauptketten-Dihedralwinkel aller Nicht-Glycin-Reste des verfeinerten Modells liegen zu 98 % in energetisch erlaubten Regionen (Ramachandran & Sasisekharan, 1968) (Abbildung 4-22).

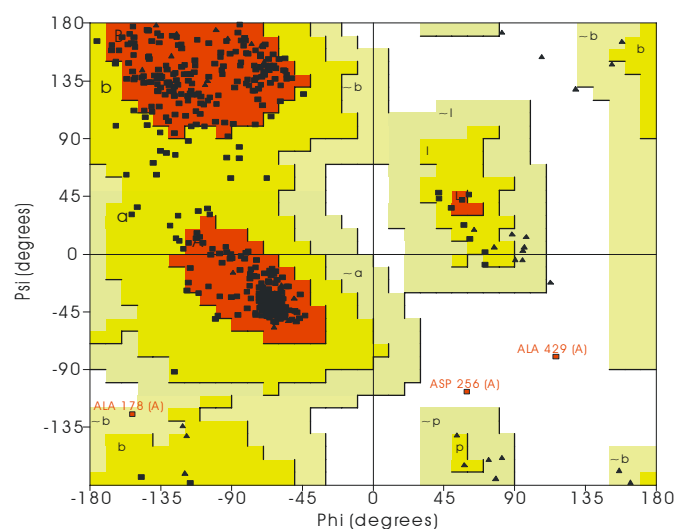


Abbildung 4-22: Ramachandran-Plot für das verfeinerte PepV-Modell. Für jede Aminosäure ist ihre ϕ - und ψ -Winkel dargestellt. Die energetisch günstigste Region ist rot, die energetisch erlaubte Region gelb dargestellt. Hellgelb ist die energetisch noch mögliche, weiß die verbotene Region. Glycine (▲) sind aufgrund der fehlenden Seitenkette auch in den weißen Regionen erlaubt, alle anderen Aminosäuren (■) befinden sich in energetisch günstigen Regionen. A markiert den Geometriebereich, B für β -Faltblattstränge, L für linksgängige α -Helices und p für ϵ -Regionen.

Drei Aminosäuren, Ala178, Asp256 und Ala429 befinden sich in zusätzlich erlaubten Regionen, nur Asp265 befindet sich in einer energetisch unerlaubten Region. Alle drei Aminosäuren sind gut in der Elektronendichte definiert, und befinden sich entweder in der Nähe des Aktivzentrums, wie Ala179, oder an der Oberfläche, wie die restlichen zwei Aminosäuren. Ab einem R-Faktor unter 25 % wurden Wassermoleküle in stereochemisch sinnvolle Positionen eingebaut, die eine hohe positive Differenzdichte aufwiesen.

4.2.4 Strukturbeschreibung der PeptidaseV

468 der 470 Aminosäuren von PepV sind in der Elektronendichte gut definiert. Das monomere PepV Molekül hat die Struktur eines verlängerten Ellipsoids und besitzt eine Ausdehnung von ca. 73 x 39 x 35 Å. Es setzt sich aus zwei Domänen zusammen, die ungefähr die gleiche Größe haben: eine kugelförmige α/β -Typ katalytische Domäne, die die Zinkbindenden Reste und das katalytische Glutamat beinhaltet, sowie eine sogenannte Deckeldomäne. Diese besitzt gleichermaßen ein α/β -Faltungsmotiv, und grenzt mit ihrer langen, schmalen Flanke an die katalytische Domäne (Abbildung 4-23).

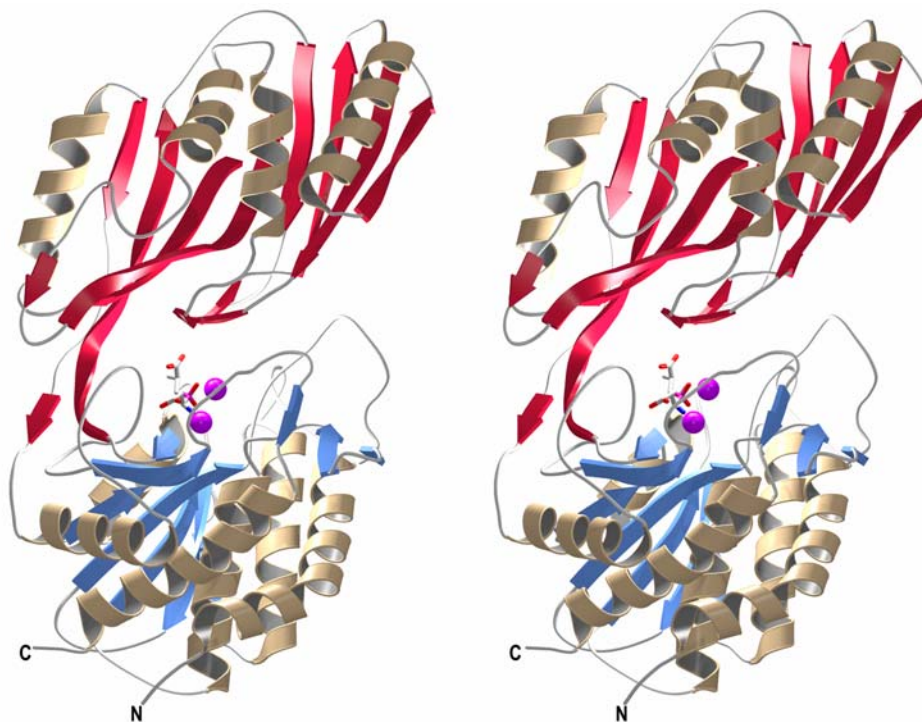


Abbildung 4-23: Stereodarstellung von PepV. Die β -Stränge der katalytischen- und Deckeldomäne sind in blau und rot dargestellt. Die Zinkionen sind als purpurfarbene Kugeln gekennzeichnet. Der Phosphinat-inhibitor $\text{Asp}\psi[\text{PO}_2\text{CH}_2]\text{AlaOH}$ ist als Stäbchenmodell dargestellt.

Die katalytische Domäne, die von den ersten 185 und letzten 83 Aminosäuren gebildet wird, besteht hauptsächlich aus einem verdrehten β -Faltblatt, welches von insgesamt sechs α -Helices eingepackt wird, und einem zweiten kleineren β -Faltblatt, welches dreisträngig ist und sich an der oberen Spitze dieser Anordnung befindet (Abbildung 4-24).

Das größere Faltblatt besteht aus insgesamt sieben β -Strängen, die folgende Anordnung besitzen: s1-s2-s6-s3-s7-s9-s8, mit s2 als einzigem antiparallelem Strang (Abbildung 4-24).

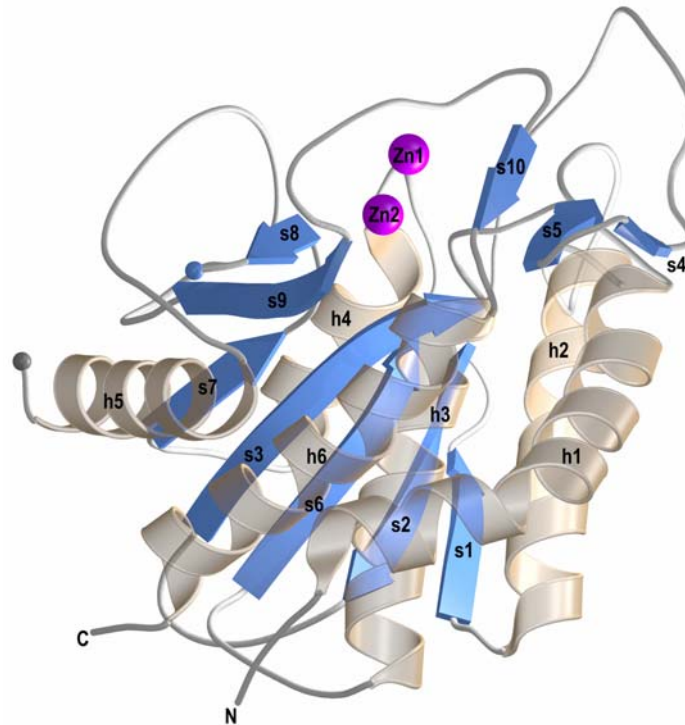


Abbildung 4-24: Struktur der katalytischen Domäne von PepV. Die zwei Zinkionen sind als Kugeln (purpur) dargestellt. Der Anfang bzw. das Ende der katalytischen Domäne ist als Kugel in blau bzw. grau gekennzeichnet.

Das aktive Zentrum ist am C-terminalen Ende des zentralen, parallelen β -Faltblatts lokalisiert. Helix h4 befindet sich auf der Rückseite des zentralen Faltblatts, während die Helices h1, h2, h3, h5 und h6 einen Cluster auf der Vorderseite zwischen dem großen und kleinen Faltblatt bilden. Die N-terminale Helix h1 besitzt eine steile Krümmung und befindet sich an der Oberfläche des Proteins. Helix h3 und h6 hingegen bilden das Kernstück der katalytischen Domäne. Das N- und C-terminale Ende der Domäne liegen dicht beieinander, und sind der Deckeldomäne sowie dem Aktivzentrum genau gegenüber lokalisiert.

Die katalytische Domäne von PepV besitzt ein ähnliches Faltungsmotiv wie die katalytischen Domänen der verwandten Exopeptidasen CPG2 (M20) (Rowell et al., 1997), AAP (M28) (Chevrier et al., 1994) und SGAP (Greenblatt et al., 1997) (Abbildung 4-25).



Abbildung 4-25: Stereoabbildung einer Überlagerung der zu PepV homologen Proteine. Das PepV Molekül (beige) wurde mit folgenden strukturähnlichen Proteinen überlagert: CPG2 aus *Pseudomonas stutzeri* (rot) und AAP aus *Aeromonas proteolytica* (blau).

Sequenzvergleiche zwischen den katalytischen Domänen der CPG2, AAP, SGAP und PepV zeigen, daß die Sequenzen jeweils zu 28,1 %, 19,1 % und 21 % ähnlich sind, mit einer r.m.s.-Abweichung von 1,58 Å, 1,35 Å und 1,73 Å. Eine optimale Überlagerung der Strukturen zeigt, daß 181, 145 und 154 Reste der 268 Reste der katalytischen Domäne äquivalent positioniert sind, aber nur 28,7 %, 17,3 % und 20,8 % dieser äquivalenten Reste identisch sind (Abbildung 4-26).

Die Deckeldomäne von PepV umfaßt 202 Reste (Glu186-Gly387), die zwischen den Strängen s8 und s9 des zentralen Faltblatts der katalytischen Domäne eingefügt sind. Sie enthält neben einem achtsträngigen zentralen Faltblatt und einem kleinen zweisträngigen antiparallelen Faltblatt, zwei kürzeren β -Strängen sowie vier α -Helices. Diese α -Helices sind in wechselnder Orientierung im Vordergrund des zentralen Faltblatts gelegen (Abbildung 4-27). Die acht β -Stränge des relativ ebenen Faltblatts sind antiparallel angeordnet: sXI-sI-sX-sIX-sII-sIV-sVI-sV.

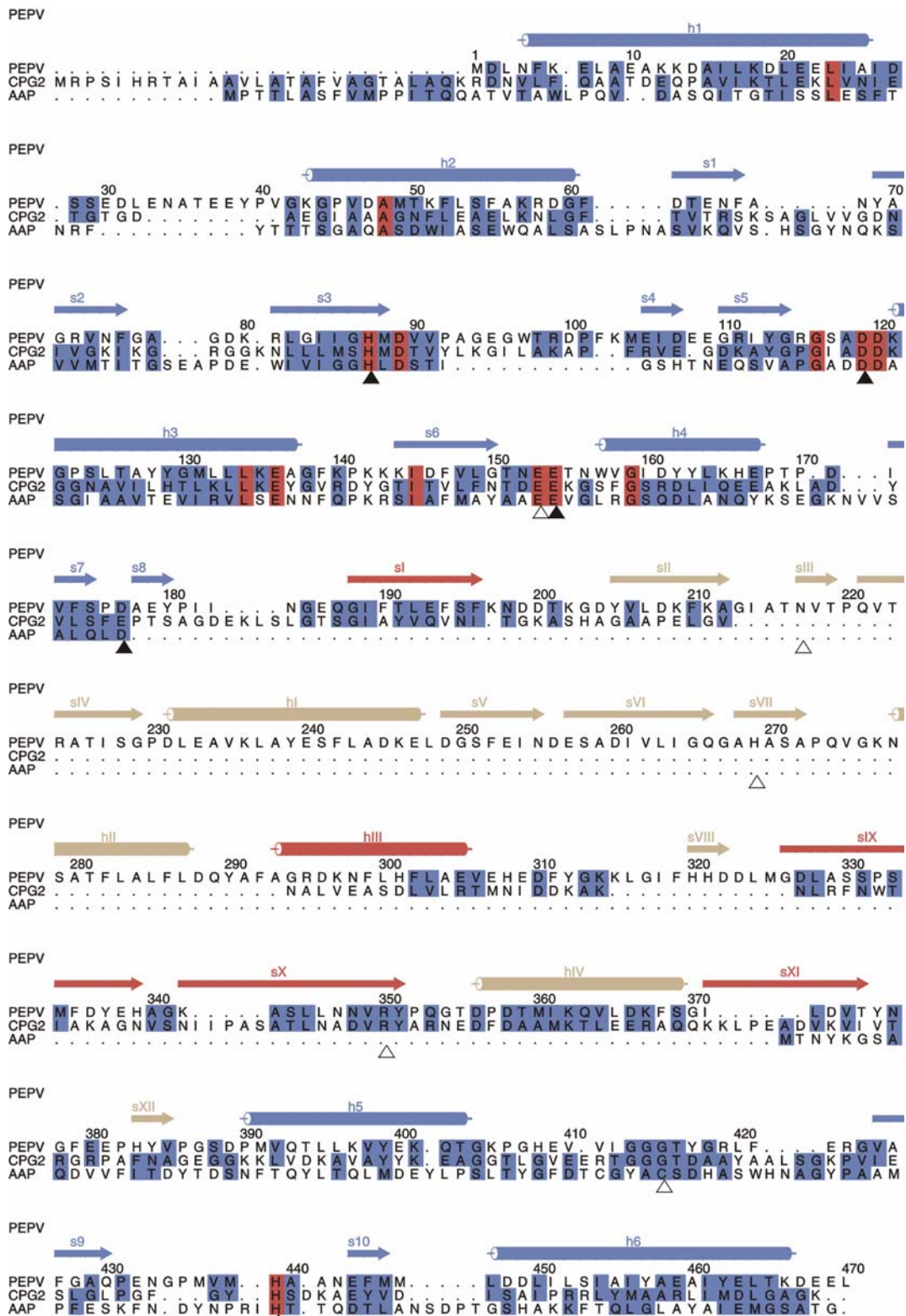


Abbildung 4-26: Strukturbasierter Sequenzvergleich von PepV mit CPG2 und AAP. Die angegebene Numerierung bezieht sich auf die Sequenz von PepV. Positionen mit geringer Konservierung sind blau hinterlegt. Positionen mit hoher Konservierung sind rot gekennzeichnet. β -Stränge und α -Helices sind als Pfeile und Zylinder dargestellt. Zink- und substratbindende Reste sind als schwarze bzw. offene Dreiecke dargestellt.

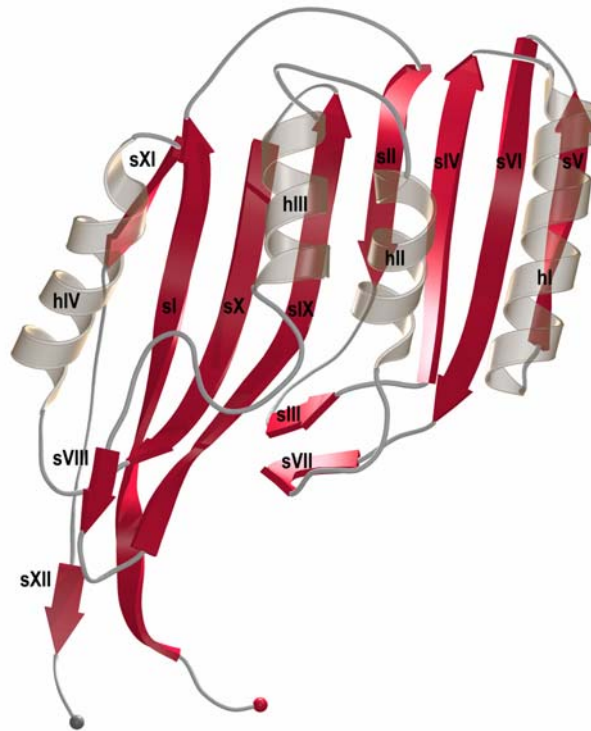


Abbildung 4-27: Struktur der Deckeldomäne von PepV. Der Anfang bzw. das Ende der Deckeldomäne ist als Kugel in rot bzw. grau gekennzeichnet.

Die Suche nach strukturellen Verwandten ergab zudem, daß einzig die Dimerisierungsdomäne von CPG2 teilweise zu der Deckeldomäne von PepV ähnlich ist. CPG2 ist das einzige strukturell verwandte Enzym, was gleichfalls eine zweite Domäne besitzt.

Beide PepV Domänen interagieren mit einer Proteingrenzfläche von ca. 500 Å² miteinander. Diese Grenzflächen erinnern an zwei laterale Säulen, die das Aktivzentrum einhüllen (Abbildung 4-23). Die linke Säule besteht aus zwei β-Strängen und den umgebenden Seitenketten, die die beiden Domänen miteinander verknüpft, während die rechte Säule hauptsächlich hydrophobe Kontakte zwischen den zwei Domänen vermittelt, neben einer lösungsmittlexponierten Salzbrücke zwischen den Resten Glu94 und Arg224. Zwischen diesen Säulen befindet sich eine tiefe Höhle, die das Aktivzentrum und die S1- und S1'-Subregionen beherbergt.

Die meisten Reste, die zum aktiven Zentrum gehören, werden von *loop* Regionen bzw. Strängen der katalytischen Domäne bzw. Deckeldomäne bereitgestellt.

Die Substratbindungstaschen werden hauptsächlich von den Resten Gly413-Gly414-Gly415-Gly416 (*gly-bulge*), Asp177-Ala178 und Glu153-Glu154 gebildet, sowie von geladenen Resten, die die Zinkionen koordinieren, bzw. an der Katalyse beteiligt sind.

4.2.4.1 Das Aktivzentrum der Peptidase V

Das Aktivzentrum ist einem Tunnel vergleichbar, welcher zwei Ausgänge hin zum Lösungsmittel besitzt. Ein kleinerer hydrophober Ausgang (ca. 3,5 Å Durchmesser) ist zur Vorderseite gerichtet, während ein größerer, im wesentlichen polarer Ausgang (ca. 5,5 Å Durchmesser) zur Rückseite des Moleküls zeigt. In der Struktur von PepV ist dieser Tunnel durch einen Phosphinatinhibitor und einige Wassermolekülen gefüllt.

Ein in der Inhibitorentwicklung oft benutztes Mittel ist der Austausch der Amidbindung im Peptidrückgrat gegen Gruppen, die vom Enzym nicht gespalten werden. In diese Gruppe fallen auch die Mimetika des tetraedrischen Übergangszustands wie $-P(O)OHCH_2-$ (Phosphinat). PepV konnte mit dem $Asp\psi[PO_2CH_2]AlaOH$ -Inhibitor kristallisiert werden (Abbildung 4-28).

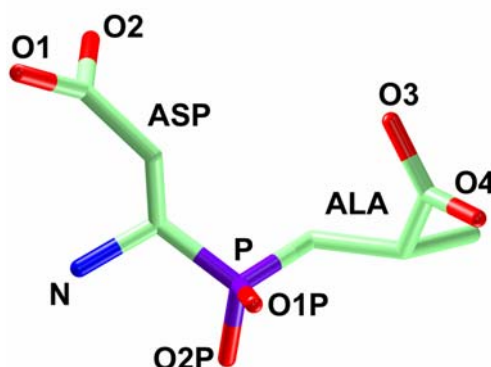


Abbildung 4-28: $Asp\psi[PO_2CH_2]AlaOH$ mit der im Text verwendeten Bezeichnung.

Zink 1 wird durch das Stickstoffatom Ne2 von His439, das Sauerstoffatom O1 der Phosphinatgruppe und einem der beiden Sauerstoffatome von Glu154 mit einer Distanz von 1,92 Å koordiniert.

Der zweite Carboxylsauerstoff von Glu154 liegt weiter entfernt von Zink 1 (2,56 Å) (Abbildung 4-29). Im Inhibitor-Komplex sind die zwei Zinkionen 3,84 Å voneinander

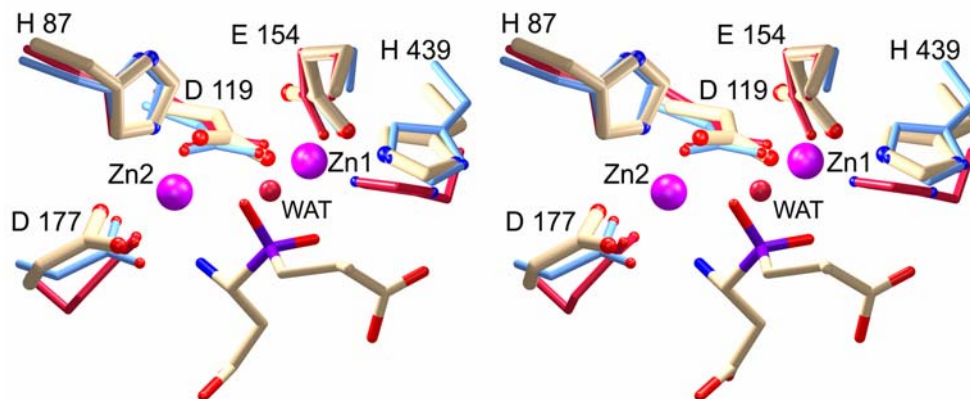


Abbildung 4-30: Stereodarstellung der Aktivzentren von PepV (beige), CPG2 (blau) und AAP (rot). Das katalytische Wasser von CPG2 ist als rote Kugel gekennzeichnet.

Abgesehen von der engen Interaktion mit Zink 1, bildet der Phosphinatsauerstoff O1 zwei Wasserstoffbrücken mit einem internen Wasser (Wat2) und mit der Stickstoffgruppe Ne2 von His269 aus. Letzteres bildet zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zur Aminogruppe N von Ser271 mit seinem Nδ1 aus.

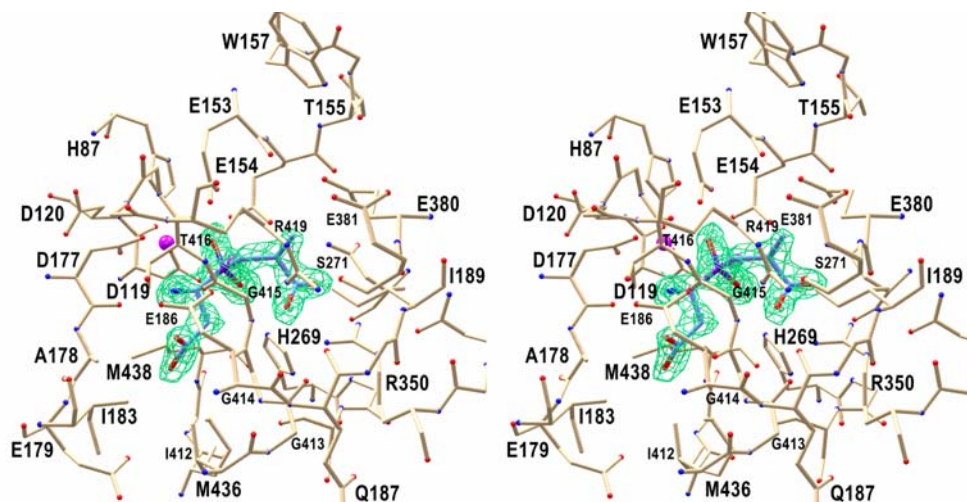


Abbildung 4-31: 2F_o-F_c-Elektronendichte um die Koordinationssphäre des Phosphinatinhibitors.

His269 besitzt somit ein protoniertes Stickstoffatom Ne2 und agiert als Wasserstoffbrückendonator für das O1 der Phosphinatgruppe. Die Methylengruppe des

Inhibitors, welche der NH-Gruppe im Dipeptid entspricht, ist 3,13 Å vom Carbonylsauerstoff O von Gly415 und vom zweiten Carboxylsauerstoff des katalytischen Glu153 entfernt.

Die C-terminale Carboxylgruppe des Inhibitors wird durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken von polaren Resten in einer Carboxylgruppenbindungsgrube (*carboxylate groove*) fixiert.

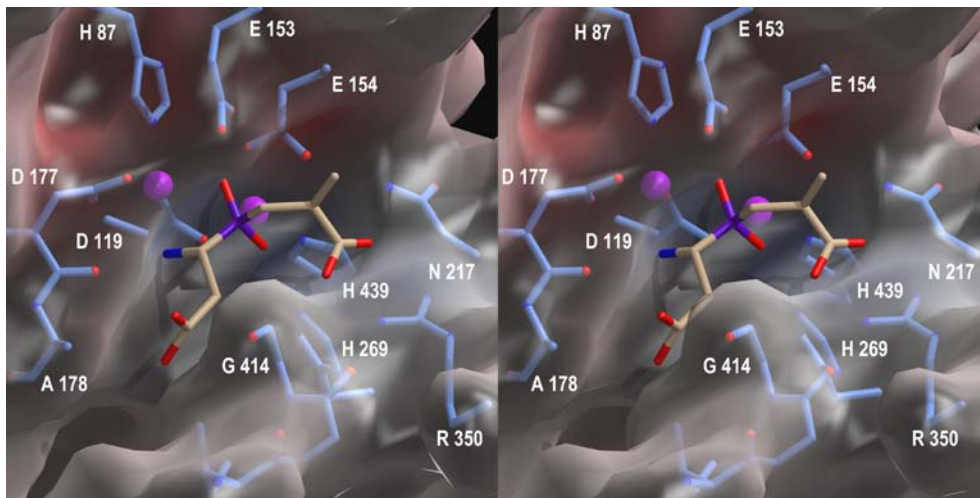


Abbildung 4-32: Die Substratbindungstasche von PepV. Die Abbildung zeigt einen Blick auf die Oberfläche des Proteins im Bereich der Substratbindungsstelle. Der Phosphatininhibitor ist als Stäbchenmodell dargestellt. Kohlenstoffatome bzw. Phosphoratome sind in beige bzw. violett, Stickstoffatome blau und Sauerstoffatome in rot dargestellt. Die Zinkionen sind als Kugeln gekennzeichnet (purpur).

Diese Carboxylgruppe richtet die Guanidiniumgruppe von Arg350 aus, und bildet so zwei kurze N...O Wasserstoffbrücken sowie weitere Wasserstoffbrücken zu den Sauerstoffatomen O von Gly413 und O δ von Asn348 aus (Abbildung 4-29, 4-31 und 4-32).

Die Seitenkette von Asp11 erstreckt sich in die S1-Tasche, welche in PepV von mittlerer Größe ist. Diese Tasche wird hauptsächlich von hydrophoben Resten aufgebaut, wie z.B. Met436 und Met438, die die Tasche zum kleineren Ausgang (Vorderseite) hin schließen (Abbildung 4-31 und Abbildung 4-32). Die Asp11-Seitenkette füllt diese Höhle nicht vollständig aus, läßt also Platz für größere Aminosäuren, wie z.B. für hydrophobe Reste von mittlerer Größe, bis hin zur Größe einer Benzylgruppe. Eines der Asp11-Sauerstoffatome ist in Wasserstoffbrückenbindungsabstand zur Carbonylgruppe von Gly415, was vermuten läßt, daß die Carboxylgruppe von Asp11 bei einem niedrigen pH der Kristallisationslösung protoniert ist (pH 5,6).

Die Ala12-Seitenkette ist zu der Tunnel-ähnlichen S1'-Tasche gerichtet, die sich zum größeren Hinterausgang hin öffnet. Diese Tasche besitzt einen hydrophoben Charakter, wird jedoch in

Richtung Ausgang immer polarer durch die begrenzenden Carbonylgruppen, die Indolgruppe von Trp157, und die Seitenkette von Glu380.

4.2.4.2 Mögliche Substratbindung

PepV zeigt eine starke Präferenz für hydrophobe Seitenketten, wie z.B. ein Phenylalanin am N-Terminus eines Dipeptids. Anhand des vorhandenen Komplexes konnte ein Phe-Phe-Dipeptid in die Struktur modelliert werden (Abbildung 4-33).

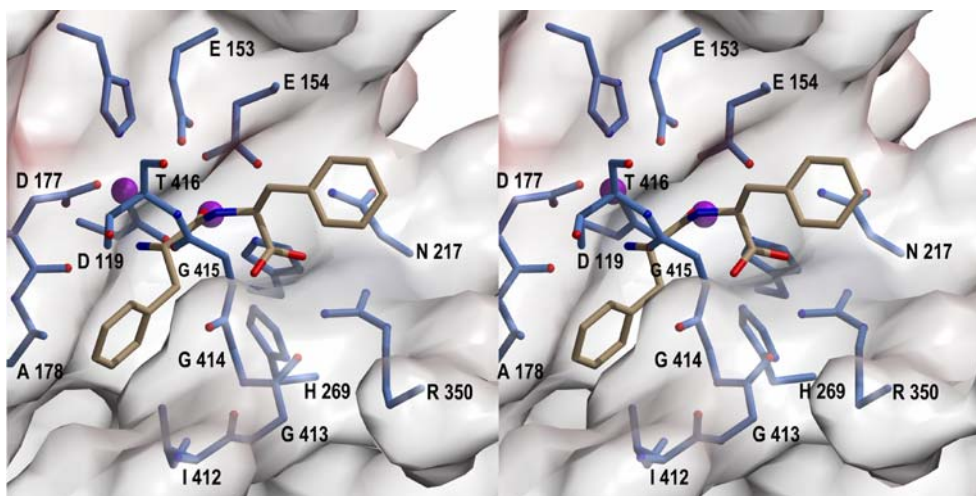


Abbildung 4-33: Stereodarstellung der Umgebung des aktiven Zentrums mit einem modellierten Dipeptid Phe1-Phe2. Die Zink- und substratbindenden Reste sind als Stäbchenmodell dargestellt.

Die Interaktionen des modellierten Substrats sind ähnlich zu denen in der Inhibitor-Komplex-Struktur. Somit könnte die Aminogruppe des Substrats den fünften Liganden von Zink 2 bilden, und die C-terminale Carboxylgruppe sollte somit in Wasserstoffbrückenbindungsabstand zu der Guanidiniumgruppe von Arg350 sein. Arg350 würde somit sowohl an der Fixierung als auch Ausrichtung des Substrats beteiligt sein. Die Phe1-Phenylgruppe würde die S1-Kavität genügend ausfüllen und könnte so einige hydrophobe Interaktionen mit den umgebenden Resten ausbilden.

Genauso würde die Phenylgruppe des C-terminalen Phe2-Restes die S1'-Tasche, also den Anfang des nach hinten gerichteten Tunnels komplett ausfüllen, und könnte somit Kontakte mit umgebenden Gruppen sowie mit vielen Wassermolekülen ausbilden.

4.3 Kristallstruktur der Isoaspartyl Dipeptidase

4.3.1 Klonierung, Expression und Reinigung der Isoaspartyl Dipeptidase

Der für *IadA* codierende Bereich wurde mit den Primern *5'-IadA* und *3'-IadA* aus genomischer *E. coli* W3110 DNA amplifiziert und in den Expressionsvektor pTrc99a kloniert. Das Protein wurde wie im Methodenteil beschrieben, durch Anionenaustausch- und hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt. Die verbleibenden Verunreinigungen konnten durch Gelfiltration mit einer High Load Superdex TM75 26/60 Säule abgetrennt werden (Abbildung 4-34). Die Ausbeute an *IadA* betrug 80 mg Protein pro Liter Kulturmedium.

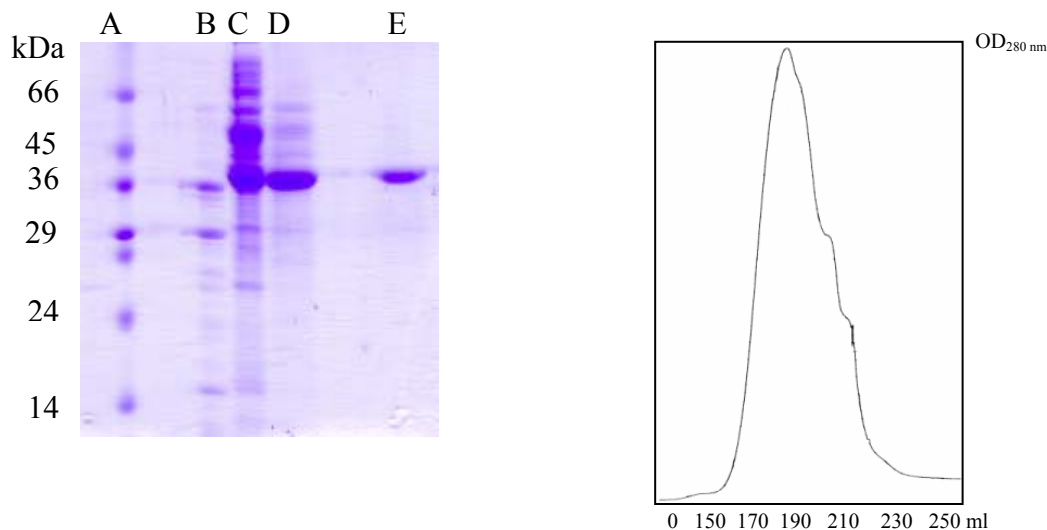


Abbildung 4-34: a) Coomassiegefärbtes, 12 %iges (w/v) SDS-PAGE Gel der einzelnen Reinigungsschritte der Isoaspartyl Dipeptidase: (A) *low-range* Marker, (B) *E. coli*-Lysat, (C) nach DE52, (D) nach Phenyl Sepharose, (E) Isoaspartyl Dipeptidase nach Gelfiltration; b) Elutionsprofil der Isoaspartyl Dipeptidase nach Gelfiltration mit einer High Load Superdex 75.

4.3.2 Kristallisation der Isoaspartyl Dipeptidase

IadA konnte bei 20 °C durch Dampfdiffusionsexperimente nach der Methode des „sitzenden Tropfens“ kristallisiert werden. Eine geeignete Kristallisationslösung wurde mit Hilfe von *incomplete factorial screens* (Carter & Carter, 1979) gefunden (Abbildung 4-35). Tropfen aus 2 µl Proteinlösung (17,49 mg/ml) und 2 µl Reservoirlösung (0,1 M Li₂SO₄; 0,1 M Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat, pH 5,6; 12 % w/v PEG 4000 oder 20% PEG 3350;

0,2 M NH_4F , pH 6,2) wurden gegen 300 μl Reservoirlösung äquibriert. Um mehr Informationen über die Substratbindungstasche der IadA zu erhalten, wurde die Präzipitanlösung mit 4 mM Inhibitor bzw. 2 mM Asparagin versetzt.

Kristalle der Größe $0,5 \times 0,3 \times 0,25 \text{ mm}^3$ (Abbildung 4-35) wuchsen reproduzierbar innerhalb von einer Woche. Die Kristalle konnten zum Ernten in der Kapillare mit Reservoirpuffer überschichtet werden, ohne daß ihre Streufähigkeit beeinträchtigt wurde. Zum Einfrieren der Kristalle unter Vermeidung von Eisreflexen konnte eine Lösung benutzt werden, die 20 % PEG 300 enthielt und ansonsten der Zusammensetzung der Reservoirlösung entsprach. Sowohl die Kristalle des nativen Enzyms als auch die Kristalle mit gebundenem Inhibitor bzw. Asparagin erreichten erst nach zwei bis drei Monaten eine Zinkbesetzung von ca. 60 %.

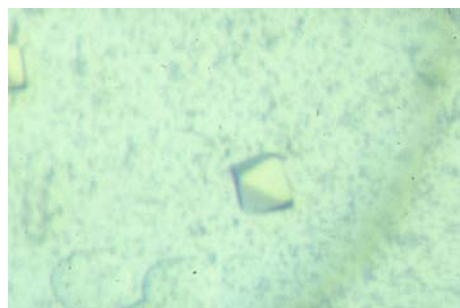


Abbildung 4-35: Kristallbild der IadA. Der Kristall wurde durch Dampfdiffusion gegen 0,1 M Li_2SO_4 ; 0,1 M Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat, pH 5,6 und 12 % PEG 4000 erhalten. Die Größe von $0,5 \times 0,3 \times 0,25 \text{ mm}^3$ hatte der Kristall nach einer Woche erreicht.

4.3.3 Aufklärung der Raumstruktur der Isoaspartyl Dipeptidase

Die IadA-Kristalle beugten bei RT auf einer Diffraktionsanlage mit einem *image plate* Detektor und einem Rigaku-Röntgengenerator mit rotierender Kupferanode bis 2,8 Å Auflösung. Nach dem Einfrieren eines Kristalls konnte an der BW6 *beamline* am DESY in Hamburg mit einem MAR Research CCD-Detektor gemessen werden.

Das Vorhandensein von Zinkionen im Kristall ermöglichte die Ermittlung experimenteller Phasen durch ein MAD-Experiment. Es wurden drei verschiedene Datensätze (Tabelle 4-5, Abbildung 4-36) bei verschiedenen Wellenlängen und Auflösungen gemessen. Um die Vollständigkeit der Friedel-Paare zu gewährleisten, wurde jeder Datensatz in zwei um 180° versetzten Sektoren von jeweils 90° bei einer Rotation von 1° pro Bild aufgenommen.

Tabelle 4-5: Datensammlung und Statistik der Phasierung

Datensammlung	f' -Minimum ($\lambda 2$)	f'' -Maximum ($\lambda 1$)	remote point ($\lambda 3$)
Wellenlänge (Å)	1,2830	1,28170	1,0500
Auflösung (Å)	19,803 – 2,0	19,803 – 2,0	19,803 – 2,0
Multiplizität	3,80	3,47	1,41
Zahl der Reflexe	64424	60181	60055
Vollständigkeit (%)	94,2	94,6	90,2
(äußerste Schale) (%)	94,2	92,4	87,8
(2.03 – 2.00)			
$1/\sigma$	22,65	23,84	14,86
R_{sym}^a (%)	5,5	6,2	4,3

$$^a R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I \rangle_{hkl}|}{\sum | \langle I \rangle_{hkl} |}$$

Die Auswertung der Diffraktionsdaten ergab ein tetragonales Kristallgitter mit Zellkonstanten $a = b = 116,64 \text{ \AA}$, $c = 137,12 \text{ \AA}$. Die systematischen Auslöschungen für 00l mit $l \neq 2n$ und h00 mit $h \neq 2n$ zeigten, daß es sich bei der zweifachen Symmetrieachse um eine Schraubenachse handelt, so daß die Daten in der Folge in der Raumgruppe $P4_21_2$ ausgewertet wurden.

Diffraktionsdaten von beiden IadA-Komplexen wurden bei RT mit einer *image plate* (MAR Research, Hamburg) aufgenommen. Die Kristalle beugten bis zu einer maximalen Auflösung von 2,7 Å für den Asparagin-Komplex und 3,3 Å für den Inhibitor-Komplex.

Als Suchmodell wurde das Modell des nativen Enzyms herangezogen. Die Strukturen der beiden Komplexe wurden mit dem Programm MOLREP (Vagin & Teplyakov, 2000) gelöst. Die Rotations- und Translationssuche ergab zwei eindeutige Lösungen mit einem Korrelationswert von 69,7 % und einem R-Faktor von 32,2 % für den IadA-Inhibitor-Komplex, und einen Korrelationswert von 73,3 % und einem R-Faktor von 31,4 % für den IadA-Asparagin-Komplex (Tabelle 4-6). Atommodelle für die Inhibitoren wurden mit Sybyl (Tripos GmbH, München) erzeugt.

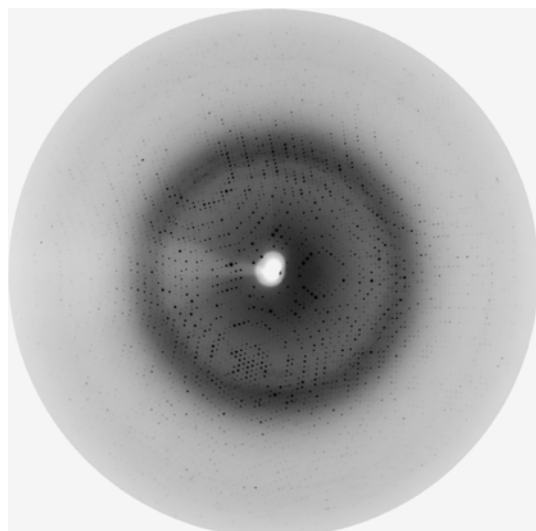


Abbildung 4-36: Beugungsbild einer 1°-Rotationsaufnahme der IadA. Die Auflösung am Plattenrand des CCD-Detektors beträgt 2,0 Å.

Tabelle 4-6: Datensammlung und Statistik der Phasierung

Datensammlung	IadA-Asparagin	IadA- Aspψ[PO ₂ CH ₂]LeuOH
Auflösung (Å)	20,0 – 2,7	26,0 – 3,3
Zahl der Reflexe	24987	14699
Vollständigkeit (%)	93,5	96,8
(äußerste Schale) (%)	92,1 (2,8 – 2,7 Å)	94,4 (3,42 – 3,3 Å)
Rsym ^a (%)	11,8	15,2

$$^a\text{Rsym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I \rangle_{hkl}|}{\sum | \langle I \rangle_{hkl} |}$$

4.3.4 Modellbau und Verfeinerung

Die Lokalisierung der zwei Zink-Lagen erfolgte mit dem Programm RSPS (Knight, 2000). Mit dem Programm MLPHARE (Otwinowski, 1991) konnten die Lagen unter Einbeziehung der anomalen Daten verfeinert werden. In der asymmetrischen Einheit befinden sich zwei IadA-Moleküle. Der Wassergehalt des Kristalls betrug 56,41 % bei einem Matthewscoeffizienten von 2,84. Das Strukturmodell konnte mittels Moleküldynamiksimulation und Verfeinerung unter Verwendung des NCS-Operators mit dem Programm CNS (Brünger et al., 1998) bis zu einer Auflösung von 2,0 Å zu einem R-Faktor von 19,7 % und einem freien R-Faktor von 22,8 % verfeinert werden. In der 2F_o-F_c-Dichte wurde eine durchgängige Elektronendichte für die gesamte Hauptkette erhalten, außer für zwei Reste am C-Terminus und für weitere 15 Reste, die den *active-site loop* bilden. Diese Reste sind in beiden Monomeren nicht sichtbar, was auf eine hohe Flexibilität schließen lässt.

Die stereochemischen Parameter des verfeinerten Modells weisen nur geringe Abweichungen von Standardwerten auf (Engh & Huber, 1991) (Tabelle 4-7).

Tabelle 4-7: Verfeinerungsstatistik der native IadA	
Raumgruppe	P4 ₂ ,2
Zellkonstanten (Å)	a = b = 116,644, c = 137,120
Wassergehalt (%)	56,41
Matthewskoeffizient (Å ³ /Da)	2,84
Anzahl der Reste in der Asymmetrischen Einheit	742
Proteinatome	5500
Anzahl der Wassermoleküle	540
Anzahl der Zinkionen	4
B-Faktoren	
Proteinatome (Å ²)	25,8
Lösungsmittelatome (Å ²)	36,6
Zinkionen (Å ²)	28,3
Auflösungsbereich (Å)	20,0 – 2,0
¹ R-Faktor (%)	19,76
² Freier R-Faktor (%)	22,85
R.m.s. Abweichungen von Idealwerten	
Bindungslängen	0,005 Å
Bindungswinkel	1,43°
$^1 \text{ R-Faktor} = \frac{\sum \ F_{obs} - k F_{calc} \ }{\sum F_{obs} }$	
² Der freie R-Faktor R _{free} wurde mit 10 % der gemessenen Daten berechnet, die nicht für die Verfeinerung verwendet wurden.	

Alle dihedralen Hauptkettenwinkel ϕ und ψ , abgesehen von einigen der variableren Glycinreste, liegen in energetisch günstigen Bereichen des Ramachandran-Plots (Ramachandran & Sasisekharan, 1968), ausgenommen ist der Rest Ala208, welcher jedoch in der Elektronendichte eindeutig definiert ist (Abbildung 4-37). Statistiken zur Strukturverfeinerung der IadA-Komplexe sind in Tabelle 4-8 aufgeführt.

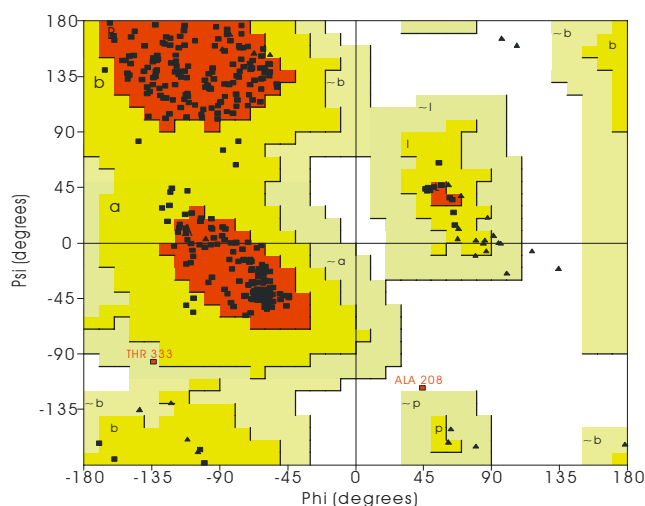


Abbildung 4-37: Ramachandran-Diagramm für das verfeinerte Modell der nativen IadA. Für jede Aminosäure ist ihre ϕ (Abszisse) und ψ (Ordinate)-Winkel dargestellt. Hellgelb entspricht energetisch noch möglichen Regionen und weiß energetisch verbotenen Bereichen.

Tabelle 4-8: Verfeinerungsstatistik der IadA-Komplexe

	IadA-Asparagin	IadA- Asp ψ [PO ₂ CH ₂]LeuOH
Raumgruppe	P42 ₁ 2	P42 ₁ 2
Zellkonstanten (Å)	a = b = 117,475 c = 137,955	a = b = 119,137 c = 138,152
Anzahl der Reste in der asymmetrischen Einheit	746	776
Proteinatome	5564	5729
Anzahl der Wassermoleküle	90	42
Anzahl der Zinkionen	4	4
B-Faktoren		
Proteinatome (Å ²)	40,2	39,39
Lösungsmittelatome (Å ²)	29,6	40,09
Zinkionen (Å ²)	50,7	47,33
Ligand (Å ²)	59,2	42,65
¹ R-Faktor (%)	20,86	24,41
² Freier R-Faktor (%)	26,56	28,58
R.m.s. Abweichungen von Idealwerten		
Bindungslängen	0,006 Å	0,011 Å
Bindungswinkel	1,52°	1,58°

$$^1 \text{ R-Faktor} = \frac{\sum \|F_{obs} - k|F_{calc}|\|}{\sum |F_{obs}|}$$

² Der freie R-Faktor R_{free} wurde mit 10 % der gemessenen Daten berechnet, die nicht für die Verfeinerung verwendet wurden.

4.3.5 Strukturbeschreibung der Isoaspartyl Dipeptidase

Die Einheitszelle beinhaltet zwei gut abgegrenzte Propeller-ähnliche Partikel, die 75 Å im Durchmesser messen und 120 Å zwischen den benachbarten Scheitelpunkten voneinander entfernt liegen. Die Propeller-ähnlichen Partikel setzen sich aus vier Dimeren zusammen, und bilden eine große, zentrale Höhle mit zwei Poren, die exakt auf der vierzähligen Achse liegt (Abbildung 4-38).

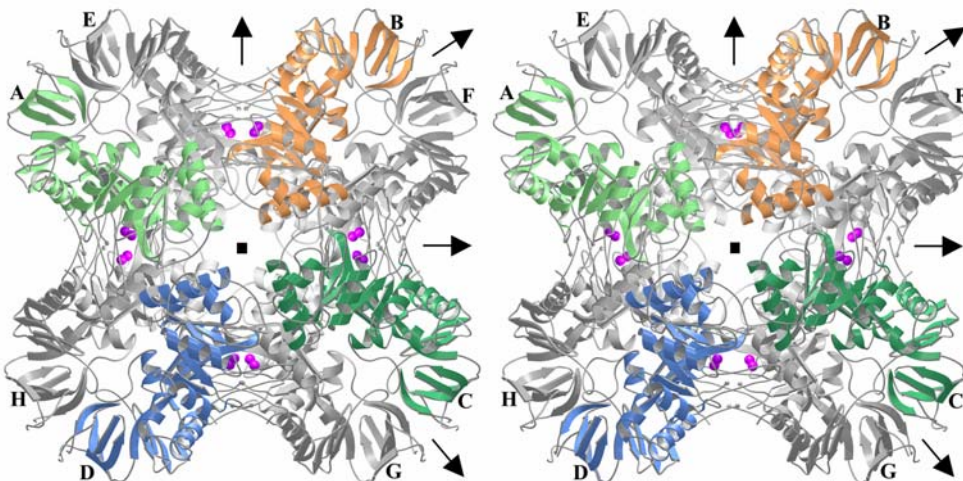


Abbildung 4-38: Stereodarstellung der Quartärstruktur von IadA. Das Oktamer kann als Tetramer von Dimeren mit indizierter 422 Symmetrie angesehen werden. Die Zinkionen sind als Kugeln (purpur) dargestellt. Die Monomermoleküle im Vordergrund sind in hellgrün (A), orange (B), grün (C) und blau (D) dargestellt, während die Monomermoleküle im Hintergrund in grau dargestellt sind. Dimere werden von den Molekülen A-E, B-F, C-G und D-H gebildet.

Aufgrund der Präferenz für saure Reste ist das berechnete Oberflächenpotential der IadA stark negativ. Im Bereich der zentralen Kavität fällt ein ausgeprägter Cluster negativer Ladung auf (Abbildung 4-39).

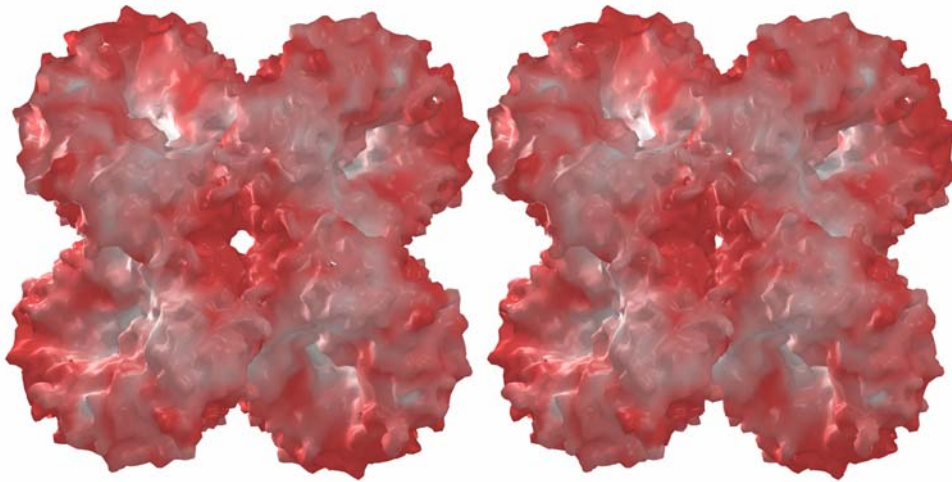


Abbildung 4-39: Ladungsverteilung auf der Oberfläche des Oktamers der IadA. Positive Ladung auf der Proteinoberfläche ist in blau, und negative Ladung in rot dargestellt.

Jedes Oktamer kann alle 45° durch eine exakte, lokale pseudo-zweizählige Rotationsachse zerlegt werden, und überträgt so jedem Partikel eine 422 Punktgruppensymmetrie (Abbildung 4-38). Die Lichtstreuungsexperimente bestätigten, daß diese Oligomere auch in Lösung vorhanden sind.

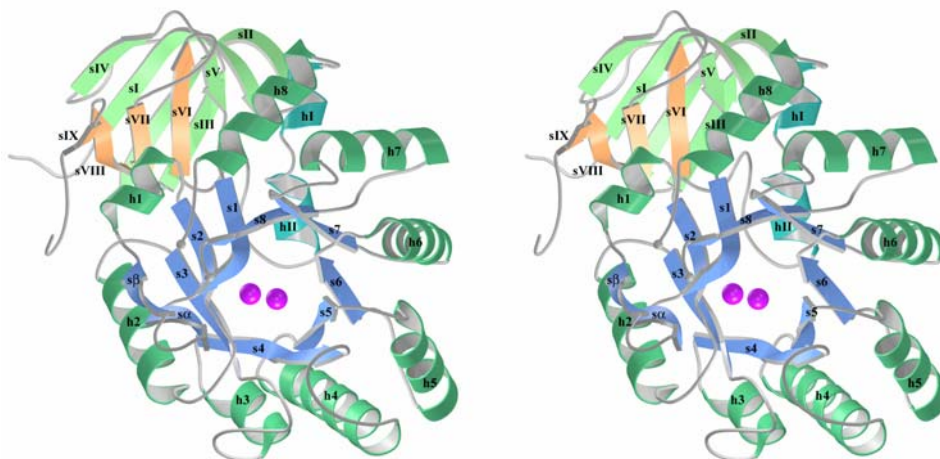


Abbildung 4-40: Stereodarstellung des IadA Monomers. Die α -Helices und β -Stränge, die das $(\alpha/\beta)_8$ -barrel formieren, sind in grün und blau gekennzeichnet. Zwei zusätzliche α -Helices (hI und hII), die sich auf der Rückseite des *barrels* befinden, sind in türkis dargestellt. Die grauen Kugeln indizieren den Anfang und das Ende des *hairpin loops (flap)*, welcher in der nativen Struktur nicht definiert ist. Die β -Stränge der β -sandwich Domäne (Rest 1-61 und 348-390) sind in hellgrün und orange gekennzeichnet.

Das Monomer der IadA besitzt eine sichelförmige Struktur und besteht aus zwei Domänen, einer katalytischen Domäne, an die eine β -sandwich Domäne seitlich angrenzt. Die Struktur der katalytischen Domäne hat die Form eines abgeflachten Ellipsoids. Sie wird durch die Reste 55-354 gebildet und beinhaltet alle zinkbindenden und katalytischen Reste, zusammen mit den zwei Zinkionen.

Die katalytische Domäne ähnelt einem elliptisch verzogenen $(\alpha/\beta)_8$ Triosephosphat Isomerase TIM-barrel, das durch acht α -Helices an den Außenseiten flankiert wird (Abbildung 4-40) (Farber & Petsko, 1990; Nagano et al., 2002). Das Innere des barrel ist hauptsächlich hydrophober Natur. Der barrel Ausgang, der von den C-terminalen Enden der β -Stränge gebildet wird, wird dort durch eine Tunnel-ähnliche Tasche, die von den zinkkoordinierenden und katalytischen Resten umsäumt ist, begrenzt. Die zinkbindenden und katalytischen Reste werden von den C-terminalen Enden der Stränge s1, s4, s5, s6 und s8 zur Verfügung gestellt (Abbildung 4-40 und 4-41).

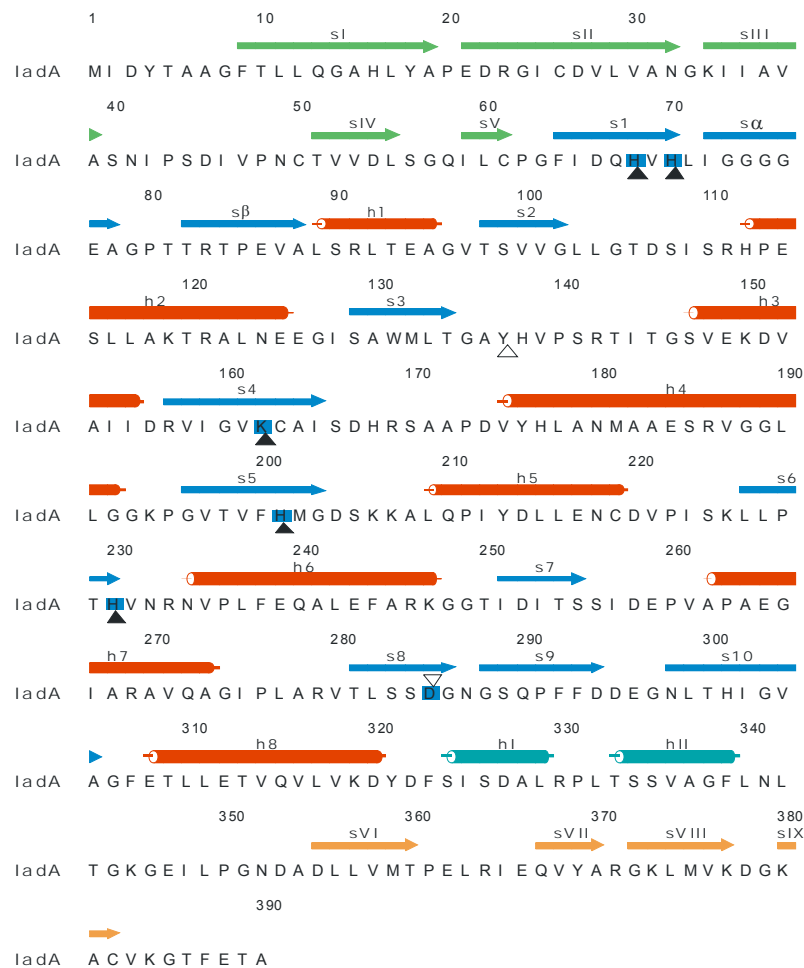


Abbildung 4-41: Sekundärstrukturdarstellung der IadA. α -Helices und β -Stränge der katalytischen Domäne sind als Zylinder (rot) und Pfeile (grün) gekennzeichnet. Zinkbindende Reste sind blau unterlegt. Die zink- und substratbindenden Reste sind als geschlossene und offene Dreiecke dargestellt.

In der unteren Hälfte wird die katalytische Vertiefung durch die herausragenden *loops* zwischen s1-h1 (welche die Stränge s α und s β bilden), s2-h2 und s4-h4 begrenzt.

In der Komplex-Struktur wird diese „Halsband“-ähnliche Struktur von einem gegenüberliegenden s8-h8 *hairpin loop* bedeckt, der sich aus den Resten 288-304 zusammensetzt (hier als s9 und s10 beschrieben). Der *loop* übernimmt die Funktion einer „Klappe“ und ist in der nativen Struktur ungeordnet. Die gegenüberliegende Seite des *barrels* (entspricht dem Eingang des *barrels*), wird durch eine zweiteilige Helix hI/hII und dem darauffolgenden *loop* Segment begrenzt.

Die β -*sandwich* Domäne besteht aus einem zweigeteilten U-förmigen β -Faltblatt, das sich aus den N-terminalen Strängen sI-sV und den C-terminalen Strängen sIV-sIX bildet, und so ein fünfsträngiges und ein viersträngiges Faltblatt formt (Abbildung 4-40). Diese Domäne ist über zwei kurze Linker seitlich an die katalytische Domäne angehängt, welche sich aus den Resten Pro62-Gly63 und Thr343-Glu347 bilden, und ist somit dem aktiven Zentrum gegenüberliegend. Die β -*sandwich* Domäne besitzt eine strukturelle Rolle, indem sie mit der äquivalenten Domäne des Dimerisierungspartners interagiert (Abbildung 4-38).

Jedes Dimer besteht aus zwei sichelförmigen Monomeren, die um eine lokale zweizählige Achse arrangiert sind. Somit ist sowohl die β -*sandwich* Domäne als auch die katalytische Domäne in der Lage, zwei essentielle hydrophobe Kontakte mit dem jeweiligen Dimerisierungspartner auszubilden. Der erste Kontakt wird durch die *loop* Regionen des viersträngigen β -Faltblatts der β -*sandwich* Domäne gebildet, und schirmt 700 Å² der Moleküloberfläche vom Lösungsmittel ab. Der zweite Kontakt bedeckt insgesamt 680 Å² der Moleküloberfläche, und wird durch die Seitenketten der Helix h3 und dem s3-h3 *loop* der katalytischen Domäne vollzogen.

Die Dimere sind über eine exakte vierzählige Rotationsachse arrangiert, und bilden so das Oktamer. Es besitzt eine zentrale Kavität mit einem Innendurchmesser von 30 Å. Diese ist über zwei Poren (6 Å Durchmesser), die sich jeweils an der Vorder- und Rückseite des Oktamers befinden, zugänglich (Abbildung 4-38). Die asymmetrischen Kontakte zwischen dem oberen und unteren Tetramer-Ring werden vorwiegend von den Resten des s4-h4 *loops* und der Helix h4 mit den Resten des h5-s6 *loops* gebildet, und bedecken 675 Å² der Moleküloberfläche. Symmetrische Kontakte zwischen dem oberen und unteren Tetramer-Ring werden durch den *hairpin* Strang s β , Helix h2 und dem C-terminalen Ende vermittelt.

Die Poren werden durch die s4-h4 *loops* und Helix h4 formiert. Die Erzeugung eines stark negativen elektrostatischen Potentials wird durch Asp174 verursacht, welches in die Pore hineinragt (Abbildung 4-39). Die aktiven Zentren sind nicht der zentralen Kavität zugewandt,

vielmehr sind sie zum Nachbar-Dimer gerichtet, und somit gut zugänglich für Substrate (im freien Status, mit geöffnetem *flap*).

4.3.6 Aktives Zentrum des nativen Enzyms

Im aktiven Zentrum sind vier Histidine, ein carbamoyliertes Lysin und ein Aspartat an der Bindung der Zinkionen beteiligt. Diese Reste sind alle am C-terminalen Ende des zentralen β -Faltblatts der β -Stränge s1 (His68 und His70), s4 (Lys162), s5 (His201), s6 (His230), und s8 (Asp285) lokalisiert. In der nativen Struktur sind alle Liganden sowie die zwei Zinkionen gut in der Elektronendichte definiert (Abbildung 4-42), mit einem Abstand zwischen den beiden Zinkionen von 3,5 Å.

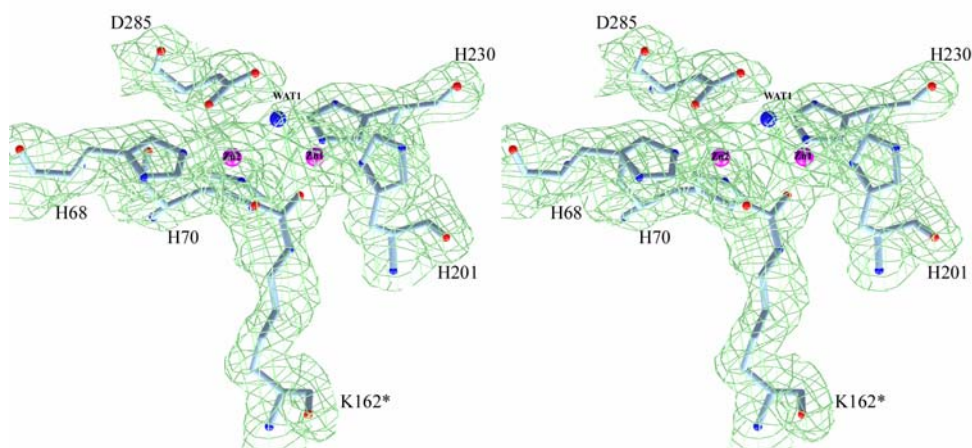


Abbildung 4-42: Stereodarstellung der auf 1σ konturierten $2F_o-F_c$ -Elektronendichte der IadA. Zinkionen bzw. Wassermoleküle sind als Kugeln dargestellt.

Das weniger dem Lösungsmittel exponierte Zink 1 wird pentakoordiniert in einer trigonalen bipyramidalen Anordnung durch die Reste His68, His70 und ein Wassermolekül (Wat1), die alle in einer Ebene mit dem Zink liegen. Apikale Liganden sind das Sauerstoffatom des carbamoylierten Lys162 (der erste bidentale Ligand) sowie einer der Carboxylsauerstoffe von Asp285.

Zink 2, das dem Lösungsmittel mehr zugewandt ist, wird tetrakoordiniert durch das zweite Sauerstoffatom des carbamoylierten Lys162, N δ 1 von His201, N ϵ 1 von His230 und von Wat1 (zweiter bidentaler Ligand) mit einer durchschnittlichen Distanz von 2,2 Å, während Tyr137 weiter entfernt liegt (3,3 Å)(Abbildung 4-43).

Die zinkkoordinierenden Histidin-Seitenketten bilden weiterhin Wasserstoffbrücken mit ihren freien Aminogruppen N δ 1 oder N ϵ 1 zu benachbarten Aminosäuren und intern geordneten Wassern aus.

4.3.7 Zinkumgebung bei der Inhibitorbindung

IadA konnte mit dem Übergangszustand analogen Phosphatininhibitor Asp Ψ [PO $_2$ CH $_2$]LeuOH kristallisiert werden, in dem die Peptidbindung zwischen P1-Asp und P1'-Leu (mit P1 und P1', die für die Substrat/Inhibitor Reste der N-terminalen und C-terminalen Peptidbindung stehen, und S1 und S1' als gegenüberliegende Substratbindungstasche) durch eine Phosphinat-Gruppe ausgetauscht ist.

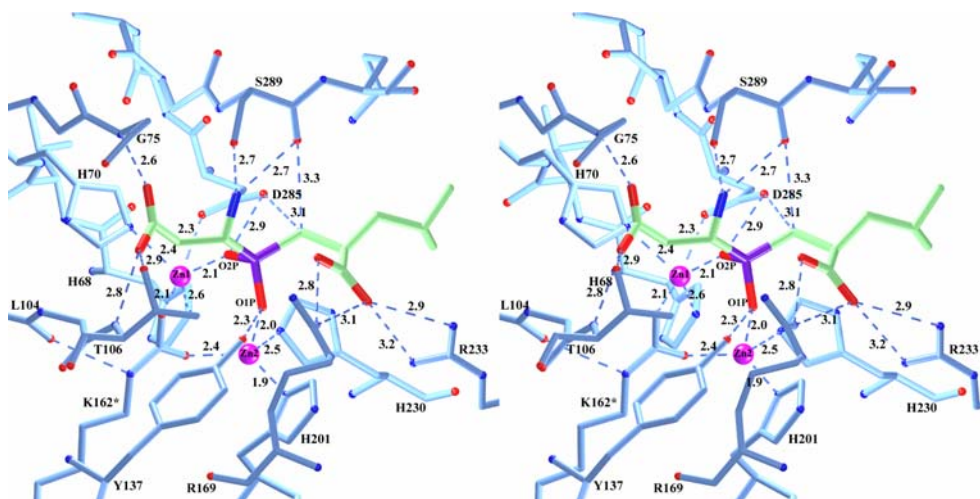


Abbildung 4-43: Stereodarstellung der Substratbindungstasche in IadA in Standardorientierung. Die Kohlenstoffatome des Phosphatininhibitors Asp Ψ [PO $_2$ CH $_2$]LeuOH sind in grün, die Sauerstoffatome in rot und die Stickstoffatome in blau gekennzeichnet. Das IadA-Gerüst ist in blau dargestellt. Die Wasserstoffbrücken sind als blaue Linien gezeichnet.

Aus der diastereomären Mischung hat das S-Stereoisomer, welches einem L,L-Aminosäuredipeptid entspricht, bevorzugt gebunden. Es findet eine starke Wechselwirkung der beiden Carboxylgruppen des Inhibitors mit hauptsächlich polaren Resten der IadA statt (Abbildung 4-43 und 4-44). Eine wesentliche Konformations- bzw. Positionsänderung der inhibitorkoordinierenden Reste findet nicht statt, ausgenommen ist der sogenannte *active-site flap*, der in der Komplex-Struktur eine geordnete Konformation annimmt, und so das Aktivzentrum unzugänglich für weitere Substrate macht. Der flexible

β -*hairpin loop*, speziell der N-terminale Strang, der aus den Resten Gly288–Phe292 gebildet wird, nimmt an der Bildung der Substratbindungstasche teil, indem er die Abschirmung des gebundenen Inhibitors bzw. Substrats und die Orientierung der zu spaltenden Bindung gewährleistet.

Ein weiterer Komplex mit Asparagin, das in die S1'-Tasche bindet, sowie ein Sulfation, welches analog zu der Carboxylgruppe der Asp-P1-Seitenkette im Inhibitor-Komplex gebunden hat, unterstreicht den *anion hole* Charakter dieser Höhle. Die Seitenkette von Asparagin bildet Wasserstoffbrücken mit den in der Carboxylatgrube (*carboxylate groove*) lokalisierten Argininen (Arg169 und Arg233) aus. Eine weitere Interaktion der N δ 2-Gruppe von Asparagin wäre auch mit der Seitenkette von Ser289 möglich. Eine ähnliche Wechselwirkung wäre mit einem Asparat in der Position von Asparagin möglich, da Ser289 sowohl als Wasserstoffdonor wie auch Akzeptor fungieren könnte. Der *active-site loop*, der in der Inhibitor-Struktur eine geschlossene Konformation annimmt, ist in diesem Komplex zwischen den Resten 290 bis 299 ungeordnet.

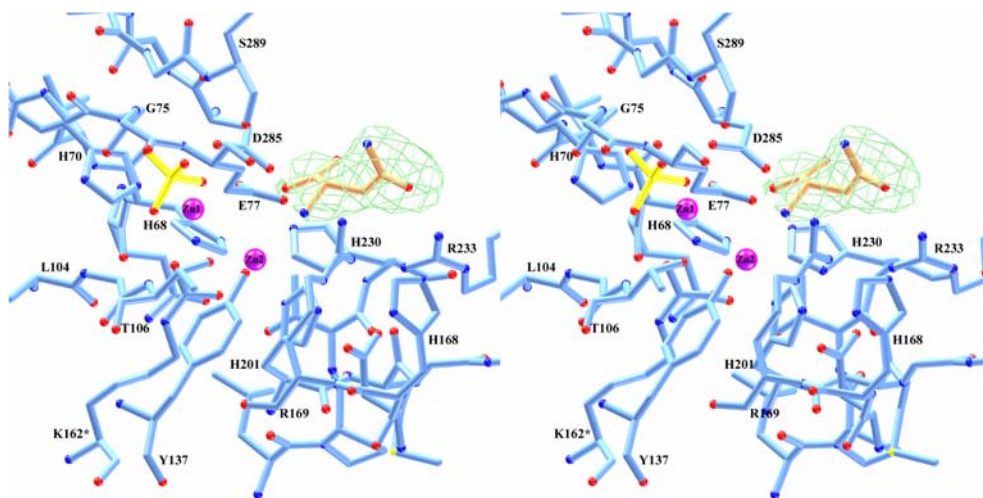


Abbildung 4-44: Stereodarstellung der IadA Substratbindungstasche mit gebundenem Asparagin in Elektronendichte, die bei 1 σ konturiert ist.

Die Carboxylseitenkette von Asp1I ist in eine schmale Höhle eingebettet, die über einen vier Reste langen *glycine stretch* (Gly73–Gly76) zugänglich gehalten wird. Die Carboxylgruppe von Asp1I bildet Wasserstoffbrücken zu den Aminohauptkettengruppen der Reste Thr106 und Gly75, sowie zur Seitenkette der Aminosäure Thr106 aus.

Die α -Aminogruppe des Inhibitors ist dem *hairpin flap*, der sich aus den Resten Asn287–Ala305 bildet, zugewandt und kann so Wasserstoffbrücken zu Ser289 O und O γ ausbilden

Dieser Kanal bietet Raum für kleine Reste mit hydrophilen Seitenketten in der P1'-Position, die somit die Möglichkeit hätten mit Gln290 zu interagieren, oder für Aminosäuren mit größeren hydrophoben Seitenketten, die Platz zwischen Phe290 und Ile257 finden könnten. Arginine oder sogar Lysine in der P1'-Position könnten einen Kontakt mit Asp258 und Glu259 ausbilden, die sich am Kanalausgang befinden (Abbildung 4-45).

4.3.8 Strukturelle Homologie mit anderen Enzymen

Aufgrund des *TIM-barrels* besitzt die IadA eine ausgeprägte Ähnlichkeit zu vielen *TIM-barrel* ähnlichen Strukturen (Nagano et al., 2002). Die zum Eingang des *barrels* auslaufenden Stränge s1, s2 und s3 führen dazu, daß die meisten *TIM-barrel* ähnlichen Strukturen stärkere Abweichungen zur IadA zeigen (50 % oder weniger der C α -Kohlenstoffatome besitzen eine r.m.s.-Abweichung von 1,8 Å, unter Berücksichtigung einer maximalen Abweichung von 2,5 Å).

Eine signifikant stärkere Ähnlichkeit ist zu den Pyrimidasen und Amidohydrolasen, wie z.B. L- und D-Hydantoinasen, Adenosin- und Cytosindeaminasen, Dihydroorotasen, Phosphotriesterasen und Ureasen (Holm & Sander, 1997) vorhanden, die diverse hydrolytische Reaktionen in Purinen, Pyrimidinen, Cytosinen, Histidinen und im Harnstoffabbau katalysieren, jedoch auch an der Pyrimidin-Biosynthese, Detoxifizierung und Aminoacylierung teilnehmen. Die größte Ähnlichkeit besitzt die IadA zu einer Reihe von Strukturen mit einem binuklearen Zentrum, wie z.B. zur D-Hydantoinase aus *Thermus sp.* (Abendroth et al., 2002) und L-Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* (Abendroth et al., 2002), die alle binukleare Aktivzentren besitzen, sowie zu der α -Untereinheit der Urease aus *K. aerogenes* (Jabri et al., 1995) und *B. pasteurii* (Benini et al., 1999), die kein Zink als Metall, sondern Nickel im aktiven Zentrum besitzen. Zudem besitzen diese vier Enzyme auch eine ähnliche β -sandwich Domäne (Abbildung 4-46).

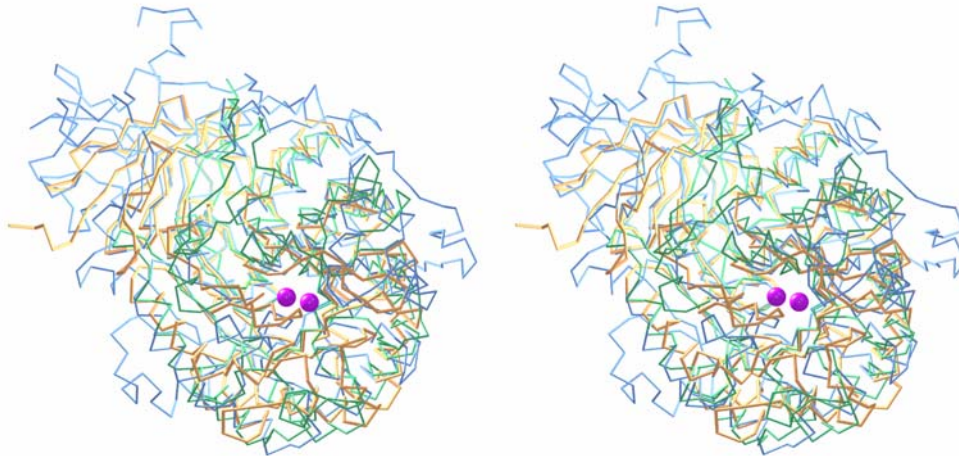


Abbildung 4-46: Stereodarstellung der überlagerten Kristallstrukturen von IadA (orange) mit Urease (blau) und Dihydroorotase (grün).

Die Ca -Kohlenstoffatome der β -sandwich Domänen der unterschiedlichen Enzyme sind bis zu 70 % äquivalent, mit einer r.m.s.-Abweichung von 1,4 Å für die Hydantoinasen und 1,5 Å für die Ureasen.

Weitere eng verwandte Enzyme mit binuklearen Zink-Aktivzentren sind die Dihydroorotase aus *E. coli* (Thoden et al., 2001) und die Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta* (Benning et al., 1994), welche sich lediglich aus einer katalytischen Domäne zusammensetzen, und eine Ähnlichkeit von 67 % bzw. 69 % zur katalytischen Domäne der IadA zeigen, mit einer r.m.s.-Abweichung von 1,61 Å bzw. 1,46 Å.

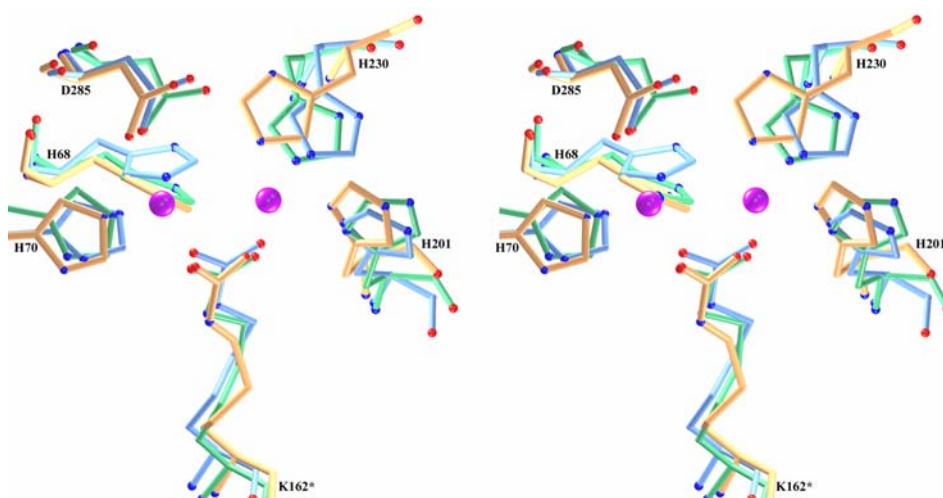


Abbildung 4-47: Überlagerung der Zink-bindenden Reste von IadA (orange), Urease (blau) und Dihydroorotase (grün). Das Alignment wurde mit dem Programm TOP3D erstellt.

Die Ähnlichkeit zu den mononuklearen Enzymen wie Adenosin- (Wilson et al., 1991) und Cytosindeaminase (Ireton et al., 2002) ist geringer (r.m.s.-Abweichung von 1,7 Å). Die Sequenzidentität zwischen diesen strukturell homologen Enzymen und IadA basierend auf einem topologischen Alignment sind relativ gering, z.B. nur 12 % und 7 % der *K. areogenes* Urease und der *E. coli* Dihydroorotase.

Eine wesentlich größere Ähnlichkeit bezüglich der Sequenz und Struktur beschränkt sich auf die Aktivzentren und deren unmittelbaren Umgebung in IadA, Dihydroorotase und Urease sowie beiden Hydantoinasen (Abbildung 4-46 und 4-47).

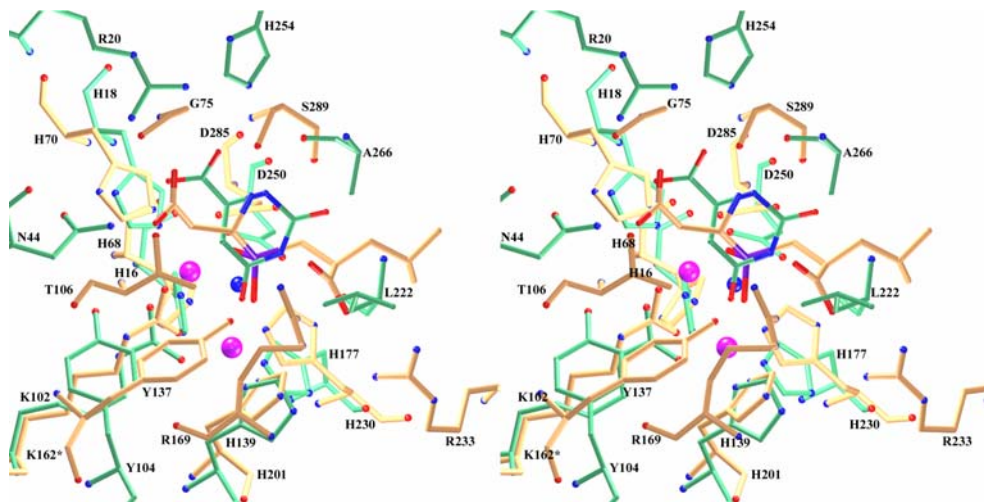


Abbildung 4-47: Stereodarstellung der überlagerten Aktivzentren von IadA (orange) und Dihydroorotase (grün).

Erwähnenswert ist das Vorhandensein einer Tyrosin-Seitenkette in der Struktur der D-Hydantoinase und Dihydroorotase, welche eventuell äquivalent zu Tyr137 in IadA wirken könnte. In Gegensatz zur Ähnlichkeit der katalytischen Reste, sind Reste, die an der Fixierung und Positionierung der entsprechenden Substrate beteiligt sind, komplett unterschiedlich.

Interessanterweise ist in fast allen IadA Homologen das Aktivzentrum von *loops* umgeben, welche aus dem $(\alpha/\beta)_8$ -barrel herausragen, und deutlich unterschiedliche Konformationen aufweisen. Wahrscheinlich agiert der *flap* als eine Art „Klappe“, der die Bindung von einem Substrat und dessen Übergangszustand stabilisiert. Von den oben erwähnten IadA verwandten Enzymen konnte ein „Klappen“-ähnlicher Mechanismus eines *loops* bislang nur für den exponierten *helix-turn-helix loop* (s7-h7) in der Urease von *B. pasteurii* nachgewiesen werden (Benini et al., 1999).

5. Diskussion

5.1 ProMMP-1

Die hier beschriebene Struktur ist die Vollängen Proform der ProMMP-1. Rekombinante humane ProMMP-1 konnte als Mutante, in der das katalytisch essentielle Glu219 durch ein Alanin ersetzt wurde, exprimiert werden. Die Mutante war damit deutlich gegenüber Autoproteolyse stabilisiert und konnte somit als Proform kristallisiert werden. Die Struktur konnte mittels MAD gelöst werden.

Die Kristallstruktur von ProMMP-1 zeigt drei deutlich unterscheidbare Domänen. Die Prodomäne von ProMMP-1 nimmt eine globuläre Struktur an, und setzt sich aus einem Cluster von drei α -Helices zusammen, die durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk stabilisiert werden. Dieses Faltungsmotiv ähnelt dem von ProMMP-2 (Morgunova et al., 1999), ProMMP-3 (Becker et al., 1995), ProMMP-9 (Elkins et al., 2002) sowie der N-terminalen Domäne der D-alanyl-D-alanyl Carboxypeptidase aus *Streptomyces albus* (Dideberg et al., 1982; Ghuyssen et al., 1994). Alle bekannten Prodomänen stimmen darin überein, daß die drei α -Helices die *cystein-switch* Region stabilisieren, welche in das jeweilige Aktivzentrum bindet. Dabei werden die Substratbindungstaschen S2–S3' besetzt, und das katalytisch aktive Wassermolekül durch ein ungepaartes Cystein als Zinkbindungspartner verdrängt. Die helikalen Regionen sind bei allen drei MMPs sehr ähnlich, größere Sequenz- und Strukturunterschiede finden sich in den dazwischen liegenden *loop* Regionen, was wahrscheinlich den unterschiedlichen Aktivierungsmöglichkeiten Rechnung trägt (Abbildung 4-8).

Die Architektur der katalytischen Domäne wird durch ein fünfsträngiges β -Faltblatt dominiert und durch drei α -Helices ergänzt. Weiterhin ist die katalytische Domäne ähnlich zu anderen MMPs. Der Austausch von Glu219 gegen ein Alanin zeigt keinen Effekt in der Anordnung im Aktivzentrum. Ein besonderes Merkmal des Aktivzentrums von ProMMP-1 ist die für MMPs kleine hydrophobe S1'-Tasche mit positiv geladener Oberfläche an deren Grund, was durch die Seitenkette von Arg214 hervorgerufen wird. Arg214 ist im N-terminalen Bereich der *active-site* Helix hB lokalisiert.

Bislang wurden für MMPs zwei Typen von S1'-Spezifitätstaschen beschrieben. Bei den meisten ist sie, bedingt durch ein Leucin, das die Position des Arginins von MMP-1 inne hat, eine große offene Tasche, die durch die Domänen hindurchreicht. Auf der anderen Seite ist sie eine kleine Tasche wie bei MMP-7 und MMP-1, welche in der äquivalenten Position ein Tyrosin beherbergen. Eine Ausnahme bildet MMP-8, die eine mittelgroße Tasche aufweist,

bedingt durch Arg243 des Spezifitätsloops (Bode et al., 1994). Im freien Zustand scheint zudem die Seitenkette von Asn180 den Zugang zur S1'-Tasche zu behindern (Moy et al., 1998). Geringe Sequenzunterschiede innerhalb der MMPs in der Nähe der Aktivzentren sind offenbar für die teils beträchtlichen Aktivitätsunterschiede verantwortlich. Diese Unterschiede führen somit neben den vermuteten Bindestellen auf den anderen Domänen zu einer selektiven Inhibitor- bzw. Substratbindung. Bei der Erzeugung von selektiven Inhibitoren wurden hauptsächlich die Beschaffenheit der S1'–S3'-Taschen einbezogen. Interessanterweise zeigt die Struktur von MMP-1 (Schwein) mit gebundenem Inhibitor, daß die Seitenkette von Arg214 sich auch aus ihrer ursprünglichen Position verdrängen läßt, und so die Bindung von synthetischen Inhibitoren mit großen P1'-Resten ermöglicht (Lovejoy et al., 1999).

Die PEX-Domäne zeigt den MMP typischen vierblättrigen Propeller (Li et al., 1995; Libson et al., 1995). Überraschenderweise ist der *loop* zwischen β -Strang Ib3 und Ib4 des ersten Propellerblattes zur Prodomäne gerichtet, und bindet diese über einen hydrophoben Kontakt und zwei Wasserstoffbrücken (Glu82 und Tyr309; Lys74 und Phe308) (Abbildung 4-15). Eine solche Interaktion konnte bei MMP-2 nicht beobachtet werden. Dort ergibt sich eine Interaktion der Prodomäne mit der katalytischen Domäne durch den deutlich längeren N-Terminus, der an die Fibronektin-TypII-Domänen heranreicht (Morgunova et al., 1999).

Im Kristall zeigt sich ein über die PEX-Domänen vermitteltes Homodimer, bei dem die Moleküle A und B durch eine 162° Rotation entlang einer Achse miteinander in Verbindung stehen, die senkrecht zu den Propellerachsen verläuft (Abbildung 4-10 und 4-11). Das Vorhandensein dieses Dimers in Lösung konnte durch Gelfiltrationsexperimente bestätigt werden. Interessanterweise zeigt genau dieser Bereich um das vierte Propellerblatt in allen bekannten PEX-Strukturen eine höhere Mobilität (Cha et al., 2002), während Verschiebungen der Propellerblätter I und II geringer ausfallen. Dies könnte ein Ausdruck der Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Bindungspartner sein. Eine Korrelation zwischen Mobilität und Dimerisierung konnte z.B. für die PEX-Domäne von MMP-9 festgestellt werden (Cha et al., 2002). Die Bildung des Homodimers wird vor allem durch den exponierten vierten Strang des vierten Propellerblattes der PEX-Domäne vermittelt. Die Reste, die an der Dimerisierung beteiligt sind, sind in den bekannten MMP-1 Sequenzen hoch konserviert (Abbildung 4-17 und 4-18). Basierend auf dem Homodimer von ProMMP-1, das in der Kristallanordnung beobachtet werden konnte, konnte der *in vivo* beobachtete Komplex zwischen MMP-9 und MMP-1 simuliert werden. Da beide kristallographische Hämopexin-Dimere asymmetrische Bindungsflächen aufweisen, wurden die vier möglichen Bindungen getestet. Dabei beträgt die Kontaktfläche zwischen PEX1 (A) oder PEX1 (B) mit PEX9 (A)

für beide Komplexe ca. 1630 \AA^2 , während die Kontaktfläche von PEX1 (A) oder PEX1 (B) mit PEX9 (B) nur 1342 \AA^2 bzw. 1405 \AA^2 umschließt. Somit bilden PEX1 (A) bzw. (B) mit PEX9 (A) die günstigsten Dimerkontakte aus. Die Bildung von Wasserstoffbrücken erfolgt hauptsächlich mit der C-terminalen Region von MMP-9, der Kontakt ist vorwiegend hydrophober Natur. Die Reste Ser280, Arg443, Arg453, Ile454, Leu457 und Lys459 der PEX-Domäne von ProMMP-1 und die Reste Asp651, Phe678, Trp680, Val691, Val694, Tyr696, Glu706 und Asp707 der PEX-Domäne von MMP-9 sind vorwiegend an der Ausbildung dieser Interaktion beteiligt (Abbildung 5-1). Eine ähnliche Anordnung wurde auch von Cha und Mitarbeitern für die Simulation mit monomerer Schweine-MMP-1 favorisiert (Cha et al., 2002). Die Asymmetrie bei dieser Komplexbildung ist ein Indiz für die Kompetenz dieses Bereiches, heteromere Komplexe zu bilden.

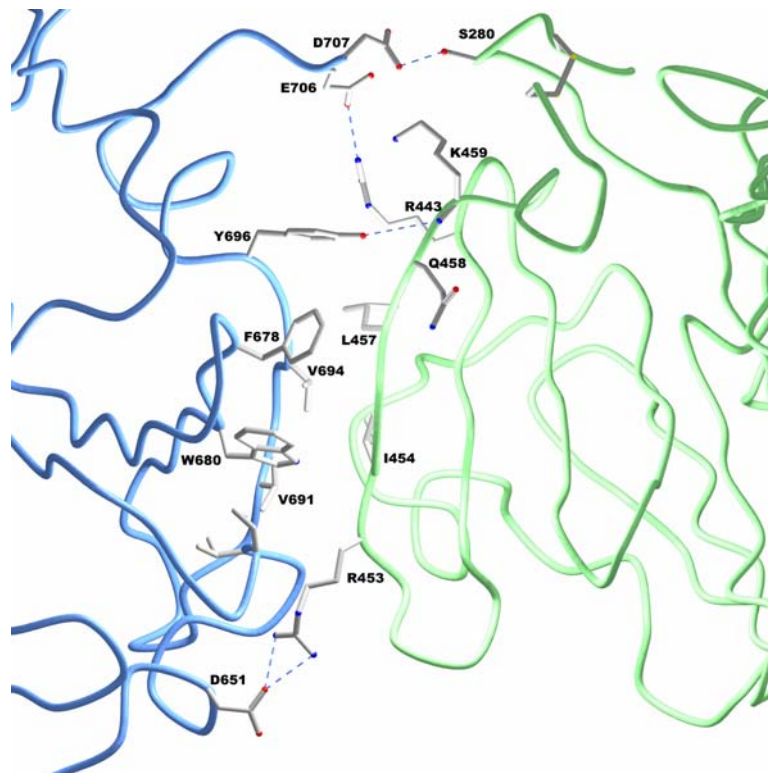


Abbildung 5-1: Modellierter Komplex aus PEX1 (B) (grün) mit PEX9 (A) (blau). Die Interaktionen von PEX1 (B) mit PEX9 (A) sind als gestrichelte Linien dargestellt.

Interessanterweise überlappt die Bindungsstelle von TIMP-2 auf der PEX-Domäne von ProMMP-2 auch mit den Dimerisierungsstellen von MMP-1 und MMP-9 (Morgunova et al., 1999; Morgunova et al., 2002; Cha et al., 2002). Die Dimerisierung von MMP-14 (MT1-MMP) wird ebenfalls durch die PEX-Domänen bewerkstelligt (Itoh et al., 2001).

Sequenzvergleiche lassen darauf schließen, daß PEX14 wahrscheinlich ein ähnliches Erkennungsmotiv wie humane MMP-1 und MMP-9 besitzt (Cha et al., 2002).

5.1.1 Modell für die Erkennung und Prozessierung von tripelhelikalem Kollagen

In die Erkennung und Prozessierung von natürlichen Kollagen-Substraten ist die PEX-Domäne wie auch das Aktivzentrum involviert (Allan et al., 1991; Schnierer et al., 1993; Murphy & Knäuper, 1997). Es ist allgemein akzeptiert, daß fibrilläres, tripelhelikales Kollagen nicht in das Aktivzentrum paßt, was ein Aufwinden der Tripelhelix erforderlich macht. Zudem ist zu beachten, daß die Tripelhelix gebunden bleibt bis der Strang gespalten wird. Knäuper und Mitarbeiter haben festgestellt, daß weiterhin die Aminosäuresequenz des Linkers für die Kollagenbindung entscheidend ist (Knäuper et al., 1997). Die Hauptbeteiligung wird von den zahlreichen Prolinen vermittelt. Chung und Mitarbeiter konnten durch die Konstruktion von Proteinchimären zusätzlich die Bedeutung der Region um das Tyr210 für die Kollagenaseaktivität hervorheben (Chung et al., 2000). Sie fügten verschieden große Bereiche von MMP-1 in die Sequenz von MMP-3 ein (vom C-terminalen Ende her). Ihre Resultate zeigen, daß eine neun Aminosäuren lange Region (²⁰²RWTNNFREY²¹⁰), die zwischen dem fünften β -Strang und der zweiten α -Helix in der katalytischen Domäne lokalisiert ist, für die Kollagenaseaktivität mitverantwortlich ist. Eine Mutation von Tyr210 in MMP-1 zu Threonin, dem entsprechenden Rest in MMP-3, resultiert in einer fünffach verringerten Aktivität von MMP-1 (Chung et al., 2000).

Eine Strukturüberlagerung und Sequenzanalyse zeigt, daß Tyr210 bei allen kollagenabbauenden MMPs hoch konserviert ist. Weitere Untersuchungen zeigen, daß die Region um Tyr210 nur in Kombination mit dem Linker und der PEX-Domäne Kollagenaseaktivität aufweist (Chung et al., 2000).

In der Kristallstruktur von ProMMP-1 konnte eindeutig eine *cis*-Peptidbindung zwischen Glu209 und Tyr210 festgestellt werden, welche auch schon bei MMP-8 nachgewiesen wurde (Brandstetter et al., 2001) (Abbildung 5-2). Die *cis*-Peptidbindung befindet sich auf einem dem Lösungsmittel exponierten *loop*, der der katalytischen α -Helix (L²¹²H²¹⁸EXXH²²² – L²²⁴) vorangeht. Diese Anordnung wird durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff von Arg202 und der Aminogruppe von Tyr210 stabilisiert.

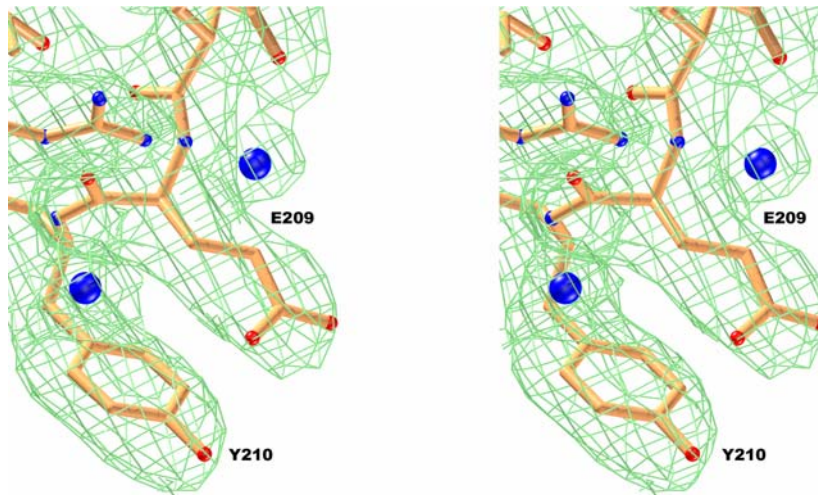


Abbildung 5-2: $2F_o-F_c$ -Elektronendichte um die *exosite* Tyr210. Dargestellt ist die *cis*-Peptidbindung zwischen Glu209 und Tyr210.

Sequenzvergleiche mit anderen MMP Strukturen innerhalb dieses Bereichs teilen die MMPs in zwei verschiedene Gruppen ein. Alle MMPs, außer Kollagenase-1 und -2 (MMP-1 und MMP-8) besitzen in der entsprechenden Position ein Glycin. In MMP-3 besitzt das Gly188 eine Geometrie, die nur für Glycine erlaubt ist ($\phi, \psi = 150^\circ, 165^\circ$). Die Vermutung liegt nahe, daß durch diese Anordnung die lokale Faltung stabilisiert wird (Becker et al., 1995; Chen et al., 1999). In jedem Fall erlaubt sie die richtige Konformation für die Interaktion des Tyrosins in MMP-1 mit dem Substrat. Die Unterschiede in dieser Region könnten auch einer der Gründe für die unterschiedliche Substratspezifität innerhalb der Kollagenasen gegenüber den unterschiedlichen Kollagenen sein. Um die exakte Rolle der Position 210 zu untersuchen, wurden Docking-Experimente mit Kollagen durchgeführt. Dabei wurde der Ligand (Kollagen) als flexibles Molekül behandelt, das Protein jedoch als starrer Körper (Abbildung 5-3). Bereits publizierte Ergebnisse wurden als Leitfaden für eine ungefähre Interaktion benutzt, die sich an folgenden Punkten orientiert: eine Interaktion der Kollagenhelix mit der primären Substraterkennungsregion im Aktivzentrum, und die räumliche Nähe der Kollagenhelix mit der Tyr210 *exosite*.

In der Kristallstruktur von ProMMP-1 sind Pro276 und Thr275 in der hydrophoben Tasche der PEX-Domäne lokalisiert. Eine Erhöhung der Flexibilität des Linkers kann zu einer erhöhten Flexibilität zwischen beiden Domänen führen, und somit zu einer fehlerhaften Ausrichtung der *exosite* und des Aktivzentrums. Mutationsstudien haben weiterhin gezeigt, daß ein Austausch von Gly272 zu Aspartat signifikant die Kollagenaseaktivität in MMP-1 reduziert. Somit scheint eine gewisse Flexibilität für die Katalyse von Bedeutung zu sein (Tsukada & Pourmotabbed, 2002). Das Linkerpeptid scheint somit verschiedene Funktionen

zu besitzen, wie die Ausrichtung der beiden Domänen, sowie die Gewährleistung einer gewissen Flexibilität zwischen beiden Domänen während der Kollagenspaltung.

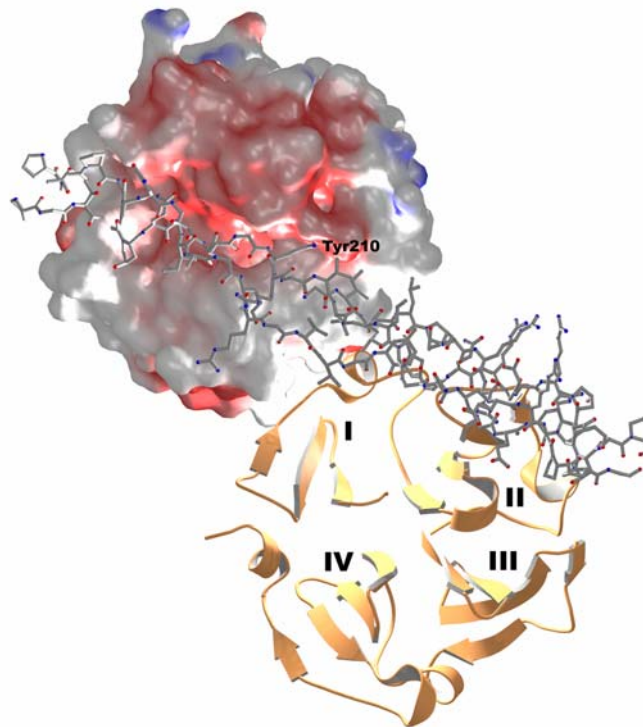


Abbildung 5-3: Modell einer möglichen Kollagenbindung. Oberflächendarstellung der katalytischen Domäne von MMP-1, positive Ladung ist in blau gekennzeichnet, negative Ladung in rot. Das tripelhelikale Kollagen ist als Stäbchenmodell, und die PEX-Domäne als Ribbonplot dargestellt.

Die Bindung von Kollagen sowie die Spaltung der spezifischen Position Gly/Ile scheine zwei unabhängige Prozesse zu sein, da z.B. aktives MMP-8 in der Lage ist, Kollagen an mehreren Stellen zu binden, ohne es zu spalten (Sun & Hemler, 2001). Da keine Bindung von Kollagen an das Proenzym von MMP-8 erfolgt, sind somit die PEX-Domänen wie auch Bindungsstellen in der katalytischen Domäne für die Erkennung und Prozessierung notwendig.

Ottl und Mitarbeiter postulierten, daß hauptsächlich Propellerblatt I an der Interaktion mit Kollagen beteiligt ist (Ottl & Moroder, 1999; Ottl et al., 2000). Sie gehen davon aus, daß unabhängig von der zu spaltenden Bindung Gly/Ile in Kollagen, Kontakte sowohl zum Aktivzentrum wie auch zur PEX-Domäne gewährleistet sein müssen. Weiterhin könnten sowohl Arg291 wie auch Arg304 (Propellerblatt I) durch ihre herausragenden Guanidiniumgruppen mit der Carbonylgruppe des Substrats interagieren, und so die Entwindung des Kollagens und folglich einen erleichterten Eintritt in die *active-site cleft* ermöglichen. Eine solche Interaktion würde eine große und durchgängige Interaktionsfläche zur Verfügung stellen.

5.1.2 Modell der α_2 -Integrin/MMP-1 Interaktion

Mit dem Programm FTDOCK (Jackson et al., 1998) und den biochemischen Daten von Dumin und Mitarbeitern konnte ein ternärer Komplex zwischen ProMMP-1, Kollagen und Integrin gemodelt werden (Dumin et al., 2001). Die Bindung von MMPs an die Zelloberfläche wurde schon früher für MMP-9 über CD44 (Yu & Stamenkovic, 1999), $\alpha_2(\text{IV})$ -Kette von Kollagen (Olson et al., 1998) sowie $\alpha_v\beta_3$ -Integrin für MMP-2 berichtet (Brooks et al., 1996). Vor kurzem konnte weiterhin gezeigt werden, daß sowohl $\alpha\text{M}\beta_2$ -Integrin und $\alpha\text{L}\beta_2$ -Integrin mit MMP-2 und MMP-9 interagieren können (Stefanidakis et al., 2003). Ein Interaktionspartner von MMP-1 ist EMMPRIN (Sun & Hemler, 2001) sowie die Domäne I von α_2 -Integrin (Dumin et al., 2001; Stricker et al., 2001). Das beste Modell eines α_2 -Integrin/MMP-1 Komplexes bezüglich der Interaktionsfläche und der erwarteten Geometrie ist in Abbildung 5-4 dargestellt. Strang IV des vierten Propellerblattes der PEX-Domäne interagiert in einer günstigen Anordnung mit α_2 -Integrin, weiterhin sind sowohl die Disulfidbrücke (Cys278-Cys466) wie auch das Linkerpeptid in der Nähe der Kollagenhelix positioniert. Die Vermutung liegt nahe, daß die terminalen Aminosäuren zusammen mit dem Ende des Linkerpeptids zu einer zweiten Kollagenerkennungsseite beitragen könnten.

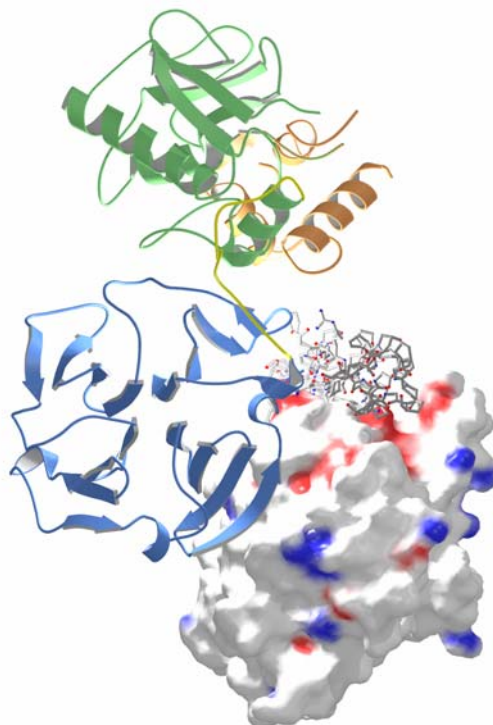


Abbildung 5-4: Mögliche Interaktion zwischen ProMMP-1 und α_2 -Integrin in Komplex mit Kollagen. Das Kollagen ist als Stäbchenmodell gekennzeichnet, während das α_2 -Integrin als Oberfläche mit positiver (rot) und negativer Ladung (blau) dargestellt ist. ProMMP-1 ist als Ribbonplot dargestellt.

5.2 PeptidaseV

Die Strukturanalyse zeigt, daß PepV aus einer katalytischen und einer Deckeldomäne besteht, die miteinander interagieren und so eine interne Höhle an den Grenzflächen bilden. Die Wände dieser Höhle werden von den zink- und substratbindenden Resten, den katalytischen Resten und zwei Zinkionen gebildet. Diese Kavität wird durch den gebundenen Asp ψ [PO₂CH₂]LeuOH-Inhibitor ausgefüllt, der dem Übergangszustand eines Asp-Ala-Dipeptids während der Katalyse ähnelt. Die katalytische Domäne von PepV besitzt ein ähnliches Faltungsmotiv wie die Carboxypeptidase CPG2 (Rowcell et al., 1997), die binuklearen Aminoexopeptidasen AAP (Chevrier et al., 1994) und SGAP (Greenblatt et al., 1997) (Abbildung 4-25). Auch die *cis*-Peptidbindung zwischen den Resten Asp119-Asp120, wie schon in den verwandten Peptidasen beobachtet werden konnte, ist konserviert und für die exakte Positionierung der zinkbindenden Carboxylgruppe von Asp119 essentiell (Abbildung 4-31).

Die Aktivzentren von AAP (Chevrier et al., 1994) und CPG2 (Rowcell et al., 1997) zeigen einen ähnlichen Aufbau wie das katalytische Zentrum von PepV (Abbildung 4-30). In beiden Exopeptidasen besitzt das Zink 1 identische Liganden, nämlich eine Imidazolgruppe eines Histidins, eine Carboxylgruppe eines Glutamats, und eine der beiden Carboxylgruppen eines bidental bindenden Aspartats. Weiterhin bilden die Imidazolgruppe eines Histidins, die Carboxylgruppe eines Aspartats, und der zweite Carboxylsauerstoff des bidental bindenden Aspartats, die entscheidenden Bindungspartner in allen drei Peptidasen für Zink 2. Bei Substrat- bzw. Inhibitorbindung kommen noch der N-Terminus des Substrats/Inhibitors und ein Wassermolekül bzw. ein Sauerstoffatom des Phosphinatinhibitors hinzu. Die Zink-Koordination in CPG2 unterscheidet sich nur geringfügig von der in PepV, indem die bidental bindende Carboxylgruppe nicht von einem Aspartat sondern von einem Glutamat stammt. Ein katalytisches Glutamat ist in allen verwandten Strukturen vorhanden.

Im PepV-Asp ψ [PO₂CH₂]AlaOH-Komplex sind die zwei Zinkionen 3,83 Å voneinander entfernt, während die Distanzen in den nicht gebundenen Strukturen von AAP und CPG2 geringfügig kürzer sind (3,3 und 3,5 Å). Weiterhin scheinen sich die Distanzen zwischen Metallen im Zuge der Substrat- bzw. Inhibitorbindung zu vergrößern, wie z.B. in der AAP Struktur mit gebundenem Hydroxamat Inhibitor (3,7 Å) (Chevrier et al., 1996) sowie einem Phosphinatinhibitor (3,9 Å) (Stamper et al., 2001) deutlich wird. Das zeigt, daß das Aktivzentrum in der Lage ist, sich an die jeweilige Situation anzupassen. Im Falle eines „echten Substrats“ dürfte die Geometrie im Übergangszustand der des Phosphinatinhibitors ähneln, und sich im Laufe der Katalyse weiter verändern.

Die unmittelbare Umgebung der Aktivzentren der beiden Exopeptidasen unterscheidet sich deutlich von der in PepV. In AAP ist der in PepV vorhandene *gly-bulge* durch ein Cystein ersetzt, welches eine Disulfidbrücke ausbildet. Interessanterweise zeigt dessen Carbonylgruppe wie das O von Gly415 in PepV zur Aminogruppe der zu spaltenden Peptidbindung.

Die S1-Tasche zeigt bei den verschiedenen Peptidasen eine große Variation und ist in AAP kleiner als in PepV, und in CPG2 wesentlich größer. Die unterschiedliche Anordnung der Reste Asp177-Asp178-Glu179 in CPG2 ist der Grund für diese starke Variation. Weiterhin ist die Größe der S1-Tasche in Übereinstimmung mit den unterschiedlichen Präferenzen der Peptidasen für Substratseitenketten.

Eine zweite Domäne innerhalb dieser Peptidasen ist nur in CPG2 vorhanden, und unterscheidet sich in Größe und Anordnung zur katalytischen Domäne. Teile der PepV Deckeldomäne (genauer gesagt: sI, sIX, sX, sXI, und h3 auf der linken Seite) ähneln der wesentlich kleineren Domäne von CPG2, welche jedoch vom Aktivzentrum wegzeigt und nicht signifikant an der Bindung von Substraten beteiligt ist (Rowell et al., 1997). Nur in PepV befindet sich diese zusätzliche Domäne direkt über dem Aktivzentrum und assistiert somit der katalytischen Domäne bei der Bildung der Höhle, welche die S1- und S1'-Taschen beinhaltet. Somit ist die Deckeldomäne in PepV an der Substratspezifität beteiligt.

Der gebundene Inhibitor in PepV ahmt ein Dipeptidsubstrat nach, welches sich im Stadium des tetraedrischen Übergangszustands befindet. Dabei imitiert die sp^3 -hybridisierte Methylengruppe der Phosphinatgruppe die protonierte Amidgruppe. Diese Komplex-Struktur zeigt die erwartete Interaktionsgeometrie für ein Dipeptidsubstrat in einem Stadium, in dem das katalytische Wasser (oder Hydroxylion) die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung bereits attackiert hat, und ein tetraedrisches Addukt gebildet ist.

Im freien PepV-Molekül, wie auch in anderen Exopeptidasen, wie z.B. CPG2 (Rowell et al., 1997), erwartet man vor der Katalyse ein fixiertes „*bridging*“ Wassermolekül zwischen den zwei Zinkionen und der Carboxylgruppe von Glu153, ungefähr in der Position der O2-Gruppe des Inhibitors (Abbildung 4-29). Im Zuge der Bindung eines Dipeptids wird das Wassermolekül zwischen den zwei Zinkionen und der zu spaltenden Peptidbindung positioniert. Es folgt eine Aktivierung des Wassermoleküls durch beide Zinkionen und Glu153, sowie die Entstehung einer Hydroxylgruppe durch einen Protonentransfer zu Glu153. Der Carbonylsauerstoff der Peptidbindung würde dann in einem sogenannten *oxyanion binding hole* gebunden werden, welches durch Zink 1 und die Imidazolgruppe von His269

gebildet wird. Dieses würde in einer Polarisierung der Carbonylgruppe und in einem erleichterten nukleophilen Angriff der zu spaltenden Peptidbindung durch die Mithilfe der durch Zink ausgerichteten Hydroxylgruppe (Position ähnlich zum O2 des Inhibitors) resultieren, und so zu einem tetraedrischen Intermediat führen. Durch einen anschließenden Protonentransfer von der Carboxylgruppe von Glu153 zur Amidgruppe, würde das tetraedrische Intermediat in die entsprechenden Produkte bzw. Aminosäuren zerfallen. His269, welches an der Bildung der *oxyanion hole* Tasche beteiligt ist, hat ein Gegenstück in CPG2 (Tyr384). Im Gegensatz dazu ist bei der verwandten AAP kein weiterer Rest an der *oxyanion hole* Bildung beteiligt.

In binuklearen Zinkpeptidasen besitzen die zwei Zinkionen unterschiedliche Funktionen (Sträter & Lipscomb, 1995; Stamper et al., 2001). Zink 1 hat die Rolle, das Substrat zu binden und zusammen mit dem Nε2 von His269, die zu spaltende Peptidbindung zu polarisieren. Dadurch wird der nukleophile Angriff durch das katalytische Wasser/Hydroxylion erleichtert (bzw. ermöglicht). Weiterhin kann Zink 2 das katalytische Wasser aktivieren, und die Bindung und Hydrolyse des Substrates unterstützen. Die verschiedenen Aufgaben, die bei Monozinkpeptidasen jeweils nur ein Zink bewerkstelligt, sind bei Dizinkpeptidasen zwischen den zwei Zinkionen aufgeteilt, die Folge könnte eine höhere katalytische Aktivität sein. Allerdings ist eine Überlappung der verschiedenen Funktionen zwischen den zwei Zinkionen nicht auszuschließen.

Experimentell konnte dies für das Apoenzym der verwandten AAP gezeigt werden, welches zunächst nur Zink 1 bindet und trotzdem 80 % der Aktivität besitzt (Stamper et al., 2001). Folglich kann ein gebundenes Zinkion mit der entsprechenden Umgebung die Aufgaben von beiden Zinkionen übernehmen.

PepV besitzt alle Eigenschaften, die für eine Dipeptidase charakteristisch sind. Der N-Terminus eines gebundenen Dipeptids wird durch die Interaktion mit einem Carbonylsauerstoff, einem internen Wasser (Wat1) und Zink 2 fixiert. Letzteres scheint auch verantwortlich zu sein, die zu spaltende Peptidbindung in eine geeignete Position zu bringen. Modellstudien mit β-Alanin zeigen, daß dieses eine ähnliche Position wie die Asp11-Gruppe des Inhibitors einnehmen könnte, wobei nur eine geringfügige Anpassung an die S1-Tasche nötig wäre. Diese Modellstudie unterstützt vorangegangene Ergebnisse, die belegen, daß PepV, Dipeptide mit einem N-terminalen β-Ala-Rest (Vongerichten et al., 1994), wie z.B. Carnosin (β-Ala-His) spalten kann. Die S1-Tasche bietet jedoch keinen Platz für zusätzlichen Substituenten am N-Terminus eines Dipeptids, bzw. einen P2-Rest. Eine optimale Besetzung der S1-Tasche wäre nur mit mittelgroßen hydrophoben Resten bzw. kleinen P1-Resten in

D-Konfiguration möglich. Die äquivalente, jedoch rigidere Bindungsstelle in AAP läßt eine solche Variabilität von zusätzlichen Substituenten am N-Terminus nicht zu und unterstreicht somit deren Aminopeptidasecharakter. Die katalytische Aktivität von AAP beschränkt sich auf mittelgroße Reste in L-Konfiguration. CPG2 fehlt ein äquivalenter Aminosäurerest in der Position von Asp177 in PepV, welches für die Bindung der Aminogruppe eines Dipeptids zuständig ist. Dies gibt CPG2 die Möglichkeit wesentlich größere Substrate in P1 zu binden, wie z.B. Folsäure und deren Analoga, die in der Krebstherapie eine wichtige Rolle spielen (Rowell et al., 1997).

Die Umgebung des C-Terminus des gebundenen Dipeptids in PepV ist optimal daran adaptiert, die Carboxylgruppe durch ein ausgeprägtes Netzwerk von Wasserstoffbrücken zu stabilisieren. Zentrale Bedeutung haben dabei Arg350 und Asn217 N δ , die beide in der Deckeldomäne lokalisiert sind. AAP besitzt keine entsprechende Aminosäure zu Arg350, somit ist die Bindungsstelle nicht nur für Dipeptide, sondern auch für C-terminal verlängerte Substrate zugänglich. Dies unterstreicht die Funktion von AAP als generelle Aminopeptidase. Auch in CPG2 findet sich kein entsprechender Aminosäurerest in Position von Arg350. Arg324 in CPG2 befindet sich jedoch in einer geeigneten Position um die C-terminale Carboxylgruppe eines Glutamats von Methotrexat in etwas anderer Geometrie zu binden und so für die Katalyse zu fixieren. Es ist unklar, ob sich die Dimerisierungsdomäne von CPG2 während der Katalyse der katalytischen Domäne und damit dem Substrat nähert.

Die S1'-Bindungstasche von PepV ist so ausgestattet, daß alle Aminosäuren unabhängig von Größe und Ladung gebunden werden könnten. Tripeptide könnten nur durch eine 120° Rotation der N-C α -Bindung des P1'-Restes, Platz finden. Dies würde allerdings die Seitenkette des P1'-Restes in die *carboxylate groove* platzieren, die jedoch keinen geeigneten Platz für eine Aminosäure bietet. Die C-terminale Aminosäure eines Tripeptids wäre somit am Tunnelausgang lokalisiert, wo keine optimale Bindungsgeometrie erfolgen könnte. Nichtsdestotrotz können einige wenige Tripeptide durch PepV zerlegt werden (Vongerichten et al., 1994).

Bezüglich der engen „Ummantelung“ des Dipeptidyl-Phosphinatinhibitors im Aktivzentrum (und des gemodelten Substrats) ist ersichtlich, daß der Eintritt der Peptide und damit die Effektivität der Peptidase von der „Öffnung“ des Aktivzentrums abhängig ist. Vorstellbar ist eine Rotation der Deckeldomäne, die so den Eintritt der Substrate und das Verlassen der Produkte generell erleichtern könnte. Eine Mobilität zwischen den Domänen wird durch die wesentlich schlechtere Streuung und viel höhere Mosaizität der Inhibitor-freien Kristalle angedeutet.

Von großer Wichtigkeit in der Substratbindung und Produktfreisetzung ist auch der *gly-bulge*, welcher sowohl in CPG2 (Abbildung 4-33) als auch in SGAP (Gly-Asp-Gly) vorhanden ist, in AAP jedoch durch eine weniger flexible Disulfidbrücke ersetzt ist. Diese Anordnung der Glycine (Gly413-Gly415) ist in der PepV/Komplex-Struktur fixiert, sollte jedoch im freien Enzym wesentlich flexibler sein. Diese Überlegung wird durch die Struktur von CPG2 unterstützt, in der sich der äquivalente *loop* um 0,5 Å abseits des Aktivzentrums präsentiert. In der freien SGAP Struktur (Greenblatt et al., 1997) ist der äquivalente *gly-bulge* sogar ungeordnet. Weiterhin trägt der *gly-bulge* in PepV dazu bei, die zu spaltende Peptidbindung durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zur Amidbindung des gebundenen Dipeptids, zu orientieren.

Der Abbau von Carnosin über PepV-ähnliche Enzyme während einer bakteriellen Infektion kann die zerstörende Eigenschaft solcher Bakterien verstärken, da angenommen wird, daß Carnosin als physiologischer Puffer für Zink agiert und damit zinkabhängige Schädigungen verhindert. Eine solche Schädigung kann durch selektive Hemmeffekte an N-Methyl-D-Aspartat NR1/NR2A-Rezeptoren, wie auch durch zinkabhängige Effekte bei der Bildung von reaktivem Sauerstoff in Neuronen ausgelöst werden (Boldyrev, 2001). Alternativ, kann der Schutz der Neuronen durch Carnosin vermittelt werden (Gary & Clarke, 1998; Boldyrev et al., 1999).

5.3 Isoaspartyl Dipeptidase

Schon zu Beginn dieses Projekts war ersichtlich, daß IadA eine neue Metallo-Peptidasefamilie definiert und eine gewisse Ähnlichkeit zur Dihydroorotase und Urease zeigt (Gary & Clarke, 1998). Die Strukturanalyse enthüllte eine wesentlich höhere Homologie von IadA zu Zinkhydrolasen, als durch Sequenzähnlichkeitsstudien ersichtlich war.

Die katalytische Domäne von IadA besteht aus einem $(\alpha/\beta)_8$ -barrel, ähnlich zu dem der Dihydroorotase (Thoden et al., 2001), und einer seitlich angrenzenden β -sandwich Domäne, die ebenso bei strukturell verwandten Hydrolasen zu beobachten ist, insbesondere bei Hydantoinasen (Jabri et al., 1995; Abendroth et al., 2002) und Urasen (Jabri et al., 1995; Benini et al., 1999). In Übereinstimmung mit Dizink- bzw. Dinickel-Hydrolasen zeigt die IadA zwei Zinkionen im Aktivzentrum, die am C-terminalen Ende des $(\alpha/\beta)_8$ -barrels lokalisiert sind. Die zwei Zinkionen werden durch die Seitenketten von vier Histidinen, sowie bidental durch ein carbamoyliertes Lysin und ein Aspartat koordiniert. Ein carbamoyliertes Lysin ist bei den strukturell verwandten Amidohydrolasen ebenso zu beobachten. Die

Vermutung liegt nahe, daß ein carbamoyliertes Lysin sich günstiger auf die Katalyse auswirkt als ein Glutamat, da dieses eine erhöhte Flexibilität und eine verstärkte Delokalisation der negativen Ladung erlaubt. Zudem ermöglicht die notwendige Carboxylierung eine zusätzliche Regulation der Enzymaktivität. Die Einkerbung, in der sich das Aktivzentrum befindet, wird durch verschiedene herausragende *loops* begrenzt, die vom *barrel* zur Verfügung gestellt werden und dem *flap* gegenüber lokalisiert sind. Dieser *flap* besitzt in Abwesenheit eines Substrats bzw. Inhibitors eine hohe Flexibilität und ist ungeordnet, erst im Zuge der Substratbindung nimmt er eine geordnete und somit geschlossene Konformation an. Im Gegensatz zu früheren biochemischen Untersuchungen bildet die aktive Form der IadA ein Homooktamer mit einer 422 Punktgruppensymmetrie und einer zentralen Kavität von 30 Å Durchmesser, die durch zwei kleinere Poren mit dem Lösungsmittel in Kontakt steht. Die aktiven Zentren aller Moleküle, die das Oktamer aufbauen, sind zum Lösungsmittel gerichtet. Somit ist der Zugang von Substraten zu den aktiven Zentren nicht blockiert bzw. versperrt.

IadA konnte in An- und Abwesenheit eines Inhibitors kristallisiert werden. Der Phosphinatinhibitor Asp ψ [PO₂CH₂]LeuOH ahmt den Übergangszustand eines Asp-Leu-Dipeptids nach. Dieses Dipeptid wird von IadA, wenn auch nur mit einem Zehntel der Effektivität wie Isoasp-Leu, hydrolysiert. Der Inhibitor-Komplex liefert einen guten Einblick in den Mechanismus, wie ein Substrat gebunden bzw. gespalten wird, und sollte ähnlich zu dem sein, der für anderen Exopeptidasen und Amidasen mit zwei Zinkionen im Aktivzentrum vorgeschlagen wurde (Jozic et al., 2002). Aufgrund der Strukturdaten können jetzt die substratbindenden Reste benannt und den konservierten Resten Asp285 und Tyr137 katalytische Funktionen zugeordnet werden. Im geöffneten Zustand des *flaps* kann das Dipeptidyl-Substrat (vororientiert durch gegensätzliche elektrostatische Potentiale) in das Aktivzentrum eintreten. Die Asp1S-P1 Carboxylseitenkette sowie die C-terminale Carboxylgruppe könne dann mit den Resten der S1- bzw. S1'-Bindungstasche Interaktionen ausbilden. Hierauf folgt das Abdecken der Bindestelle durch den *flap*, das wahrscheinlich durch Interaktion mit mittelgroßen hydrophoben P1'-Seitenketten ausgelöst wird. Der Carbonylsauerstoff von Ser289 kann durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zur NH-Gruppe der zu spaltenden Peptidbindung diese Anordnung fixieren. Weiterhin wird das Wat1 (das näher am O2P des Phosphinats lokalisiert ist) zwischen der Carboxylgruppe von Asp285 und der zu spaltenden Peptidbindung eingeklemmt. Durch Interaktion mit Zink 1 wird der pKs dieses Wassermoleküls herabgesetzt. Nach Abzug eines Protons durch den freien Carboxylsauerstoff von Asp285, welches als katalytische Base agiert, kann das daraus resultierende durch Zink 2 orientierte Hydroxynukleophil, die Carbonylgruppe der

Peptidbindung des Substrats angreifen. Die Reaktion verläuft dann unter der Bildung eines tetraedrigen Übergangszustands, welcher durch die Polarisierung der Carbonylgruppe der zu spaltenden Bindung durch das Zink 2 und durch die Seitenkette von Tyr137, stabilisiert wird. Das Proton des Wassermoleküls kann dann über die Carboxylgruppe von Asp285 zu der Stickstoffgruppe der Peptidbindung des Substrats (äquivalent zu Leu2I-P1'-Methylengruppe im Inhibitor) übertragen werden. Dieser Protontransfer begünstigt die Spaltung der Peptidbindung, und die resultierenden Aminosäuren können die Substratbindungsstelle verlassen. Der *flap* sollte nach der Spaltung der Peptidbindung wieder seine Flexibilität zurück erlangen, und besitzt somit eine „Klappen“-ähnliche Funktion. Tripeptide werden sehr wahrscheinlich nicht gebunden, da eine vernünftige Interaktion, z.B. mit dem C-Terminus eines Dipeptids mit der *carboxylate hole*, nicht möglich wäre (Larsen et al., 2001).

Die Bindungsgeometrie eines β -Asp-Leu-Dipeptids ist vermutlich ähnlich zu der eines α -Asp-Leu-Dipeptids (Abbildung 4-43). Die Isoasp1S-P1-Aminogruppe würde dann wahrscheinlich in Richtung auf das katalytische Zentrum zeigen, wo sie dann mit den Carboxylsauerstoffatomen des carbamoylierten Lys162 interagieren könnte. Nur eine solche Konformation würde die Ausbildung von Wasserstoffbrücken bzw. Salzbrücken der Dipeptidyl-Carboxylgruppen mit den Resten in der *anion hole* bzw. der *carboxylat groove* ermöglichen. Die zusätzliche Bindung der so verschobenen Aminogruppe an das carbamoylierte Lysin könnte zudem dazu beitragen, daß β -Asp-Leu-Dipeptide bevorzugt hydrolysiert werden. Wie bereits oben erwähnt, wurde die Dihydroorotase, die eine reversible Zyklisierung eines Carbamoyl-L-Aspartats zu L-Dihydroorotat katalysiert, ursprünglich durch Sequenzvergleiche als ein strukturelles Homolog von IadA identifiziert (Larsen et al., 2001). Diese Arbeit bestätigt die Verwandtschaft beider Enzyme. Wie aus der Überlagerung der aktiven Zentren des IadA-Komplexes mit der Dihydroorotase ersichtlich ist (Abbildung 4-48), wird das L-Dihydroorotat-Molekül so gebunden, daß die zu spaltende Peptidbindung genau mit der Phosphinatgruppe in IadA überlagert. Dabei wird die Carboxylgruppe des L-Dihydroorotat-Moleküls von den Seitenketten von Arg20, Asn22 und His254 der Dihydroorotase fixiert. In der Dihydroorotase sind die zinkkoordinierenden Reste, das fixierte Wassermolekül sowie Asp250, das als *proton shuttle* fungiert, zu den entsprechenden Resten in der IadA äquivalent. Somit ist der Spaltungsmechanismus und die dabei entstehenden Zwischenprodukte vermutlich ähnlich (Thoden et al., 2001). Beachtenswert ist, daß die Tyr104 Seitenkette der Dihydroorotase durch eine geringe Rotation, ähnlich wie Tyr137 in IadA, als zweites Elektrophil agieren könnte (Abbildung 4-48). Ein wichtiger geometrischer Unterschied zwischen beiden Enzym-Substraten liegt jedoch darin, daß bei der

Dihydroorotase das Substrat eine *cis*-Amidbindung aufweist, während das Dipeptid in IadA eine *trans*-Peptidbindung besitzt. Beide Enzyme zeigen somit unterschiedlichen Substratgeometrien (Gary & Clarke, 1998).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Natur nicht eine bereits existierende Peptidase modifiziert hat, sondern die katalytische Domäne und den Hydrolaseapparat der binuklearen Amidohydrolasen adaptiert hat, um β -verknüpfte Asp-Xaa Dipeptide spalten zu können. Dies ist ein interessantes Beispiel für divergente Evolution. Diese molekulare Evolution resultierte offensichtlich in einer sehr effizienten Dipeptidase, die eine schnelle Degradation von Isoaspartyl-Dipeptiden bewältigt, welche durch spontane Proteinmodifikationen entstehen.

6. Literaturverzeichnis

- Abendroth, J., Niefind, K., May, O., Siemann, M., Syldatk, C. & Schomburg, D. (2002). The structure of L-hydantoinase from *Arthobacter aureescens* leads to an understanding of dihydropyrimidinase substrate and enantio specificity. *Biochemistry* **41** (27): 8589-8597.
- Abendroth, J., Niefind, K. & Schomburg, D. (2002). X-ray structure of a dihydropyrimidinase from *Thermus sp* at 1.3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **320** (1): 143-156.
- Abrahams, J. P. & Leslie, A. G. W. (1996). Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F-1 ATPase. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **52**: 30-42.
- Allan, J. A., Hembry, R. M., Angal, S., Reynolds, J. J. & Murphy, G. (1991). Binding of latent and high Mr-active forms of stromelysin to collagen is mediated by the C-terminal domain. *Journal of Cell Science* **99**: 789-795.
- Auld, D. S. (1997). Zinc catalysis in metalloproteases. Metal sites in proteins and models. **89**: 29-50.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D. & Woessner, J. F. (1998). Introduction: Clan MH containing varied co-catalytic metalloproteases. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (1412-1416).
- Barrett, A. J., Rawlings, N.D. & Woessner, J.F. (1998). PeptidaseV. In: *Handbook of proteolytic enzymes*, : pp. 1423-1425.
- Barton, G. J. (1993). Alscript - a tool to format multiple sequence alignments. *Protein Engineering* **6** (1): 37-40.
- Basset, P., Okada, A., Chenard, M. P., Kannan, R., Stoll, I., Anglard, P., Bellocq, J. P. & Rio, M. C. (1997). Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: Therapeutic Implications. *Matrix Biology* **15** (8-9): 535-541.
- Becker, J. W., Marcy, A. I., Rokosz, L. L., Axel, M. G., Burbaum, J. J., Fitzgerald, P. M. D., Cameron, P. M., Esser, C. K., Hagmann, W. K., Hermes, J. D. & Springer, J. P. (1995). Stromelysin-1: 3-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Science* **4** (10): 1966-1976.
- Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Miletti, S., Ciurli, S. & Mangani, S. (1999). A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: Why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure with Folding & Design* **7** (2): 205-216.
- Benning, M. M., Kuo, J. M., Raushel, F. M. & Holden, H. M. (1994). 3-dimensional structure of phosphotriesterase - an enzyme capable of detoxifying organophosphate nerve agents. *Biochemistry* **33** (50): 15001-15007.
- Bergmann, U., Tuuttila, A., Stetler-Stevenson, W. G. & Tryggvason, K. (1995). Autolytic activation of recombinant human 72-kDa type-IV collagenase. *Biochemistry* **34** (9): 2819-2825.
- Bertaux, B., Hornebeck, W., Eisen, A. Z. & Dubertret, L. (1991). Growth-stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *Journal of Investigative Dermatology* **97** (4): 679-685.
- Biagini, A. & Puigserver, A. (2001). Sequence analysis of the aminoacylase-1 family. A new proposed signature for metalloexopeptidases. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **128** (3): 469-481.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G. I., Boddien, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., Decarlo, A. & Engler, J. A. (1993). Matrix metalloproteinases - a review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **4** (2): 197-250.
- Blundell, T. L. & Johnson, L. N. (1976). Protein crystallography. *Academic Press, London*.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F. X., Huber, R., Zwilling, R. & Stöcker, W. (1992). Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature* **358** (6382): 164-167.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F. X. & Stöcker, 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** (1-2): 134-140.

- Bode, W., Reinemer, P., Huber, R., Kleine, T., Schnierer, S. & Tschesche, H. (1994). The X-ray crystal-structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate-analog reveals the essentials for catalysis and specificity. *Embo Journal* **13** (6): 1263-1269.
- Boldyrev, A. (2001). Carnosine as a modulator of endogenous Zn²⁺ effects. *Trends in Pharmacological Sciences* **22** (3): 112-113.
- Boldyrev, A., Song, R., Lawrence, D. & Carpenter, D. O. (1999). Carnosine protects against excitotoxic cell death independently of effects on reactive oxygen species. *Neuroscience* **94** (2): 571-577.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** (1-2): 248-254.
- Brandstetter, H., Grams, F., Glitz, D., Lang, A., Huber, R., Bode, W., Krell, H. W. & Engh, R. A. (2001). The 1.8-Å crystal structure of a matrix metalloproteinase 8-barbiturate inhibitor complex reveals a previously unobserved mechanism for collagenase substrate recognition. *Journal of Biological Chemistry* **276** (20): 17405-17412.
- Brennan, T. V., Anderson, J. W., Jia, Z., Waygood & E. B. & Clarke, S. (1994). Repair of spontaneously deamidated Hpr-phosphocarrier protein catalyzed by the L-isoadipate-(D-aspartate)O-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **269**: 24586-24595.
- Brew, K., Dinakarpanian, D. & Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1477** (1-2): 267-283.
- Brooks, P. C., Stromblad, S., Sanders, L. C., von Schalscha, T. L., Aimes, R. T., Stetler-Stevenson, W. G., Quigley, J. P. & Cheresch, D. A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alphaVbeta 3. *Cell* **85** (5): 683-693.
- Brünger, 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., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **54**: 905-921.
- Burley, S. K., David, P. R. & Lipscomb, W. N. (1991). Leucine aminopeptidase - bestatin inhibition and a model for enzyme-catalyzed peptide hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88** (16): 6916-6920.
- Burley, S. K., David, P. R., Taylor, A. & Lipscomb, W. N. (1990). Molecular-structure of leucine aminopeptidase at 2.7-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87** (17): 6878-6882.
- Burns, F. R., Stack, M. S., Gray, R. D. & Paterson, C. A. (1989). Inhibition of purified collagenase from alkali-burned rabbit corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **30** (7): 1569-1575.
- Capasso, S., Di Donato, A., Esposito, L., Sica, F., Sorrentino, G., Vitagliano, L., Zagari, A. & Mazzarella, L. (1996). Deamidation in proteins: The crystal structure of bovine pancreatic ribonuclease with an isoaspartyl residue at position 67. *Journal of Molecular Biology* **257** (3): 492-496.
- Carter, C. W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial-experiments. *Journal of Biological Chemistry* **254** (23): 2219-2223.
- Cawston, T. E. (1996). Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown. *Pharmacology & Therapeutics* **70** (3): 163-182.
- The CCP4 Suite: Collaborative Computational Project, Number4. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **50**: 760-763.
- Cha, H. J., Kopetzki, E., Huber, R., Lanzendorfer, M. & Brandstetter, H. (2002). Structural basis of the adaptive molecular recognition by MMP9. *Journal of Molecular Biology* **320** (5): 1065-1079.
- Chen, L. Y., Rydel, T. J., Gu, F., Dunaway, C. M., Pikul, S., Dunham, K. M. & Barnett, B. L. (1999). Crystal structure of the stromelysin catalytic domain at 2.0 Å resolution: Inhibitor-induced conformational changes. *Journal of Molecular Biology* **293** (3): 545-557.
- Chevrier, B., Dorchymont, H., Schalk, C., Tarnus, C. & Moras, D. (1996). The structure of the *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase complexed with a hydroxamate inhibitor - involvement in catalysis of Glu151 and two zinc ions of the co-catalytic unit. *European Journal of Biochemistry* **237** (2): 393-398.

- Chevrier, B., Schalk, C., Dorchymont, H., Rondeau, J. M., Tarnus, C. & Moras, D. (1994). Crystal-structure of *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase - a prototypical member of the co-catalytic zinc enzyme family. *Structure* **2** (4): 283-291.
- Chung, L., Shimokawa, K., Dinakarandian, D., Grams, F., Fields, G. B. & Nagase, H. (2000). Identification of the (RWTNNFREY191)-R-183 region as a critical segment of matrix metalloproteinase 1 for the expression of collagenolytic activity. *Journal of Biological Chemistry* **275** (38): 29610-29617.
- Clarke, S. (1985). Protein carboxyl methyltransferases: two distinct classes of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 479-506.
- Clarke, S., Stephenson, R. C. & Lowenson, J. D. (1992). Lability of asparagine and aspartic acid residues in proteins and peptides. In: Stability of protein pharmaceutical, Part A: Chemical and physical pathways of protein degradation, edited by Tim J. Ahern and Mark C. Manning, Plenum Press, New York: 1-29.
- Cowtan, K. (1994). Joint CCP4 and ESF/CCP4- newsletter on protein crystallography. **31**: 34-38.
- Curran, S. & Murray, G. I. (1999). Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *Journal of Pathology* **189** (3): 300-308.
- David, C. L., Orpiszewski, J., Zhu, X. C., Reissner, K. J. & Aswad, D. W. (1998). Isoaspartate in chondroitin sulfate proteoglycans of mammalian brain. *J. Biol. Chem.* **273**: 32063-32070.
- Davis, G. E., Allen, K. A. P., Salazar, R. & Maxwell, S. A. (2001). Matrix metalloproteinase-1 and -9. Activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices. *Journal of Cell Science* **114** (5): 917-930.
- Di Donato, A., Ciardiello, M. A., Denigris, M., Piccoli, R., Mazzarella, L. & Dalessio, G. (1993). Selective deamidation of ribonuclease-A isolation and characterization of the resulting isoaspartyl and aspartyl derivatives. *Journal of Biological Chemistry* **268** (7): 4745-4751.
- Dideberg, O., Charlier, P., Dive, G., Joris, B., Frere, J. M. & Ghuysen, J. M. (1982). Structure of a Zn²⁺-containing D-alanyl-D-alanine-cleaving carboxypeptidase at 2.5-Å resolution. *Nature* **299** (5882): 469-470.
- Dorer, F. E., Haley, E. E. & Buchanan, D. L. (1968). Hydrolysis of beta-aspartyl peptides by rat tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **127** (1-3): 490-&.
- Douglas, D. A., Shi, Y. E. & Sang, Q. X. A. (1997). Computational sequence analysis of the tissue inhibitor of metalloproteinase family. *Journal of Protein Chemistry* **16** (4): 237-255.
- Drenth, J. (1994). Principles of protein x-ray crystallography. *Springer Verlag, New York*.
- Dumin, J. A., Dickeson, S. K., Stricker, T. P., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Roby, J. D., Santoro, S. A. & Parks, W. C. (2001). Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. *Journal of Biological Chemistry* **276** (31): 29368-29374.
- Edman, P. & Henschen, A. (1975). Sequence determination. *Protein Sequence determination, Springer Verlag, Heidelberg* **2**: 232-279.
- Elkins, P. A., Ho, Y. S., Smith, W. W., Janson, C. A., D'Alessio, K. J., McQueney, M. S., Cummings, M. D. & Romanic, A. M. (2002). Structure of the c-terminally truncated human Pro-MMP9, a gelatin-binding matrix metalloproteinase. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **58**: 1182-1192.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for x-ray protein-structure refinement. *Acta Crystallographica Section A* **47**: 392-400.
- Esnouf, R. M. (1997). An extensively modified version of molscript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **15** (2): 132-&.
- Ewald, P. P. (1921). Das "Reziproke Gitter" in der Strukturtheorie. *Z. Kristallogr.* **56**: 491-500.
- Faber, H. R., Groom, C. R., Baker, H. M., Morgan, W. T., Smith, A. & Baker, E. N. (1995). 1.8-Å crystal-structure of the c-terminal domain of rabbit serum hemopexin. *Structure* **3** (6): 551-559.
- Farber, G. K. & Petsko, G. A. (1990). The evolution of alpha/beta barrel enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 1488-1494.

- Fernandez-Catalan, C., Bode, W., Huber, R., Turk, D., Calvete, J. J., Lichte, A., Tschesche, H. & Maskos, K. (1998). Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase a receptor. *Embo Journal* **17** (17): 5238-5248.
- Freije, J. M. P., Diezitzta, I., Balbin, M., Sanchez, L. M., Blasco, R., Tolivia, J. & Lopez-Otin, C. (1994). Molecular-cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *Journal of Biological Chemistry* **269** (24): 16766-16773.
- Fuji, N., Satoh, K., Fujino, M. & Harada, K. (1994). Simultaneous racemization and isomerization at specific aspartic acid residues in alpha B-crystallin from the aged human lens. *Biochim. Biophys. Acta* **1204**: 157-163.
- Fujii, N., Satoh, K., Harada, K. & Ishibashi, Y. (1994). Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic-acid residues in alpha-a-crystallin from human lens. *Journal of Biochemistry* **116** (3): 663-669.
- Galletti, P., Ingrosso, D., Manna, C., Clemente, G. & Zappia, V. (1995). Protein damage and methylation-mediated repair in the erythrocyte. *Biochemical Journal* **306**: 313-325.
- Gary, J. D. & Clarke, S. (1995). Purification and characterization of an isoaspartyl dipeptidase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **270** (8): 4076-4087.
- Gary, J. D. & Clarke, S. (1998). Beta-aspartyl dipeptidase. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F., eds): 1461-1465.
- GCG (1998). Wisconsin Package 10.0 Edit. *Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.*
- Geiger, T. & Clarke, S. (1987). Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *Pharmacol. Res.* **7**: 703-711.
- Geiger, T. & Clarke, S. (1987). Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides - succinimide-linked reactions that contribute to protein-degradation. *Journal of Biological Chemistry* **262** (2): 785-794.
- Ghuysen, J. M., Lamottebrasseur, J., Joris, B. & Shockman, G. D. (1994). Binding site-shaped repeated sequences of bacterial wall peptidoglycan hydrolases. *Febs Letters* **342** (1): 23-28.
- Gijbels, K., Masure, S., Carton, H. & Opdenakker, G. (1992). Gelatinase in the cerebrospinal-fluid of patients with multiple-sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *Journal of Neuroimmunology* **41** (1): 29-34.
- Gilboa, R., Greenblatt, H. M., Perach, M., Spungin-Bialik, A., Lessel, U., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Blumberg, S. & Shoham, G. (2000). Interactions of *Streptomyces griseus* aminopeptidase with a methionine product analogue: A structural study at 1.53 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **56**: 551-558.
- Gill, S. C. & Von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino-acid sequence data. *Analytical Biochemistry* **182** (2): 319-326.
- Gohlke, U., Gomis-Rüth, F. X., Crabbe, T., Murphy, G., Docherty, A. J. P. & Bode, W. (1996). The C-terminal (haemopexin-like) domain structure of human gelatinase A (MMP2): Structural implications for its function. *Febs Letters* **378** (2): 126-130.
- Gomis-Rüth, F. X., Gohlke, U., Betz, M., Knäuper, V., Murphy, G., Lopez-Otin, C. & Bode, W. (1996). The helping hand of collagenase-3 (MMP-13): 2.7 Å crystal structure of its C-terminal haemopexin-like domain. *Journal of Molecular Biology* **264** (3): 556-566.
- Gomis-Rüth, F. X., Kress, L. F. & Bode, W. (1993a). 1st structure of a snake-venom metalloproteinase - a prototype for matrix metalloproteinases collagenases. *Embo Journal* **12** (11): 4151-4157.
- Gomis-Rüth, F. X., Kress, L. F., Kellermann, J., Mayr, I., Lee, X., Huber, R. & Bode, W. (1994a). Refined 2.0 Å x-ray crystal-structure of the snake-venom zinc-endopeptidase adamalysin-I - primary and tertiary structure determination, refinement, molecular-structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin. *Journal of Molecular Biology* **239** (4): 513-544.
- Gomis-Rüth, F. X., Stöcker, W., Huber, R., Zwilling, R. & Bode, W. (1993b). Refined 1.8 Å 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** (4): 945-968.

- Greenblatt, H. M., Almog, O., Maras, B., Spungin-Bialik, A., Barra, D., Blumberg, S. & Shoham, G. (1997). *Streptomyces griseus* aminopeptidase: X-ray crystallographic structure at 1.75 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **265** (5): 620-636.
- Guo, H. M., Li, R. S., Zucker, S. & Toole, B. P. (2000). EMMPRIN (CD147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface. *Cancer Research* **60** (4): 888-891.
- Haley, E. E. (1968). Purification and properties of a beta-aspartyl peptidase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **243** (21): 5748-&.
- Harding, J. J., Beswick, H. T., Ajiboye, R., Huby, R., Blakytyn, R. & Rixon, K. C. (1989). Non-enzymic post-translational modification of proteins in aging - a review. *Mechanisms of Ageing and Development* **50** (1): 7-16.
- Harker, D. (1956). The determination of the phases of the structure factors of non-centrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement. *Acta Crystallographica* **9** (1): 1-9.
- Harris, E. D. J. (1990). Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Eng J Med* **322** (18): 1277-89.
- Hasty, K. A., Hibbs, M. S., Kang, A. H. & Mainardi, C. L. (1986). Secreted forms of human neutrophil collagenase. *Journal of Biological Chemistry* **261** (12): 5645-5650.
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. & Iwata, K. (1992). Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide-range of cells - a possible new growth-factor in serum. *Febs Letters* **298** (1): 29-32.
- Hejazi, M., Piotukh, K., Mattow, J., Deutzmann, R., Volkmer-Engert, R. & Lockau, W. (2002). Isoaspartyl dipeptidase activity of plant-type asparaginases. *Biochemical Journal* **364**: 129-136.
- Hellendoorn, M. A., Franke-Fayar, B. M. D., Mierau, I., Venema, G. & Kok, J. (1997). Cloning and analysis of the pepv dipeptidase gene of *Lactococcus lactis* Mg1363. *Journal of Bacteriology* **179** (11): 3410-3415.
- Holm, L. & Sander, C. (1997). An evolutionary treasure: Unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Proteins-Structure Function and Genetics* **28** (1): 72-82.
- Ihanus, E., Uotila, L., Toivanen, A., Stefanidakis, M., Bailly, P., Cartron, J. P. & Gahmberg, C. G. (2003). Characterization of ICAM-4 binding to the I domains of the CD11a/CD18 and CD11b/CD18 leukocyte integrins. *European Journal of Biochemistry* **270** (8): 1710-1723.
- Ireton, G. C., McDermott, G., Black, M. E. & Stoddard, B. L. (2002). The structure of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *Journal of Molecular Biology* **315** (4): 687-697.
- Itoh, Y. & Nagase, H. (2002). Matrix metalloproteinases in cancer. *Proteases in biology and medicine*. **38**: 21-36.
- Itoh, Y., Takamura, A., Ito, N., Maru, Y., Sato, H., Suenaga, N., Aoki, T. & Seiki, M. (2001). Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates ProMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *Embo Journal* **20** (17): 4782-4793.
- Jabri, E., Carr, M. B., Hausinger, R. P. & Karplus, P. A. (1995). The crystal-structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science* **268** (5213): 998-1004.
- Jackson, R. M., Gabb, H. A. & Sternberg, M. J. E. (1998). Rapid refinement of protein interfaces incorporating solvation: Application to the docking problem. *Journal of Molecular Biology* **276** (1): 265-285.
- Jancarik, J. & Kim, S. H. (1991). Sparse-matrix sampling - a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography* **24**: 409-411.
- Jiang, W. P. & Bond, J. S. (1992). Families of metalloendopeptidases and their relationships. *Febs Letters* **312** (2-3): 110-114.
- Johnson, B. A. & Aswad, D. W. (1990). Fragmentation of isoaspartyl peptides and proteins by carboxypeptidase-Y - release of isoaspartyl dipeptides as a result of internal and external cleavage. *Biochemistry* **29** (18): 4373-4380.
- Jozic, D., Bourenkow, G., Bartunik, H., Scholze, H., Dive, V., Henrich, B., Huber, R., Bode, W. & Maskos, K. (2002). Crystal structure of the dinuclear zinc aminopeptidase pepV from *Lactobacillus delbrueckii* unravels its preference for dipeptides. *Structure* **10** (8): 1097-1106.

- Kafienah, W., Buttle, D. J., Burnett, D. & Hollander, A. P. (1998). Cleavage of native type I collagen by human neutrophil elastase. *Biochemical Journal* **330**: 897-902.
- Kahari, V. M. & Saarialho-Kere, U. (1999). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Annals of Medicine* **31** (1): 34-45.
- Kleine, T., Bartsch, S., Blaser, J., Schnierer, S., Triebel, S., Valentin, M., Gote, T. & Tschesche, H. (1993). Preparation of active recombinant TIMP-1 from *Escherichia coli* inclusion-bodies and complex-formation with the recombinant catalytic domain of PMNI-collagenase. *Biochemistry* **32** (51): 14125-14131.
- Knäuper, V., Cowell, S., Smith, B., Lopez-Otin, C., O Shea, M., Morris, H., Zardi, L. & Murphy, G. (1997). The role of the C-terminal domain of human Collagenase-3 (MMP- 13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *Journal of Biological Chemistry* **272** (12): 7608-7616.
- Knäuper, V., Lopez-Otin, C., Smith, B., Knight, G. & Murphy, G. (1996). Biochemical characterization of human collagenase-3. *Journal of Biological Chemistry* **271** (3): 1544-1550.
- Knäuper, V., Osthues, A., Declerck, Y. A., Langley, K. E., Blaser, J. & Tschesche, H. (1993). Fragmentation of human polymorphonuclear-leukocyte collagenase. *Biochemical Journal* **291**: 847-854.
- Knäuper, V., Wilhelm, S. M., Seperack, P. K., Declerck, Y. A., Langley, K. E., Osthues, A. & Tschesche, H. (1993). Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin. *Biochemical Journal* **295**: 581-586.
- Knight, S. D. (2000). RspS Version 4.0: A Semi-interactive vector-search program for solving heavy-atom derivatives. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **56**: 42-47.
- Koblinski, J. E., Ahram, M. & Sloane, B. F. (2000). Unraveling the role of proteases in cancer. *Clinica Chimica Acta* **291** (2): 113-135.
- Kok, J. & DeVos, W. M. (1994). The proteolytic system of lactic acid bacteria. In *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, M. J. Gasson, and W. M. DeVos, eds. (London:Blackie and Professional), pp. 169-210.
- Kraulis, P. J. (1991). Molscript - a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **24**: 946-950.
- Laemmli, U. K., Molbert, E., Showe, M. & Kellenbe, E. (1970). Form-determining function of genes required for assembly of head of bacteriophage-T4. *Journal of Molecular Biology* **49** (1): 99-&.
- Larsen, R. A., Knox, T. M. & Miller, C. G. (2001). Aspartic peptide hydrolases in *Salmonella enterica serovar typhimurium*. *Journal of Bacteriology* **183** (10): 3089-3097.
- Laskowski, R. A., Macarthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). Procheck - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**: 283-291.
- Lauer-Fields, J. L., Tuzinski, K. A., Shimokawa, K., Nagase, H. & Fields, G. B. (2000). Hydrolysis of triple-helical collagen peptide models by matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* **275** (18): 13282-13290.
- Leslie, A. G. W. (1990). Mosflm program. Abstract of the crystallographic computing school. *Bischenberg*: 27-38.
- Li, J., Brick, P., Ohare, M. C., Skarzynski, T., Lloyd, L. F., Curry, V. A., Clark, I. M., Bigg, H. F., Hazleman, B. L., Cawston, T. E. & Blow, D. M. (1995). Structure of full-length porcine synovial collagenase reveals a C-terminal domain-containing a calcium-linked, 4-bladed beta-propeller. *Structure* **3** (6): 541-549.
- Libson, A. M., Gittis, A. G., Collier, I. E., Marmer, B. L., Goldberg, G. I. & Lattman, E. E. (1995). Crystal-structure of the hemopexin-like C-terminal domain of gelatinase-A. *Nature Structural Biology* **2** (11): 938-942.
- Lovejoy, B., Welch, A. R., Carr, S., Luong, C., Broka, C., Hendricks, R. T., Campbell, J. A., Walker, K. A. M., Martin, R., Van Wart, H. & Browner, M. F. (1999). Crystal structures of MMP-1 and -13 reveal the structural basis for selectivity of collagenase inhibitors. *Nature Structural Biology* **6** (3): 217-221.
- Lowenson, J. D. & Clarke, S. (1991). Structural elements affecting the recognition of L-isoaspartyl residues by the L-isoaspartyl D-aspartyl protein methyltransferase - Implications for the repair hypothesis. *Journal of Biological Chemistry* **266** (29): 19396-19406.

- Mach, H., Middaugh, C. R. & Lewis, R. V. (1992). Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. *Analytical Biochemistry* **200** (1): 74-80.
- Matthews, B. W. (1988). Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases. *Accounts of Chemical Research* **21** (9): 333-340.
- McCawley, L. J. & Matrisian, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: Multifunctional contributors to tumor progression. *Molecular Medicine Today* **6** (4): 149-156.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *European Journal of Biochemistry* **189** (1): 1-23.
- Meinwald, Y. C., Stimson, E. R. & Scheraga, H. A. (1986). Deamidation of the asparaginyl-glycyl sequence. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **28** (79-84).
- Merritt, E. A. & Murphy, M. E. P. (1994). Raster3d version-2.0 - a Program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **50**: 869-873.
- Mignatti, P. & Rifkin, D. B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiological Reviews* **73** (1): 161-195.
- Mitchell, P. G., Magna, H. A., Reeves, L. M., Lopresti-Morrow, L. L., Yocum, S. A., Rosner, P. J., Geoghegan, K. F. & Hambor, J. E. (1996). Cloning, expression, and type I collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *Journal of Clinical Investigation* **97** (3): 761-768.
- Moilanen, M., Sorsa, T., Stenman, M., Nyberg, P., Lindy, O., Vesterinen, J., Paju, A., Kontinen, Y. T., Stenman, U. H. & Salo, T. (2003). Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1,-8,-13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen. *Biochemistry* **42** (18): 5414-5420.
- Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U. & Tryggvason, K. (1999). Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase-2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (11): 7414-7419.
- Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U., Isupov, M., Lindqvist, Y., Schneider, G. & Tryggvason, K. (1999). Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: Activation mechanism revealed. *Science* **284** (5420): 1667-1670.
- Moses, M. A. (1997). The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* **15** (3): 180-189.
- Moy, F. J., Chanda, P. K., Cosmi, S., Pisano, M. R., Urbano, C., Wilhelm, J. & Powers, R. (1998). High-resolution solution structure of the inhibitor-free catalytic fragment of human fibroblast collagenase determined by multidimensional NMR. *Biochemistry* **37** (6): 1495-1504.
- Murphy, G., Allan, J. A., Willenbrock, F., Cockett, M. I., Oconnell, J. P. & Docherty, A. J. P. (1992). The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *Journal of Biological Chemistry* **267** (14): 9612-9618.
- Murphy, G. & Knäuper, V. (1997). Relating matrix metalloproteinase structure to function: Why the "hemopexin" domain? *Matrix Biology* **15** (8-9): 511-518.
- Murphy, G., Reynolds, J. J., Bretz, U. & Baggiolini, M. (1977). Collagenase Is a component of specific granules of human neutrophil leukocytes. *Biochemical Journal* **162** (1): 195-&.
- Nagano, N., Orenge, C. A. & Thornton, J. M. (2002). One fold with many functions: The evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *Journal of Molecular Biology* **321** (5): 741-765.
- Nagase, H. (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biological Chemistry* **378** (3-4): 151-160.
- Nagase, H., Brinckerhoff, C. E., Vater, C. A. & Harris, E. D. (1983). Biosynthesis and secretion of procollagenase by rabbit synovial fibroblasts - Inhibition of procollagenase secretion by monensin and evidence for glycosylation of procollagenase. *Biochemical Journal* **214** (2): 281-288.
- Nagase, H., Enghild, J. J., Suzuki, K. & Salvesen, G. (1990). Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)-mercuric-acetate. *Biochemistry* **29** (24): 5783-5789.

- Nagase, H. & Woessner, J. F. (1999). Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* **274** (31): 21491-21494.
- Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L. & Matrisian, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: Biologic activity and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology* **18** (5): 1135-1149.
- Netzel-Arnett, S., Fields, G., Birkedal-Hansen, H. & Van Wart, H. E. (1991). Sequence specificities of human fibroblast and neutrophil collagenases. *Journal of Biological Chemistry* **266** (11): 6747-6755.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. & Honig, B. (1993). GRASP - Graphical Representation and Analysis of Surface-Properties. *Biophysical Journal* **64** (2): A166-A166.
- Noguchi, S., Miyawaki, K. & Satow, Y. (1998). Succinimide and isoaspartate residues in the crystal structures of hen egg-white lysozyme complexed with tri-N- acetylchitotriose. *Journal of Molecular Biology* **278** (1): 231-238.
- Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M. & Okada, Y. (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *Journal of Biological Chemistry* **272** (4): 2446-2451.
- Okada, Y., Nagase, H. & Harris, E. D. (1986). A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective-tissue matrix components - Purification and characterization. *Journal of Biological Chemistry* **261** (30): 4245-4255.
- Olson, M. W., Toth, M., Gervasi, D. C., Sado, Y., Ninomiya, Y. & Fridman, R. (1998). High affinity binding of latent matrix metalloproteinase-9 to the alpha 2(IV) chain of collagen IV. *Journal of Biological Chemistry* **273** (17): 10672-10681.
- Ottl, J., Gabriel, D., Murphy, G., Knäuper, V., Tominaga, Y., Nagase, H., Kroger, M., Tschesche, H., Bode, W. & Moroder, L. (2000). Recognition and catabolism of synthetic heterotrimeric collagen peptides by matrix metalloproteinases. *Chemistry & Biology* **7** (2): 119-132.
- Ottl, J. & Moroder, L. (1999). Disulfide-bridged heterotrimeric collagen peptides containing the collagenase cleavage site of collagen type I. Synthesis and conformational properties. *Journal of the American Chemical Society* **121** (4): 653-661.
- Otwinowski, Z. (1991). Daresbury study weekend proceedings.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1993). Denzo: A film processing program for macromolecular crystallography. *Yale University*.
- Overall, C. M. (1994). Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. Inhibition of matrix metalloproteinases: Therapeutic Potential. **732**: 51-64.
- Overall, C. M. (2002). Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity - Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Molecular Biotechnology* **22** (1): 51-86.
- Parsons, S. L., Watson, S. A., Brown, P. D., Collins, H. M. & Steele, R. J. C. (1997). Matrix metalloproteinases. *British Journal of Surgery* **84** (2): 160-166.
- Patel, K. & Borchardt, R. T. (1990). Chemical pathways of peptide degradation. II. Kinetics of deamidation of an asparaginyl residue in a model hexapeptide. *Pharmacol. Res.* **7**: 703-711.
- Pei, D. (1999). A-Mmp: A matrix metalloproteinase with novel cysteine array, but without the classical cysteine switch. *Febs Letters* **457**: 262-270.
- Pilcher, B. K., Wang, M., Qin, X. J., Parks, W. C., Senior, R. M. & Welgus, H. G. (1999). Role of matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity. Inhibition of matrix metalloproteinases: Therapeutic Applications. **878**: 12-24.
- Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Advan. Protein Chem.* **23**: 283-437.
- Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* **290**: 205-218.
- Rester, U., Moser, M., Huber, R. & Bode, W. (2000). L-isoaspartate 115 of porcine beta-trypsin promotes crystallization of its complex with bdellastasin. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **56**: 581-588.
- Roderick, S. L. & Matthews, B. W. (1993). Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from *Escherichia coli* - a new type of proteolytic-enzyme. *Biochemistry* **32** (15): 3907-3912.

- Roher, A. E., Lowenson, J. D., S., C., Wolkow, C., Wang, R., Cotter, R. J., Reardon, I. M., Zurcher-Neely, H. A., Henrikson, R. L., Ball, M. J. & al., e. (1993). Structural alternations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **268**: 3072-3083.
- Roussel, A. & Cambileau, C. (1989). Turbo Frodo Version Open Gl.1. (Marseille, France: Centre National de la Recherche Scientifique/Universite Aix-Marseille).
- Rowell, S., Pauptit, R. A., Tucker, A. D., Melton, R. G., Blow, D. M. & Brick, P. (1997). Crystal structure of carboxypeptidase G(2), a bacterial enzyme with applications in cancer therapy. *Structure* **5** (3): 337-347.
- Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQalpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324** (6093): 163-166.
- Sanchez-Lopez, R., Alexander, C. M., Behrendtsen, O., Breathnach, R. & Werb, Z. (1993). Role of zinc-binding-encoded and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate-specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins. *Journal of Biological Chemistry* **268** (10): 7238-7247.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74** (12): 5463-5467.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. & Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor-cells. *Nature* **370** (6484): 61-65.
- Schnierer, S., Kleine, T., Gote, T., Hillemann, A., Knäuper, V. & Tschesche, H. (1993). The recombinant catalytic domain of human neutrophil collagenase lacks type-I collagen substrate-specificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **191** (2): 319-326.
- Springman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H. & Vanwart, H. E. (1990). Multiple-modes of activation of latent human fibroblast collagenase - Evidence for the role of a Cys-73 active-site zinc complex in latency and a cysteine switch mechanism for activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87** (1): 364-368.
- Stamper, C., Bennett, B., Edwards, T., Holz, R. C., Ringe, D. & Petsko, C. (2001). Inhibition of the aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica* by L-leucinephosphonic acid. Spectroscopic and crystallographic characterization of the transition state of peptide hydrolysis. *Biochemistry* **40** (24): 7035-7046.
- Stefanidakis, M., Bjorklund, M., Ihanus, E., Gahmberg, C. G. & Koivunen, E. (2003). Identification of a negatively charged peptide motif within the catalytic domain of progelatinase that mediates binding to leukocyte beta(2) integrins. *Journal of Biological Chemistry* [Epub ahead of print].
- Sternlicht, M. D., Bissell, M. J. & Werb, Z. (2000). The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* **19** (8): 1102-1113.
- Sternlicht, M. D. & Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**: 463-516.
- Stetler-Stevenson, W. G. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: A moving target for therapeutic intervention. *Journal of Clinical Investigation* **103** (9): 1237-1241.
- Stöcker, W., Gomis-Rüth, F. X., Bode, W. & Zwillig, R. (1993). Implications of the 3-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. *European Journal of Biochemistry* **214** (1): 215-231.
- Stout, G. H. & Jensen, L. H. (1989). X-Ray structure determination, John Eiley, New York.
- Sträter, N. & Lipscomb, W. N. (1995). 2-metal ion mechanism of bovine lens leucine aminopeptidase - Active-site solvent structure and binding mode of L-leucinal, a gem-diolate transition-state analog, by x-ray crystallography. *Biochemistry* **34** (45): 14792-14800.
- Sträter, N., Sherratt, D. J. & Colloms, S. D. (1999). X-ray structure of aminopeptidase a from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in Xer site-specific recombination. *Embo Journal* **18** (16): 4513-4522.
- Stricker, T. P., Dumin, J. A., Dickeson, S. K., Chung, L., Nagase, H., Parks, W. C. & Santoro, S. A. (2001). Structural analysis of the alpha(2)-integrin I domain/procollagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) interaction. *Journal of Biological Chemistry* **276** (31): 29375-2938

- Sun, J. X. & Hemler, M. E. (2001). Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Research* **61** (5): 2276-2281.
- Tahirov, T. H., Oki, H., Tsukihara, T., Ogasahara, K., Yutani, K., Ogata, K., Izu, Y., Tsunasawa, S. & Kato, I. (1998). Crystal structure of methionine aminopeptidase from hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Molecular Biology* **284** (1): 101-124.
- Takemoto, L. & Boyle, D. (1998). Deamidation of specific glutamine residues from alpha-a crystallin during aging of the human lens. *Biochemistry* **37** (39): 13681-13685.
- Takigawa, M., Nishida, Y., Suzuki, F., Kishi, J., Yamashita, K. & Hayakawa, T. (1990). Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **171** (3): 1264-1271.
- Thoden, J. B., Phillips, G. N., Neal, T. M., Raushel, F. M. & Holden, H. M. (2001). Molecular structure of dihydroorotase: A paradigm for catalysis through the use of a binuclear metal center. *Biochemistry* **40** (24): 6989-6997.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76** (9): 4350-4354.
- Tsukada, H. & Pourmotabbed, T. (2002). Unexpected crucial role of residue 272 in substrate specificity of fibroblast collagenase. *Journal of Biological Chemistry* **277** (30): 27378-27384.
- Turk, D. (1996). Proceedings from the 1996 meeting of the international union of crystallography Macromolecular Computing School.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (2000). An approach to multi-copy search in molecular replacement. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **56**: 1622-1624.
- Valasco, G., Cal, S., Merlos-Suarez, A., Ferrando, A. A., Alvarez, S., Nakano, A., Arribas, J. & Lopez-Otin, C. (2000). Human MT6- matrix metalloproteinase: Identification, progelatinase activation, and expression in brain tumors. *Cancer Research* **60** (4): 877-882.
- Valasco, G., Pendas, A. M., Fueyo, A., Knäuper, V., Murphy, G. & Lopez-Otin, C. (1999). Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J.Biol.Chem.* **274**: 4570-4576.
- Vallee, B. L. & Auld, D. S. (1993). Zinc - Biological functions and coordination motifs. *Accounts of Chemical Research* **26** (10): 543-551.
- Van Wart, H. E. & Birkedal-Hansen, H. (1990). The cysteine switch - a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87** (14): 5578-5582.
- Vongerichten, K. F., Klein, J. R., Matern, H. & Plapp, R. (1994). Cloning acid nucleotide-sequence analysis of pepV, a carnosinase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp lactis DSM-7290, and partial characterization of the enzyme. *Microbiology-Uk* **140**: 2591-2600.
- Wahl, R. C., Dunlap, R. P. & Morgan, B. A. (1990). Biochemistry and inhibition of collagenase and stromelysin. *Annual Reports In Medical Chemistry* **25**: 177-184.
- Wang, B. C. (1985). Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography. *Methods in Enzymology* **115**: 90-112.
- Watanabe, A., Takio, K. & Ihara, Y. (1999). Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments - Unusual properties of the microtubule-binding domain of tau. *Journal of Biological Chemistry* **274** (11): 7368-7378.
- Werb, Z. (1989). In proteases and matrix degradation. *Textbook of Rheumatology*. 3. Aufl. (Hrsg.: W. N. Kelly, F. D. Harris Jr., S. Ruddy, C. B. Sledge) Philadelphia: W. B. Saunders.
- Wessel, D. & Flugge, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute- solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* **138** (1): 141-143.

- Wilce, M. C. J., Bond, C. S., Dixon, N. E., Freeman, H. C., Guss, J. M., Lilley, P. E. & Wilce, J. A. (1998). Structure and mechanism of a proline-specific aminopeptidase from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** (7): 3472-3477.
- Wilson, D. K., Rudolph, F. B. & Quijcho, F. A. (1991). Atomic-structure of adenosine-deaminase complexed with a transition-state analog - Understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science* **252** (5010): 1278-1284.
- Wright, H. T. (1991). Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **26** (1): 1-52.
- Yamamoto, N., Maeno, M. & Takano, T. (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* Cpn4. *Journal of Dairy Science* **82** (7): 1388-1393.
- Yu, Q. & Stamenkovic, I. (1999). Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes & Development* **13** (1): 35-48.