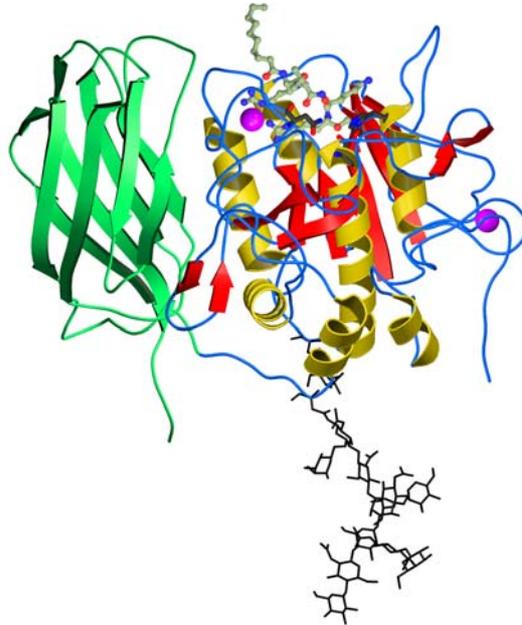
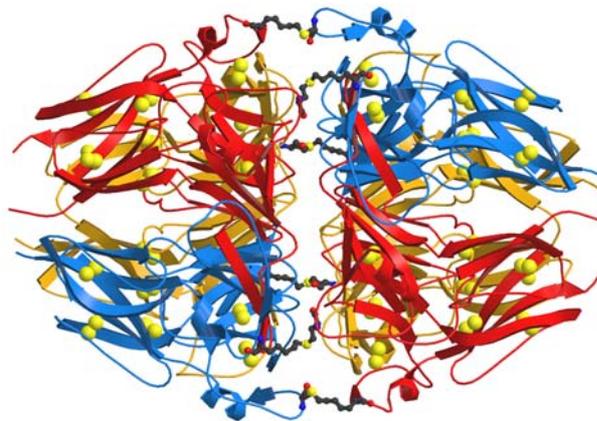


Röntgenstrukturanalyse der Proproteinkonvertase Furin



und der nicht-kollagenen Domäne NC1 von Kollagen IV



Stefan Henrich
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung
D-82152 Martinsried

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Strukturforschung

**Röntgenstrukturanalyse
der Proproteinkonvertase Furin
und
der nicht-kollagenen Domäne NC1 von Kollagen IV**

Stefan Henrich

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. F. H. Köhler

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

Die Dissertation wurde am 02.06.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 12.07.2004 angenommen.

**Meinen Eltern
und
Birgit**

Wege entstehen dadurch, daß man sie geht.

Franz Kafka

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2000 bis Mai 2004 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Leitung von Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich für die wohlwollende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit danken. Die große Freiheit bei der Arbeit hat zu der sehr angenehmen und kreativen Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Bode danke ich für die Überlassung der interessanten Themen sowie die vielen angenehmen Diskussionen, wertvollen Anregungen und die stete Unterstützung.

Bei Herrn Dr. Manuel E. Than bedanke ich mich für die gute Betreuung, die große Hilfe bei der Lösung methodischer Herausforderungen und die Geduld bei der Beantwortung vieler fachlicher Fragen.

Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die Bereitstellung großer Mengen Furin danke ich Herrn Dr. Angus Cameron und Frau Prof. Dr. Iris Lindberg. Ebenso möchte ich mich für den schönen Aufenthalt am Louisiana State University Health Science Center in New Orleans bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Gleb P. Bourenkov für die Hilfe bei den Arbeiten am Synchrotron und der Datenprozessierung, sowie an Herrn Dr. Hans D. Bartunik und den Mitarbeitern der Beamline BW6 am Deutschen Elektronen Synchrotron in Hamburg für die Bereitstellung der entsprechenden Infrastruktur.

Herrn Dr. Reiner Kiefersauer danke ich für die Einführung in das Free-Mounting-System, der Hilfe bei der Kristalltransformation und den vielen interessanten und tiefgehenden Gesprächen. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Torsten Neuefeind, Herrn Dr. Hans Brandstetter und allen Mitarbeitern der Firma Proteros Biostructure GmbH für die freundliche Unterstützung des Furin-Projekts.

Bei Herrn Dr. Dorian Bevec sowie Herrn Dr. Jörg Stürzebecher und Frau Dr. Andrea Schweinitz bedanke ich mich für die großzügige Bereitstellung von möglichen Furininhibitoren bzw. für die Durchführung von Inhibitorstudien.

Innerhalb des Projekts zur Strukturaufklärung von Kollagen IV-NC1 möchte ich mich bei Herrn Dr. Rupert Timpl, Dr. Karlheinz Mann und Albert Ries für die Proteinreinigung, die biochemischen Analysen und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Reinhardt Mentele, Herrn Dr. Frank Siedler, Frau Elisabeth Weyher-Stingl und Frau Monica Zobawa für vielfältige Sequenzierungsarbeiten und massenspektrometrischen Untersuchungen. Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Rechenzentrums, insbesondere den Herren Dr. Bernhard Busch, Dr. Harald Lehnert, Horst Worsch und Herbert Höfner.

Einen besonderen Dank verdienen auch Gina Beckmann, Monika Bumann, Werner Dersch, Marion Heinze, Carsten-Peter Kaerlein, Snezan Marinkovic, Prof. Dr. Albrecht Messerschmidt, Renate Rüller, Ottmar Paul und Monika Schneider, ohne die ein geordnetes und effektives Arbeiten in der Abteilung für Strukturforschung nicht möglich gewesen wäre.

Einen ganz herzlichen Dank gehört Constanze Breithaupt, Lorenz Chatwell, Cora Keil, Dr. Ulf Marquardt, Jens Radzimanowski, Kerstin Rohr, Dr. Manuel Than und Katja Wenig für das gemeinsame Arbeiten und Mittagessen sowie für die vielen Freizeitaktivitäten und die schönen Stunden.

Meinen derzeitigen und ehemaligen Büro- und Laborkollegen Dr. Martin Augustin, Marianne Braun, Michael Engel, Dr. Peter Goettig, Dr. Michael Koch, Dr. Klaus Maskos, Dr. Daniela Jozic, Dr. Clemens Steegborn, Charlotte Ungewickell und Milko Velarde danke ich für die angenehme und freundliche Atmosphäre, wie auch den vielen guten Gesprächen, die oft über das rein fachliche hinausgingen. Ebenso möchte ich auch Dr. Harald Wizemann, Dr. Dusan Turk und den vielen Kollegen, die hier nicht aufgeführt sind, für die Hilfe und die gute Zusammenarbeit danken. Bei meinen Freunden und Bekannten außerhalb vom Labor bedanke ich mich für ihr Verständnis, Ratschläge und Geduld, während des Studiums und der Doktorarbeit.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern, die mich in all den Jahren unterstützt hatten und für die ich mir leider oft zuwenig Zeit genommen hatte. Desweiteren danke ich meinem Bruder, meinen Schwiegereltern und Stefan für den steten Rückhalt. Ganz zum Schluß danke ich Birgit, daß sie stets zu mir hielt und mit mir die anstrengenden Jahre durchgestanden hat. Ich hoffe, daß wir noch viele große und kleine Herausforderungen zusammen bestehen.

Teile der Arbeit sind bzw. werden veröffentlicht in:

Publikationen

- M. E. Than, **S. Henrich**, G. P. Bourenkov, I. Lindberg, R. Huber, W. Bode, (2004) (in Vorbereitung).
- S. Henrich**, I. Lindberg, W. Bode, M. E. Than (2004) Homology modelling of the proprotein convertases based on the crystal structures of furin and kexin: Explanation for their specificity. (in Vorbereitung).
- M. M. Kacprzak, J. R. Peinado, M. E. Than, J. Appel, **S. Henrich**, G. Lipkind, R. A. Houghten, W. Bode, I. Lindberg (2004) Inhibition of furin by polyarginine-containing peptides: nanomolar inhibition by nona-D-arginine. *J Biol Chem* (im Druck).
- S. Henrich**, A. Cameron, G. P. Bourenkov, R. Kiefersauer, R. Huber, I. Lindberg, W. Bode, M. E. Than (2003) Addendum: The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol*, 10, 669.
- S. Henrich**, A. Cameron, G. P. Bourenkov, R. Kiefersauer, R. Huber, I. Lindberg, W. Bode, M. E. Than (2003) Crystal structure of the proprotein convertase furin. HASYLAB am DESY, Jahresbericht 2003, Hamburg.
- S. Henrich**, A. Cameron, G. P. Bourenkov, R. Kiefersauer, R. Huber, I. Lindberg, W. Bode, M. E. Than (2003) The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol*, 10, 520-526.
- S. Henrich**, K. Mann, G. P. Bourenkov, A. Ries, K. Kühn, H. D. Bartunik, R. Huber, R. Timpl, W. Bode, M. E. Than (2002) Crystal structure of the noncollagenous (NC1) domain of human placenta collagen IV. HASYLAB am DESY, Jahresbericht 2002, Hamburg.
- M.E. Than, **S. Henrich**, R. Huber, A. Ries, K. Mann, K. Kühn, R. Timpl, G. P. Bourenkov, H.D. Bartunik, W. Bode (2002) The 1.9-Å crystal structure of the noncollagenous (NC1) domain of human placenta collagen IV shows stabilization via a novel type of covalent Met-Lys cross-link. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 6607-6612.

Protein Data Bank

- S. Henrich**, A. Cameron, G. P. Bourenkov, R. Kiefersauer, R. Huber, I. Lindberg, W. Bode, M. E. Than (2003) Crystal structure of the proprotein convertase furin. PDB-Code: 1P8J.
- M. E. Than, **S. Henrich**, R. Huber, A. Ries, K. Mann, K. Kühn, R. Timpl, G. P. Bourenkov, H.D. Bartunik, W. Bode (2002) The 1.9-Å crystal structure of the noncollagenous (NC1) domain of human placenta collagen IV shows stabilization via a novel type of covalent Met-Lys cross-link. PDB-Code: 1LI1.

Patente

- S. Henrich**, M. E. Than, W. Bode, R. Kiefersauer, R. Huber, Proteros Biostructures GmbH
Struktur einer Prohormon/Proprotein-Proteinase.
eingereicht beim deutschen Patentamt, München, 24.05.2003

Vorträge und Poster

- 21st Winter School, Proteinases and their Inhibitors - recent developments,
Tiers, Italien, 2004
- 8th International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control
Brdo Estate, Slowenien, 2003
- 7th International School on the Crystallography of Biological Macromolecules
Como, Italien, 2003
- 16th International Congress of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis
München, 2002
- 19th Winter School, Proteinases and their inhibitors - recent developments,
Tiers, Italien, 2001

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Die Familie der Proproteinkonvertasen	3
2.1.1	Domänenübersicht	4
2.1.2	Gewebeverteilung	6
2.2	Serinproteasemechanismus	6
2.3	Furin.....	8
2.3.1	Reifung und subzelluläre Lokalisation von Furin.....	9
2.3.2	Substrate und Inhibitoren.....	11
2.4	Zielsetzung der Arbeit	13
3	Einführung in die Röntgenstrukturanalyse	14
3.1	Kristallsysteme.....	14
3.1.1	Bravais-Gitter.....	15
3.1.2	Raumgruppen.....	17
3.2	Röntgenbeugung an Kristallen.....	18
3.2.1	Reflexion von Röntgenstrahlen	18
3.2.2	Reziprokes Gitter	19
3.2.3	Phasenverschiebung.....	20
3.3	Strukturlösung.....	22
3.3.1	Multiwavelength Anomalous Dispersion	22
3.3.2	Pattersonfunktion	25
4	Materialien und Methoden.....	26
4.1	Materialien	26
4.2	Proteinchemische Arbeiten	26
4.2.1	Klonierung und Proteinexpression.....	26
4.2.2	Proteinreinigung.....	26
4.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	27
4.2.4	Enzymaktivitätstest	28
4.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
4.2.6	Test von Inhibitoren.....	29
4.3	Röntgenkristallographische Messungen	29
4.3.1	Erzeugung und Aufzeichnung von Röntgenstrahlen	29
4.3.2	Kristallisation.....	33
4.3.3	Kryokristallographie und Kristalltransformation.....	34
4.3.4	Datensammlung und Datenreduktion	35
4.3.5	Phasierung, Dichtemodifikation, Modellbau und Strukturverfeinerung	37
4.3.6	Messungen an der K-Absorptionskante vom Kalzium	39
4.4	Modellierung.....	40
4.4.1	Bau von homologen Modellen.....	40
4.4.2	Energieminimierung der Modelle nach der Kraftfeldmethode.....	42
4.5	Strukturanalyse und graphische Darstellung	45
5	Ergebnisse.....	46
5.1	Reinigung, Kristallisation und Kristalltransformation.....	46
5.1.1	Reinigung.....	46
5.1.2	Größenbestimmung des Proteins	46
5.1.3	Kristallisation.....	47
5.1.4	Kryokristallographie	48
5.1.5	Kristalltransformation.....	49
5.2	Strukturlösung.....	51

5.2.1	Datenaufnahme bei den triklinen Kristallen	51
5.2.2	Datenaufnahme bei den hexagonalen Kristallen	53
5.3	MAD-Phasierung und Dichtemodifikation	55
5.4	Modellbau und Verfeinerung	58
5.5	Kristallpackung	60
5.6	Strukturbeschreibung	63
5.6.1	Allgemeine Übersicht	63
5.6.2	Katalytische Domäne	64
5.6.3	Aktives Zentrum und Inhibitor	67
5.6.4	Kalziumbindestellen	71
5.6.5	P-Domäne	77
5.6.6	Zucker	78
5.7	Hemmung von Furin	79
5.7.1	Suche nach neuen Inhibitoren	79
5.8	Modelling	81
6	Diskussion	86
6.1	Kristallisation und Strukturlösung	86
6.2	Konstruktlänge	88
6.3	Aktives Zentrum	88
6.3.1	Vergleich des aktiven Zentrums von Subtilisin und Furin	88
6.3.2	Vergleich der aktiven Zentren von Furin und Kex2	90
6.3.3	Substratbindetaschen S5, S6, S1' und S2'	93
6.3.4	Vergleich des aktiven Zentrums der verschiedenen Proproteinkonvertasen auf Basis der homologen Modelle	94
6.4	Kalziumbindestelle	99
6.5	Interaktionen zwischen der katalytischen und der P-Domäne	102
6.6	Ausblicke	105
7	Kristallstruktur der nicht-kollagenen Domäne NC1 von Kollagen IV aus menschlicher Plazenta	107
7.1	Einleitung	107
7.2	Material und Methoden	109
7.2.1	Reinigung, Kristallisation und Datenaufnahme	109
7.2.2	Modellbau und Verfeinerung	111
7.2.3	Bromidbindung	113
7.2.4	Strukturelle Analyse der Seitenkettenverknüpfung zwischen Methionin und Lysin	113
7.3	Ergebnisse	114
7.3.1	Strukturbestimmung	114
7.3.2	Strukturübersicht	115
7.3.3	Kovalente Seitenkettenverknüpfung zwischen Methionin und Lysin	119
7.3.4	Bromidbindung	122
7.4	Diskussion	123
7.4.1	Methionin-Lysin-Seitenkettenverknüpfung	125
7.4.2	Bromidbindung	127
8	Abkürzungen und kristallographische Begriffe	130
9	Literatur	132

1 Zusammenfassung

Viele sekretierte Proteine aber auch virale Glykoproteine und bakterielle Toxine werden zunächst als inaktive Vorstufen gebildet und anschließend durch proteolytische Abspaltung eines Propeptids aktiviert. Bei Säugtieren erfolgt diese Prozessierung häufig durch die kalziumabhängigen Proproteinkonvertasen, von denen Furin der wichtigste Vertreter ist.

Innerhalb dieser Arbeit gelang es, ein aus Zellkultur gereinigtes lösliches Konstrukt des Furins der Maus in zwei verschiedenen Kristallformen zu kristallisieren. Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse war es möglich, die räumliche Proteinstruktur in Kombination mit einem kovalent gebundenen Chloromethylketon-Inhibitor aufzuklären. Initial konnten trikline Kristalle erhalten werden, mit denen jedoch nur native Daten bis zu einer Auflösung von 2,6 Å gemessen, nicht aber das Phasenproblem gelöst werden konnte. Die zweite Kristallform gehörte der hexagonalen Raumgruppe $P6_5$ an und hatte das Problem einer hohen Mosaizität in Verbindung mit einer sehr langen Zellachse von mehr als 470 Å. Durch die Verwendung des Free-Mounting-Systems zur Kristalltransformation konnte die Mosaizität soweit gesenkt werden, daß trotz der großen Elementarzelle eine räumliche Trennung der Reflexe möglich war. Am Synchrotron in Hamburg erlaubte ein Kristall-Detektor-Abstand von 800 mm und das Auslenken eines *image-plate*-Detektors senkrecht zum Röntgenstrahl, mit der die effektive Detektorfläche vergrößert wurde, die Aufnahme nativer Daten bis zu einer Auflösung von 2,7 Å. Die Ermittlung der Phaseninformation bis zu einer Auflösung von 4 Å erfolgte über ein *Multiwavelength Anomalous Dispersion*-Experiment (MAD) an Ta_6Br_{14} -behandelten und transformierten Kristallen. Über achtfache nicht-kristallographische Mittelung und Dichtemodifikation konnte die Phaseninformation auf den vollen Auflösungsbereich von 2,7 Å ausgedehnt werden. Das anfänglich in der hexagonalen Kristallform gebaute Strukturmodell wurde später in der triklinen Kristallform positioniert und dort verfeinert.

Mit dem Strukturmodell bekam man erstmals Einblicke in den Aufbau der katalytischen Domäne sowie der eng benachbarten P-Domäne von Furin und konnte nachvollziehen, wie es zu der hohen Substratspezifität für die Spaltung nach dibasischen Sequenzmotiven kommt. Die katalytische Domäne ähnelt teilweise der vom bakteriellen Subtilisin und besitzt die für Serinproteasen typische katalytische Triade, weist aber besonders im Bereich des aktiven Zentrums deutliche Unterschiede auf. Das aktive Zentrum ist für die Bindung basischer Substrate stark negativ geladen und bildet eine tiefe Substratbindetasche S1 aus, in der ausschließlich ein Arginin binden kann. Überraschenderweise fand sich am Boden dieser Tasche ein Kalzium, dessen Position nicht in anderen subtilisin-ähnlichen Proteasen

gefunden werden konnte. Zur Überprüfung dieser sowie zwei weiterer möglicher Kalziumbindestellen wurde das anomale Signal vom Kalzium nahe der K-Absorptionskante untersucht. Hierzu wurden zwei Datensätze bei den Wellenlängen 2,99 und 3,15 Å aufgenommen und über die anomalen Differenzelektronendichten nachgewiesen, daß nur zwei der drei potentiellen Kalziumbindestellen besetzt sind. Die für Proteinkonvertasen typische P-Domäne besteht aus acht antiparallelen β -Strängen, die zusammen das *jelly-roll*-Motiv bilden. Diese Domäne ist deutlich von der katalytischen Domäne abgesetzt; es gibt jedoch neben überwiegend hydrophoben Interaktionen auch einige wichtige Wasserstoffbrückenbindungen zwischen beiden Domänen.

Auf Grundlage der Furinstruktur und der nahezu zeitgleich publizierten Kristallstruktur der homologen Proteinkonvertase Kex2 aus Hefe, wurden die verwandten Proteinkonvertasen der Säugetiere, PC1, PC2, PC4, PC5, PC7 und PACE4, modelliert und Unterschiede zwischen ihnen herausgestellt. Es wurde durch die Modelle deutlich, daß Proteinkonvertasen besonders im Bereich des aktiven Zentrums einen sehr ähnlichen Aufbau besitzen, aber in einigen Resten von einander abweichen.

Im zweiten Teil der Arbeit wird kurz die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der nicht-kollagenen Domäne NC1 von Kollagen IV aus menschlicher Plazenta vorgestellt.

Das Kollagen IV ist der wichtigste kollagene Bestandteil von Basalmembranen und besteht aus Protomeren, die sich aus je zwei $\alpha 1(\text{IV})$ - und einer $\alpha 2(\text{IV})$ -Ketten zusammensetzen. Ein Protomer hat eine lange kollagene Triplehelix und eine nicht-kollagene globuläre Domäne NC1 am C-Terminus, über die zwischen zwei Protomeren Hexamere aus vier $\alpha 1$ - und zwei $\alpha 2$ -Ketten ausgebildet werden. Nach Kollagenase-Verdau der Triplehelix und einer anschließenden Reinigung konnte ein solches NC1-Hexamer kristallisiert und Diffraktionsdaten mit einer Auflösung von 1,9 Å erhalten werden. Das Phasenproblem wurde mit MAD-Experimenten an $\text{K}_2[\text{OsCl}_6]$ - und NaBr-behandelten Kristallen gelöst.

Der Aufbau eines NC1-Hexamers ist sehr regelmäßig und hat eine propeller-ähnliche Struktur. Zwischen beiden Protomeren liegt eine große Verbindungsfläche vor, bei der es nicht wie früher vermutet wurde zur Ausbildung von Disulfidbrücken kommt, sondern eine neuartige Methionin-Lysin-Seitenkettenverknüpfung gefunden wurde. Diese Seitenkettenverknüpfung konnte sowohl kristallographisch als auch biochemisch bestätigt werden, doch die Klärung der genauen Art der Bindung steht noch aus. Innerhalb einer Hälfte der NC1-Domäne kommt es zu einer engen Verzahnung zwischen den einzelnen α -Ketten, die wahrscheinlich dem gesamten Hexamer eine große mechanische Stabilität verleiht.

2 Einleitung

2.1 Die Familie der Proproteinkonvertasen

Mit der Entdeckung der Prozessierung von Proinsulin zu Insulin (Steiner *et al.*, 1967; Steiner und Oyer, 1967) und dem Vergleich von β -Melanocyten-stimmulierendem Hormon, β -Lipotropin und γ -Lipotropin (Chretien und Li, 1967) konnte erstmals gezeigt werden, daß Proteine aus größeren Vorstufen gebildet werden. Diese Art der Aktivierung ist bei eukaryontischen Zellen weit verbreitet und dient sowohl dem Schutz der Proteine vor frühzeitigem Verdau als auch der Regulierung ihrer Aktivität. Zunächst wird ein inaktives Proprotein hergestellt, von dem dann in einem kontrollierten proteolytischen Verdau ein Propeptid abgespalten wird. Man fand heraus, daß durch Endoproteasen eine solche Spaltung besonders nach den dibasischen Aminosäuremotiven Arg-Arg oder Lys-Arg erfolgt (Fuller *et al.*, 1988). Obwohl verschiedene Versuche zur biochemischen Charakterisierung der Prozessierung von Proproteinen unternommen (Davidson *et al.*, 1988; Ikehara *et al.*, 1976) und 1984 das für die Prozessierung in Hefe verantwortliche Gen KEX2 (*killer expression defective*) beschrieben wurden (Julius *et al.*, 1984), gelang es erst einige Jahre später die Verwandtschaftsbeziehung zum strukturell bekannten bakteriellen Subtilisin herzustellen und das Genprodukt Kex2 (auch Kexin oder Kex2p; *EC 3.4.21.61*) zu identifizieren (Fuller *et al.*, 1989a; Ikehara *et al.*, 1976).

Das erste humane, dem KEX2 verwandte Gen (Fuller *et al.*, 1989b), das durch Sequenzvergleiche gefunden wurde, lag dem *c-fes/fps* Protoonkogen benachbart und wurde daher *fur* (*c-fes/fps* upstream region) genannt (Roebroek *et al.*, 1986a; Roebroek *et al.*, 1986b). Es codiert für das Protein Furin (*EC 3.4.21.75*) (van de Ven *et al.*, 1990), das auch das Akronym PACE (*paired basic amino acid residue cleaving enzyme*) bekam (Wise *et al.*, 1990). Aufgrund der Rolle von Kex2 und Furin bei der Prozessierung von Proproteinen wurden sie zur Gruppe der Prohormon- oder Proproteinkonvertasen (*proprotein convertases*, PCs) (Fuller *et al.*, 1989b) zusammengefaßt. Um die Verwandtschaftsbeziehung zum Subtilisin herzustellen, bezeichnet man alle subtilisin-ähnlichen Proteine als Subtilasen (Siezen *et al.*, 1991). Nach der Entdeckung des humanen Furins konnten Furine im gesamten Tierreich sowie sechs weitere Proproteinkonvertasen in Säugetieren gefunden werden. Für die Säugetier-Proproteinkonvertasen wurde keine einheitliche Nomenklatur gewählt (Tabelle 1) und auch ein Versuch zur Vereinheitlichung der Namen, bei dem die Abkürzung SPC (*subtilisin-like proprotein convertases*) (Chan *et al.*, 1992) eingeführt wurde, konnte sich nicht durchsetzen.

SPC	Name in der Original-literatur	Orginalliteratur	Gewebeverteilung	Zellkompartimente	Null-Phenotyp
SPC1	Furin PACE	(Roebroek <i>et al.</i> , 1986a; Roebroek <i>et al.</i> , 1986b) (Wise <i>et al.</i> , 1990)	ubiquitär	TGN, Endosomen, Zelloberfläche	embryonisch letal (Tag 10,5), ventraler Furchungsdefekt, Fehler in der axialen Drehung
SPC2	PC2	(Seidah <i>et al.</i> , 1990; Smeekens und Steiner, 1990)	neuroendokrin	sekretorische Vesikel	verringertes Wachstum, Hypoglykämie, Proinsulinämie, Störung der endokrinen Peptidprozessierung
SPC3	PC1 PC3	(Seidah <i>et al.</i> , 1990) (Smeekens <i>et al.</i> , 1991) (Nakayama <i>et al.</i> , 1991)	neuroendokrin	sekretorische Vesikel	teilweise embryonisch letal, Störungen des Glucosehaushaltes und der gastrointestinalen Funktion, Hypocortisolismus, Hyperproinsulinämie, Fettleibigkeit, Wachstumsstörung
SPC4	PACE4	(Kiefer <i>et al.</i> , 1991)	ubiquitär	TGN, Zelloberfläche	teilweise embryonisch letal (Tag 15,5), Herz-, ZNS- und Kopfdefekte
SPC5	PC4	(Nakayama <i>et al.</i> , 1992; Seidah <i>et al.</i> , 1992)	Keimbahn	nicht bekannt	♀: reduzierte Fruchtbarkeit ♂: unfruchtbar
SPC6	PC5 PC6	(Lusson <i>et al.</i> , 1993) (Nakagawa <i>et al.</i> , 1993)	ubiquitär	PC5/PC6A: TGN, sekretorische Vesikel PC5/PC6B: TGN, Endosomen, Zelloberfläche	nicht bekannt embryonisch letal
SPC7	LPC PC8 PC7 SPC7	(Meerabux <i>et al.</i> , 1996) (Bruzzaniti <i>et al.</i> , 1996) (Seidah <i>et al.</i> , 1996) (Constam <i>et al.</i> , 1996)	ubiquitär	TGN, Endosomen, Zelloberfläche	variabel, fehlerhafte Expression führt zu Thymusdefekten

Tabelle 1: Die Namen der verschiedenen Proproteinkonvertasen der Säugetiere nach der SPC-Nomenklatur (Chan *et al.*, 1992) und der Orginalliteratur. Die in dieser Arbeit verwendeten Namen sind fett gedruckt. Die Angaben über die Gewebeverteilung, dem Vorkommen in den Zellkompartimenten sowie den gefundenen Defekten bei Nullmutanten stammen aus verschiedenen Übersichtsartikeln (Taylor *et al.*, 2003; Thomas, 2002). Abkürzungen: SPC = *subtilisin-like proproteain convertases*, PC = Proproteinkonvertase, LPC = *lymphoma chromosomal rearrangement*, TGN = Transgolginetzwerk, ZNS = Zentrales Nervensystem.

2.1.1 Domänenübersicht

Alle Proproteinkonvertasen beginnen in ihrer Pre-Proform N-terminal mit einem Signalpeptid (Abbildung 1), durch das sie ins Endoplasmatische Retikulum (ER) gelangen. Dem Signalpeptid folgt die Prodomäne, die zwischen den PCs eine Identität von 30-40 % aufweist. An Hand der NMR-Struktur der Prodomäne von PC1 (PDB-Code: 1KN6;

(Tangrea *et al.*, 2001; Tangrea *et al.*, 2002)) konnte gezeigt werden, daß trotz einer Sequenzidentität von nur 25 % eine hohe strukturelle Homologie zu der Prodomäne vom Subtilisin BPN' (PDB-Code: 1SPB; (Gallagher *et al.*, 1995)) vorliegt. Die Prodomäne der PCs wird zur Aktivierung C-terminal nach der dibasischen Sequenz Lys-Arg abgespalten (Creemers *et al.*, 1993; Leduc *et al.*, 1992), so daß aktive Proproteinkonvertasen mit der sich anschließenden katalytischen Domäne beginnen. Diese Domäne umfaßt ca. 340 Aminosäuren und ist innerhalb der PCs hochkonserviert. Der Aufbau ist ähnlich dem bakteriellen Subtilisin, insbesondere findet sich die für Serinproteasen typische katalytische Triade, bestehend aus den drei Aminosäuren Asp, His und Ser. Der Übergangszustand bei der proteolytischen Spaltung von Substraten, wird mittels eines Asn (bei PC2: Asp) im sogenannten Oxyanionloch stabilisiert. An der Domäne sind Kalziumionen gut koordiniert gebunden, weshalb Kalzium für die Faltung und Aktivität dringend erforderlich ist (Molloy *et al.*, 1992; Siezen *et al.*, 1994).

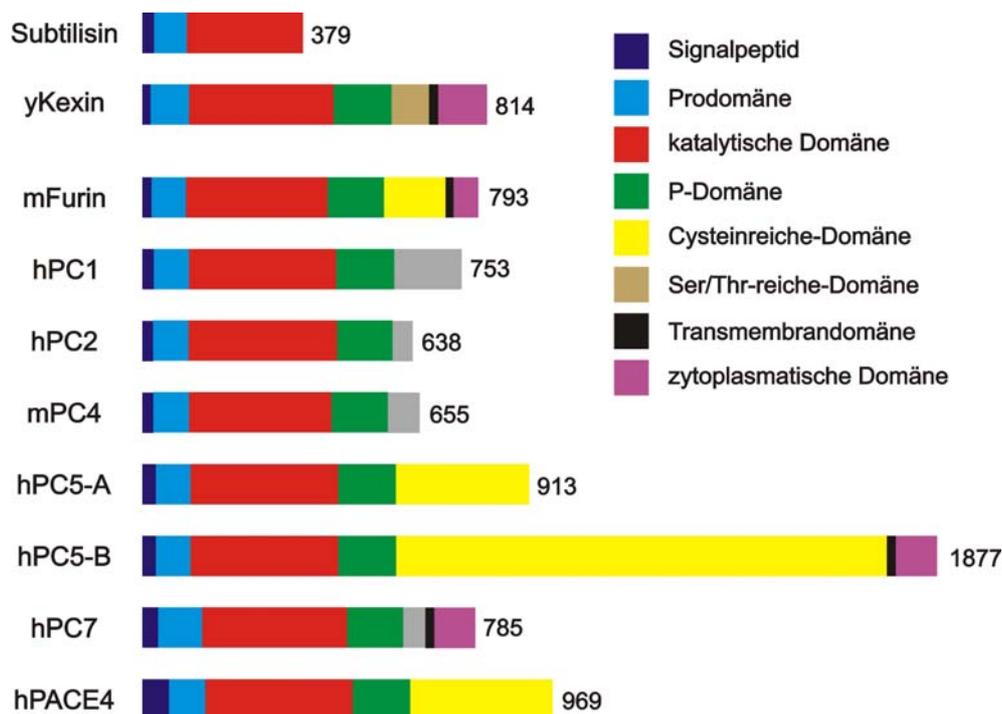


Abbildung 1: Schematischer Domänenbau der Proproteinkonvertasen der Säugetiere im Vergleich zum Subtilisin aus *Bacillus subtilis* und Kexin aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Zahlen geben die Anzahl der Aminosäuren der Preproform an und der Kleinbuchstabe vor dem Namen bezeichnet den Organismus (y=Hefe, h=Mensch, m=Maus). Von PC5 gibt es sowohl eine lösliche (PC5-A) als auch eine membrangebundene Isoform (PC5-B).

Flankiert wird die katalytische Domäne durch die für die Proproteinkonvertasen charakteristische, ca. 135 Aminosäuren umfassende P- oder Homo B-Domäne, die im Subtilisin nicht vorkommt. Wenn diese Domäne bei den PCs auch nur teilweise fehlt, wird eine korrekte Faltung und Aktivität unterbunden (Creemers *et al.*, 1993; Lusson *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1998). Die sich der P-Domäne anschließenden Sequenzbereiche variieren

innerhalb der Proproteinkonvertasen und sind *in vitro* für das aktive Protein oft nicht erforderlich (Creemers *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1998). Ob es sich allerdings um strukturell ungeordnete Bereiche handelt ist unklar. Eine Transmembrandomäne zusammen mit einer zytoplasmatischen Domäne besitzen nur Furin, Kexin, PC7 und die Isoform PC5-B.

2.1.2 Gewebeverteilung

Obwohl alle Proproteinkonvertasen charakteristisch nach dibasischen Resten spalten, zeigen sie doch eine unterschiedliche Substratspezifität. Bei der Prozessierung von Substraten können sie sich teilweise ersetzen oder ergänzen, wie z. B. bei der Spaltung von Proinsulin durch PC1 und PC2, bei der beide Proteasen erforderlich sind (Davidson *et al.*, 1988). An Hand von PC-Mutanten konnte gezeigt werden, daß ein Ausfall zu diversen Krankheitsbildern führt (Tabelle 1) (Taylor *et al.*, 2003; Thomas, 2002). Der Phänotyp der Mutationen wird nicht nur durch die Substratspezifität bestimmt, sondern auch durch den Ort, an dem die einzelne Proproteinkonvertase aktiv ist. Einige kommen ubiquitär vor, andere hingegen sind auf einzelne Gewebetypen beschränkt. Aufgrund dieser Gewebeverteilung und der intrazellulären Lokalisation können die Proproteinkonvertasen der Säugetiere in vier Gruppen eingeteilt werden (Seidah und Chretien, 1999):

1. Furin und PC7, die die Zelloberfläche über den konstitutiven Biosyntheseweg erreichen und eine Transmembrandomäne besitzen.
2. Die neuroendokrinen Proteine PC1, PC2 und möglicherweise auch die lösliche Isoform PC5-A werden in sekretorischen Vesikeln gespeichert.
3. PACE4 und PC5 werden sowohl in endokrinen wie nicht-endokrinen Zellen exprimiert und gehören zum konstitutiven wie auch regulierten Biosyntheseweg.
4. PC4 wird überwiegend in der Keimbahn der Hoden hergestellt.

2.2 Serinproteasemechanismus

Der katalytische Mechanismus zur proteolytischen Spaltung einer Peptidbindung baut bei Serinproteasen auf die drei Reste Serin (daher der Name), Histidin und Aspartat der katalytischen Triade auf. Das Histidin fungiert als katalytische Base für die Deprotonierung des nukleophilen Serins, wobei der Imidazolring des Histidins durch das ionisierte Aspartat stabilisiert und verankert wird (Abbildung 2, 1). Das Substrat gelangt zum aktiven Zentrum des Enzyms und bindet mit seinen Seitenketten in die Substratbindetaschen. Zur Benennung der verschiedenen Bereiche, bezeichnet man die Aminosäuren des Substrats mit P1, P2 usw., ausgehend von der zu spaltenden Bindung in Richtung N-Terminus gezählt. Die folgenden Reste werden mit P1', P2' usw. bezeichnet. Die Substratbindetaschen, in denen

P1, P2 usw. binden, werden entsprechend mit S1, S2 usw. bezeichnet (Schechter und Berger, 1967). Die Bindungstaschen sind bei den Propeptidase-Enzymen so spezifisch ausgebildet, daß nur bestimmte Substrate über das aktive Zentrum hinweg binden und einen Michaelis-Komplex ausbilden können (Abbildung 2, 2). Im Acylierungsschritt deprotoniert das Histidin das nukleophile Serin, welches daraufhin die zu spaltende Peptidbindung angreift, sich an dessen Carbonylgruppe addiert (Abbildung 2, 3) und einen tetraedrischen Übergangszustand erzeugt (Abbildung 2, 4). Die negative Ladung am Carbonyl-Kohlenstoff wird durch Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren des Oxyanionlochs stabilisiert. Bei den Propeptidase-Enzymen übernehmen meist eine Asparagin-Seitenkette und ein Hauptkettenamid diese Aufgabe. Der tetraedrische Übergangszustand wird durch C-N-Bruch und das Verlassen des C-terminalen Spaltprodukts, das dabei vom Histidin protoniert wird, wieder aufgelöst und es entsteht ein metastabiler Acylenzymübergangszustand (Abbildung 2, 5). Im Deacylierungsschritt bindet ein Wassermolekül und hydrolysiert die Esterbindung (Abbildung 2, 6). Der entstehende tetraedrische Übergangszustand wird erneut über Histidin, Aspartat und das Oxyanionloch stabilisiert (in Abbildung 2 nicht dargestellt). Nach der Hydrolyse ist das N-terminale Spaltprodukt nicht mehr am Serin gebunden und kann das Enzym verlassen (Abbildung 2, 7).

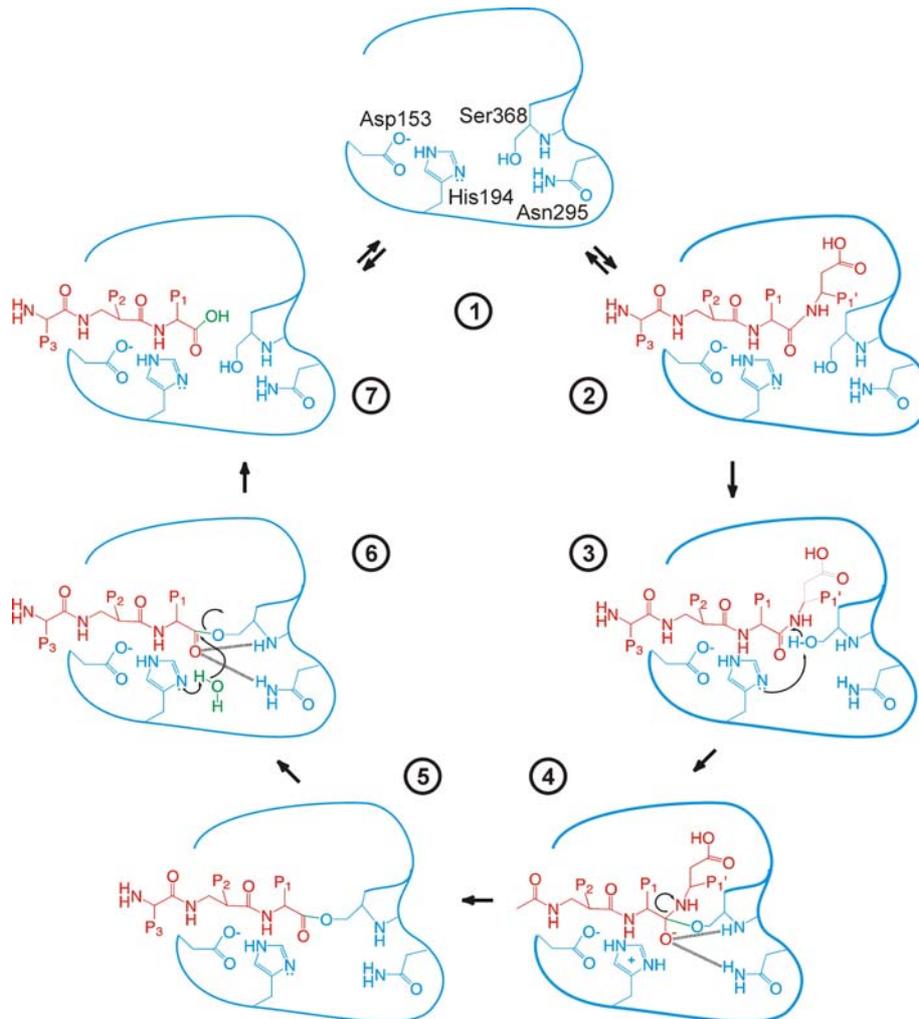


Abbildung 2: Mechanismus der proteolytischen Spaltung bei Serinproteasen. Das Enzym ist in blau, das Substrat in rot und das Wasser aus dem Lösungsmittel grün dargestellt. Die angegebenen Restenummern beziehen sich auf die Numerierung, wie man sie bei Furin findet. Für nähere Erläuterungen siehe Text (Abbildung verändert nach (Rockwell und Thorner, 2004)).

2.3 Furin

Furin ist sowohl durch sein ubiquitäres Auftreten und seiner physiologischen Bedeutung, als auch dadurch, daß es die am längsten bekannte Propeptidase der Säugetiere ist, gut charakterisiert und stellt damit den wichtigsten Vertreter der ganzen Gruppe dar. Ursprünglich hatte man angenommen, daß es sich nur um ein wenig interessantes konstitutives Enzym handelt, doch spätestens seitdem seine essentielle Funktion bei verschiedenen Krankheiten wie Milzbrand und Ebola erkannt wurde, hat sich besonders in Zeiten der Bedrohung durch Biowaffen diese Meinung grundlegend geändert. Die Hauptaufgabe des Furins liegt allerdings bei der Prozessierung vieler verschiedener Propeptide des eigenen Körpers, z. B. von Wachstumsfaktoren, Hormonen, Rezeptoren, Plasma- und Matrixmetalloproteinen (Tabelle 2). Dem Furin kommt eine besondere Rolle bei der Homöostase, diversen Stoffwechselforgängen und der embryonalen Entwicklung zu.

Wie bereits aus der Abbildung 1 hervorgeht, besitzt die Preproform des Furins ein Signalpeptid mit einer Länge von 24 Aminosäuren, eine Prodomäne (83 Aminosäuren), eine subtilisin-ähnliche katalytische Domäne (337 Aminosäuren) und eine P-Domäne (133 Aminosäuren). Es ist ein Typ I-Transmembranprotein mit einer Transmembran- (21 Aminosäuren) und einer C-terminalen zytoplasmatischen Domäne (58 Aminosäuren). Der Bereich zwischen der konservierten P-Domäne und der Transmembrandomäne wird aufgrund seiner zwölf Cysteine als cysteinreiche (*cys-rich*)-Domäne bezeichnet und hat eine Länge von 150 Aminosäuren bei der Maus bzw. 151 beim Menschen. Die Gesamtlänge des Furins beträgt 793 bzw. 794 Aminosäuren bei Maus und Menschen bei einer Sequenzidentität zwischen beiden Proteinen von fast 94 %. Das Gesamtgewicht der glykosylierten und phosphorylierten Proform liegt bei 96 kDa und das der reifen Form bei 90 kDa (Creemers *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1995; Leduc *et al.*, 1992). Basierend auf den Kristallstrukturen von Subtilisin BPN⁷ und Thermitase wurde eine dreidimensionale Struktur der katalytischen Domäne mit zwei Disulfidbrücken und zwei Kalziumbindestellen vorhergesagt (Siezen *et al.*, 1994).

2.3.1 Reifung und subzelluläre Lokalisation von Furin

Das Gen *fur* wird von mindestens drei verschiedenen Promotoren in mRNA-Isoformen transkribiert, die sich im nicht-translatierten Bereich unterscheiden. Zwei der Promotoren entsprechen denen von konstitutiven Genen (*housekeeping genes*), wobei der dritte eine TATA-Box besitzt und wahrscheinlich reguliert wird (Ayoubi *et al.*, 1994). Bisher konnte man die mRNA bzw. das Protein in allen untersuchten Geweben finden (Hatsuzawa *et al.*, 1990).

Die Expression des Furins erfolgt im rauen Endoplasmatischen Retikulum und mit Hilfe eines Signalpeptids wird es ins Lumen des ERs abgegeben, bleibt aber über die Transmembrandomäne und den zytoplasmatischen Teil mit der ER-Membran verbunden (Abbildung 3). Nach der kotranslationalen Abspaltung des Signalpeptids liegt das Protein zunächst als inaktives Profurin vor und muß einen Reifungsprozeß durchlaufen. Im ER wird die korrekte Faltung initiiert, die Disulfidbrücken ausgebildet und zwei N-glykosidische Zucker angefügt (Cameron *et al.*, 2000; Misumi *et al.*, 1991; Vey *et al.*, 1994). Bei der Faltung wirkt die Prodomäne vermutlich als intramolekulares Chaperon (Molloy *et al.*, 1999). Bevor das Furin das ER verlassen kann, findet unter neutralen pH-Bedingungen eine kalziumabhängige, intramolekulare autokatalytische Abspaltung des Propeptids C-terminal nach dem Sequenzmotiv Lys-Arg-Arg-Thr-Lys-Arg¹⁰⁷ statt (Creemers *et al.*, 1993; Leduc *et al.*, 1992). Das abgespaltene Propeptid verbleibt an der katalytischen Domäne, hemmt

diese als Autoinhibitor. Es entsteht eine transportkompetente Form des Furins, die über das ER-Golgi-intermediäre Kompartiment (ERGIC) den Golgi-Apparat erreicht, wo die N-glykosidischen Zucker zu komplexen Zuckern modifiziert werden (Vey *et al.*, 1994). Im leicht sauren Milieu (pH ~6,2) des Transgolginetzwerks (TGN) findet eine weitere kalziumabhängige autokatalytische Spaltung des Propeptides C-terminal der Sequenz Arg-Ala-Val-Thr-Lys-Arg75 statt (Anderson *et al.*, 1997; Molloy *et al.*, 1994; Vey *et al.*, 1994). Ob es sich bei dieser zweiten Spaltung um eine inter- oder intramolekulare Reaktion handelt, ist unklar. Erst jetzt lösen sich die beiden Proproteinfragmente von der katalytischen Domäne und das Furin wird aktiv.

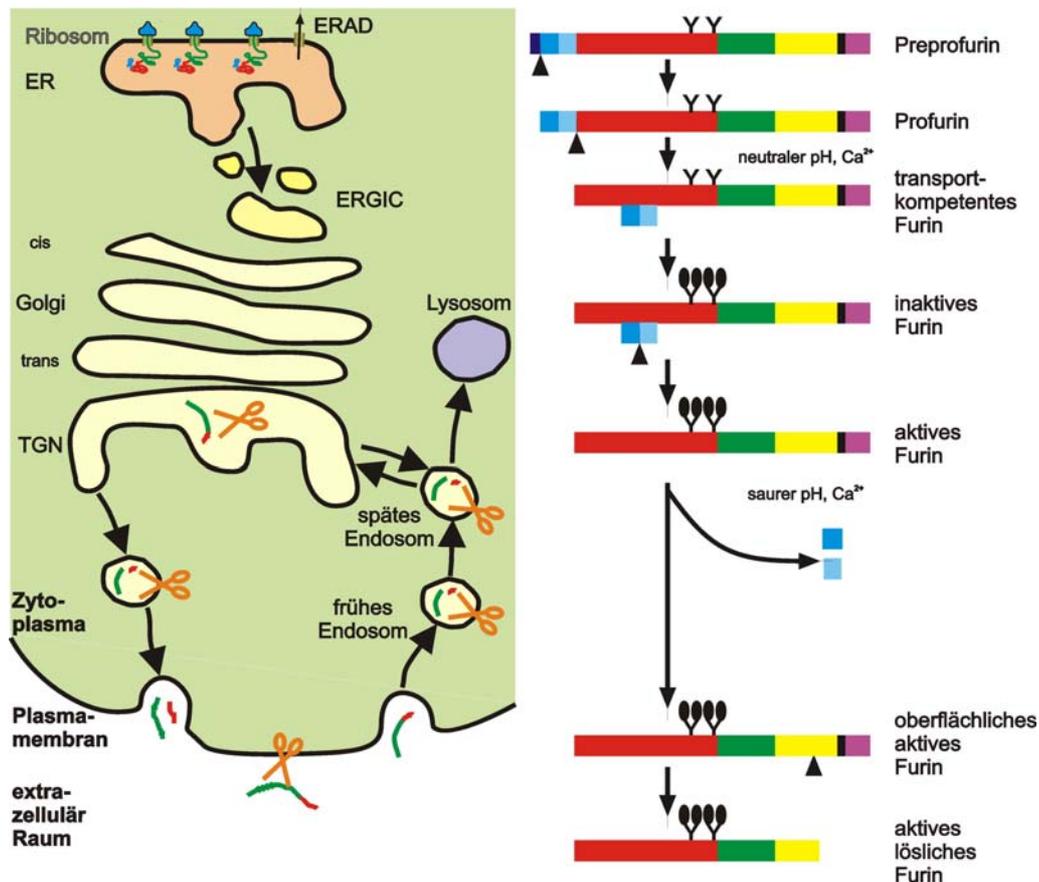


Abbildung 3: Prozessierung von Furin. Links ist der sekretorische Transportweg mit den beteiligten Kompartimenten und rechts die verschiedenen Schritte der Prozessierung von Furin dargestellt. Im rauhen Endoplasmatischen Retikulum (ER) wird das Preprofurin synthetisiert und kotranslational das Signalpeptid abgespalten. Hier erfolgt die Faltung und die N-gekoppelte Glykosylierung. Nicht richtig gefaltetes Protein wird der ER-assoziierte Degradation (ERAD) zugeführt. Bei einem neutralen pH-Wert wird vom Profurin die Prodomäne abgeschnitten, verbleibt aber an der katalytischen Domäne. Die inaktive, transportkompetente Form gelangt über das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) in den Golgi-Apparat, wo die Zucker modifiziert werden. Im Transgolginetzwerk (TGN) wird schließlich die Prodomäne geschnitten und löst sich von der katalytischen Domäne. Das Furin ist im TGN, in Endosomen und extrazellulär aktiv (dargestellt durch eine Schere). In einer C-terminal geschnittenen Form kann es sich auch von der Plasmamembran lösen.

Gesteuert über die zytoplasmatische Domäne sammelt sich das aktive Furin im Transgolginetzwerk oder gelangt über den Biosyntheseweg zur Plasmamembran und ist an der

Zelloberfläche aktiv. Von dort kann es über den Endozytoseweg wieder internalisiert und als aktives Protein zurück ins TGN geführt oder, wenn es bereits aggregierte, in den Lysosomen entsorgt werden (Molloy *et al.*, 1999; Molloy *et al.*, 1994). Neben dem Furin mit zytoplasmatischer Domäne gibt es auch lösliche Formen, bei denen zwischen der P-Domäne und der Transmembrandomänen weitere Spaltstellen liegen (*shedding*). So wurde für die Expression von humanem Furin in *human embryonic kidney 293*-Zellen (HEK-293) eine verkürzte Form mit Ser682 als C-Terminus beschrieben (Plaimauer *et al.*, 2001). Hingegen konnte in der vorliegenden Arbeit bei der Expression von Furin der Maus in *chinese hamster ovary*-Zellen (CHO) eine verkürzte Form mit einem C-Terminus im Bereich von Rest 585 gefunden werden.

2.3.2 Substrate und Inhibitoren

Furin besitzt eine hohe Substratspezifität und spaltet bevorzugt C-terminal dem Sequenzmotiv Arg-X-(Lys/Arg)-Arg (Hosaka *et al.*, 1991; Molloy *et al.*, 1992), doch möglicherweise beschränkt sich das minimale Erkennungsmotiv auf Arg-X-X-Arg (Molloy *et al.*, 1992). Außerdem besteht eine Präferenz für weitere basische Aminosäuren, so daß ein Fehlen von P4-Arg durch ein P6-Arg kompensiert werden kann (Krysan *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1992). Durch Koexpressions- und *in vitro*-Experimenten wurde die Substratspezifität von Furin näher untersucht. Die möglichen Substrate reichen von Serumproteinen, Hormonen, Neuropeptiden, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Matrixmetalloproteasen, bis zu bakteriellen Toxinen und Hüllglykoproteinen von Viren (Tabelle 2). Ob Furin letztendlich auch *in vivo* für die Prozessierung verantwortlich ist oder möglicherweise anderen Proproteinkonvertasen diese Aufgabe zu kommt, ist oft unklar.

Auch wenn sich ein Totalausfall von Furin bei Säugetieren während der Embryogenese letal auswirkt (Roebroek *et al.*, 1998), so konnte in Zellkultur gezeigt werden, daß bei fehlender bzw. gehemmter Furinaktivität die Überlebensfähigkeit von *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A-exponierten Zellen erhöht ist (Jean *et al.*, 1998; Moehring und Moehring, 1983; Sarac *et al.*, 2002). Durch die Hemmung werden die auf der Zelloberfläche bindenden Toxinmoleküle nicht mehr gespalten und in die Zelle aufgenommen. Man geht davon aus, daß Furin auch bei Viren, wie z. B. dem humanen Immundefizienzvirus (HIV-1) oder dem Influenza-Virus für die Pathogenität verantwortlich ist. Erst eine Spaltung der viralen Glykoproteine HIV gp160 bzw. Hämagglutinin im Transgolginetzwerk nach einem furinspezifischen Sequenzmotiv führt zur Infektiosität der HIV- und Influenza-Viren. Die Prozessierung der Glykoproteine läßt sich durch Zugabe

von peptidischen Chloromethylketoninhibitoren verhindern (Hallenberger *et al.*, 1992; Moulard und Decroly, 2000; Stieneke-Gröber *et al.*, 1992).

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	▼	P1'	P2'
Serumproteine									
Proalbumin	R	G	V	F	R	R		D	A
Pro-Faktor IX	L	N	R	P	K	R		Y	N
Pro-Protein C	R	S	H	L	K	R		D	T
Pro-von Willebrandfaktor	S	H	R	S	K	R		S	L
Hormone und Wachstumsfaktoren									
Pro-β-NGF	T	H	R	S	K	R		S	S
BMP-4 Vorläufer	R	R	R	A	K	R		S	P
Pro-BNP	T	L	R	A	P	R		S	P
Pro-Parathyroidhormon	K	S	V	K	K	R		S	V
Pro-Semaphorin D	K	R	R	T	R	R		Q	D
Pro-TGF β1	S	S	R	H	R	R		A	L
Pro-Neurotrophin-3	T	S	R	R	K	R		Y	A
Pro-IGF 1	P	A	K	S	A	R		S	K
Pro-Endothelin-1	L	R	R	S	K	R		C	S
Zelloberflächenrezeptoren									
Insulin-Prorezeptor	P	S	R	K	R	R		S	L
Notch 1 Rezeptor	G	G	R	Q	R	R		E	L
Scatterfaktorrezeptor	E	K	R	K	K	R		S	T
Vitamin B ₁₂ Prorezeptor	L	Q	R	Q	K	R		S	I
Helferproteine/Chaperone									
Pro-7B2	Q	R	R	K	R	R		S	V
Extrazelluläre Matrixproteine									
BMP-1	R	S	R	S	R	R		A	A
humanes MT-MMP1	N	V	R	R	K	R		Y	A
Integrin α3-Kette	P	Q	R	R	R	R		Q	L
Integrin α6-Kette	N	S	R	K	K	R		E	I
Profibrillin	R	G	R	K	R	R		S	T
Stromelysin-3	R	N	R	Q	K	R		F	V
TACE/ADAM17	V	E	R	V	K	R		R	A
Bakterielle Gifte									
Anthraxtoxin PA	N	D	R	K	K	R		S	T
<i>Clostridium septicum</i> α-Toxin	K	R	R	G	K	R		S	T
Diphtheriatoxin	G	N	R	V	R	R		S	V
Proaerolysin	K	V	R	R	A	R		S	V
<i>Pseudomonas</i> Exotoxin A	R	H	R	Q	P	R		G	W
Shigatoxin	A	S	R	V	A	R		M	A
Virale Hüllproteine									
Vogelinfluenza HA (H5N1)	R	R	R	K	K	R		G	L
Ebola Zaire GP	G	R	R	T	R	R		E	A
HIV-1 gp160	V	Q	R	E	K	R		A	V
infektiöses Bronchitisvirus E2	T	R	R	F	R	R		S	I
Masernvirus F ₀	S	R	R	H	K	R		F	A
Gelbfiebervirus M	S	G	R	S	R	R		S	V

Tabelle 2: Auswahl einiger Furinsubstrate, für die durch zellulärer Koexpression oder *in vitro*-Experimenten eine Spaltung durch Furin gezeigt werden konnte. Basische Reste sind fettgedruckt. Die Tabelle wurde aus mehreren Übersichtsartikeln zusammengestellt (Molloy *et al.*, 1999; Molloy und Thomas, 2001; Nakayama, 1997).

In einem breiten pH-Bereich von 6,0 bis 8,5 besitzt Furin eine Aktivität von mindestens 50 %, wobei das pH-Optimum bei 7,0 bis 7,5 liegt (Molloy *et al.*, 1992). Die optimale Kalziumkonzentration beträgt 1 bis 3 mM. Durch Komplexierung der Kalziumionen mittels EDTA läßt sich eine Aktivität völlig unterbinden. Auch zweiwertige Metallionen wie Zn²⁺ und Hg²⁺ hemmen die Aktivität vollständig, wohingegen typische Serinproteaseinhibitoren, z. B. Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Leupeptin, keine Wirkung zeigen (Molloy *et*

al., 1992; Stieneke-Gröber *et al.*, 1992). Ein spezifischer Inhibitor ist das Dekanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chloromethylketon (Angliker *et al.*, 1993; Hallenberger *et al.*, 1992; Jean *et al.*, 1998; Stieneke-Gröber *et al.*, 1992), das kovalent und irreversibel an die katalytischen Reste His194 und Ser368 bindet. Als spezifische, nicht-kovalent bindende Inhibitoren im nanomolaren Konzentrationsbereich konnten bisher zum einen der proteinbasierende Inhibitor α_1 -antitrypsin Portland (α_1 -PDX) (Jean *et al.*, 1998) und zum anderen Peptide, bestehend aus sechs bis zehn L- oder D-Argininen gefunden werden (Cameron *et al.*, 2000; Sarac *et al.*, 2002). Derzeit eignet sich keiner der gefundenen Inhibitoren für eine medizinische Anwendung, da sie entweder durch zu geringe Spezifität in zu hohen Konzentrationen eingesetzt werden müssten oder durch ihre nicht-kompetitive Hemmung zu schwersten Nebenwirkungen führen würden. Eine Hauptaufgabe wird es daher in Zukunft sein, sehr potente und spezifische kompetitive Hemmstoffe zu finden.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Iris Lindberg am LSUHC in New Orleans gelang es erstmals, ein lösliches aktives Konstrukt der katalytischen und der P-Domäne vom Furin der Maus in größeren Mengen zu exprimieren. Die Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit war es, nach Hemmung des Konstrukts mit einem kovalent bindenden Inhibitor das Protein zu kristallisieren und die Röntgenstruktur aufzuklären. Mit Hilfe dieser Struktur erwartete man sich, die bis dahin unbekannte P-Domäne und die hohe Substratspezifität von Furin beschreiben zu können. Des Weiteren sollten auf Grundlage dieser ersten Kristallstruktur einer Proproteinkonvertase Computermodelle der weiteren Mitglieder der Gruppe erstellt werden, um an ihnen mögliche Unterschiede in der Substratspezifität erklären zu können. Für mögliche spätere medizinische Anwendungen bestand zusätzlich die Aufgabe, in Inhibitorstudien weitere niedermolekulare Inhibitoren zu suchen bzw. bereits bekannte an Hand der Kristallstruktur zu optimieren.

3 Einführung in die Röntgenstrukturanalyse

Zur Bestimmung der Kristallstrukturen der Proteine Furin und Kollagen IV-NC1 (siehe Kapitel 7) mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse wurden verschiedene kristallographische Methoden verwendet. Nachfolgend sollen ausschließlich die verwendeten Methoden sowie deren theoretischen Hintergründe dargestellt werden. Hierbei wird zunächst auf die Symmetrieeigenschaften von Kristallen, dann auf die Röntgenbeugung und das Phasenproblem eingegangen. Die praktische Durchführung der Experimente wird in den Kapiteln 3.3 und 7.2 beschrieben.

3.1 Kristallsysteme

Kristalle sind Feststoffe, die in alle drei Raumrichtungen eine Fernordnung aufweisen. Der Aufbau des Kristalls kann durch das kleinste sich wiederholende Motiv, der sogenannten Elementarzelle, sowie der Länge und Richtung der drei Basisvektoren¹ **a**, **b** und **c** vollständig beschrieben werden. Wendet man die Basisvektoren auf die Elementarzelle an, so erhält man ein raumfüllendes Translationsgitter, in dem jeder Punkt durch den Vektor $\mathbf{r} = n_1\mathbf{a} + n_2\mathbf{b} + n_3\mathbf{c}$ mit n_1, n_2, n_3 als ganze Zahlen darstellbar ist. Die Beträge a, b, c der Basisvektoren bezeichnet man auch, da sie genau der Maschenweite des Translationsgitters entsprechen, als Gitterkonstanten. Um nun eine Elementarzelle zu charakterisieren, gibt man die Gitterkonstanten und die von den Basisvektoren umschlossenen Winkeln α, β und γ an.

Innerhalb einer Elementarzelle können höhere Ordnungen auftreten, die durch Symmetrieeoperatoren beschrieben und in sogenannte kristallographische Raumgruppen zusammengefaßt werden. Die Verkettung der geometrischen Symmetrieeoperationen, Translation, Rotation, Schraubenrotation, Spiegelung, Gleitspiegelung, Inversion und Drehinversion, erlaubt die Bildung von 230 verschiedenen Raumgruppen. Da alle Aminosäuren außer Glycin eine Chiralität aufweisen und in Proteinen fast ausschließlich L-Aminosäuren vorkommen, scheiden Inversionszentren und Spiegelebenen für die Proteinkristallographie aus. Die noch verbleibenden Symmetrieeoperatoren beschränken die Zahl der Raumgruppen in Proteinkristallen auf 65 (Tabelle 3). Der kleinste Teil der Zelle, mit dem über die Symmetrieeoperationen die ganze Elementarzelle beschrieben werden kann, heißt asymmetrische Einheit.

¹ Vektoren werden nachfolgend fettgedruckt dargestellt.

Kristallsystem	Gitterkonstanten und Winkel	Bravais-Gitter	Punktgruppe	Raumgruppe
triklin	-	aP	1	P1
monoklin	$\alpha = \gamma = 90^\circ$	mP, mC	2	P2, P2 ₁ , C2
orthorhombisch	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	oP, oC, oI, oF	222	P222, P222 ₁ , P2 ₁ 2 ₁ 2, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ , C222 ₁ , C222, F222, I222, I2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
tetragonal	$a = b$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	tP, tI	4 422	P4, P4 ₁ , P4 ₂ , P4 ₃ , I4, I4 ₁ , P422, P42 ₁ 2, P4 ₁ 22, P4 ₁ 2 ₁ 2, P4 ₂ 22, P4 ₂ 2 ₁ 2, P4 ₃ 22, P4 ₃ 2 ₁ 2, I422, I4 ₁ 22
trigonal, hexagonal	$a = b$ $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$	hP, hR	3 32 6 622	P3, P3 ₁ , P32, R3 , P312, P321, P3 ₁ 12, P3 ₁ 21, P3 ₂ 12, P3 ₂ 21, R32, P6, P6 ₁ , P6₅ , P6 ₃ , P6 ₂ , P6 ₄ , P622, P6 ₁ 22, P6 ₅ 22, P6 ₂ 22, P6 ₄ 22, P6 ₃ 22
kubisch	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	cP, cI, cF	23 432	P23, F23, I23, P213, I213, P432, P4 ₃ 2, F432, F4 ₁ 32, I432, P4 ₃ 32, P4 ₁ 32, I4 ₁ 32

Tabelle 3: Die Kristallsysteme mit den Beschränkungen ihrer Gitterkonstanten und Winkel, sowie die Einteilung in Bravais-Gruppen (P = primitiv; I = innenzentriert; C = auf die C-Seite zentriert; F = allseits flächenzentriert; R = rhomboedrisch zentriert) und der für die Proteinkristallographie relevanten Punkt- und Raumgruppen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Raumgruppen P1, P6₅ und R3 sind fett gedruckt.

Die zur Strukturbestimmung von Furin und Kollagen IV-NC1 verwendeten Kristalle besaßen die Raumgruppen P1 und P6₅ bzw. R3. Die nachfolgenden Beschreibungen beschränken sich weitgehend auf diese Raumgruppen.

3.1.1 Bravais-Gitter

Aufgrund der Gitterkonstanten und der Winkel können die Elementarzellen von Kristallen in sieben Kristallsysteme eingeteilt werden (Tabelle 3). Hierbei ist die triklin Form die allgemeinste, denn sie weist keinerlei Anforderungen an die Gitterkonstanten und Winkel auf, wohingegen bei höheren Kristallsystemen zusätzliche Anforderungen auftreten. Für eine trigonale bzw. hexagonale Zelle müssen z. B. die Gitterkonstanten a und b identisch und die Winkel exakt $\alpha = \beta = 90^\circ$ sowie $\gamma = 120^\circ$ sein.

Bisher wurden die Basisvektoren so in das Kristallgitter gelegt, daß sie die kleinstmöglichen Beträge besitzen und die sich daraus ergebene Elementarzelle die kleinste, sich periodisch wiederholende Volumeneinheit hat. Gibt es hierbei mehrere Möglichkeiten, die Basisvektoren im Gitter zu plazieren, so wählt man nach Möglichkeit ein orthogonales oder hexagonales Kristallsystem, bei dem der Ursprung der Vektoren in einem Symmetriezentrum liegt. Bei all diesen Anordnungen sind keine weiteren Gitterpunkte innerhalb der Elementarzelle vorhanden, weshalb die Zelle auch als „primitiv“ bezeichnet wird. Doch es ist durchaus möglich, wie z. B. bei den Kollagen IV-NC1-Kristallen, daß Symmetrien im Kristall nur eine schiefwinkelige primitive Elementarzelle zulassen,

wodurch eine niedrigere Symmetrieklasse zustande kommt. In diesem Fall wählt man die Richtung der Basisvektoren in der Art, daß sie sowohl die Symmetriezentren geeignet beschreiben als auch ein höheres Kristallsystem ergeben. Man verzichtet dabei auf das kleinstmögliche Volumen der Elementarzelle als auch auf die kleinstmöglichen Gitterkonstanten, außerdem nimmt man in Kauf, daß die größere Zelle zusätzliche Translationsgitterpunkte enthält. Durch die zusätzlichen Gitterpunkte entstehen zentrierte Gittertypen, die zusammen mit den sieben primitiven Gittern die vierzehn Bravais-Gitter bilden. In Spalte 3 der Tabelle 3 steht der Kleinbuchstabe für das Kristallsystem und der Großbuchstabe für die Art der Zentrierung. Bei P (für primitiv) liegt die primitive Zelle vor, die keine zentrierten Gitterpunkte enthält. Die beiden Kristallformen des Furins besaßen eine solche primitive Zelle. Da die Kristalle des Kollagen IV-NC1 zum rhomboedrischen Bravais-Gittertyp mit der Abkürzung R (für Rhomboeder-Zentrierung) gehörten, soll dieser Typ nachfolgend kurz erläutert werden:

Wie oben erwähnt, erfüllt das hexagonale Kristallsystem die Bedingungen $a = b$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ und $\gamma = 120^\circ$. Beim rhomboedrischen Sonderfall hat die kleinste primitive Zelle, in die jeder Bravais-Gittertyp überführt werden kann, zusätzlich die Restriktionen $a = b = c$ und $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$ und ist somit wie ein verzerrter Würfel. In der Abbildung 4 sind die Basisvektoren der primitiven Zelle mit a' , b' und c' beschriftet und ihr Ursprung fällt mit denen von a , b , c zusammen. Die vom Ursprung ausgehende Raumdiagonale der primitiven Zelle, ist eine 3-zählige Symmetrieachse und entspricht der c -Achse im hexagonalen Kristallsystem. Die Eckpunkte des Rhomboeders, stellen zwei innenliegende Gitterpunkte in der trigonalen Zelle dar. Die Koordinaten der Punkte, hier in Form von Atomparametern (*fractional coordinates*) angegeben, das heißt als Bruchteile der Gitterkonstanten a , b und c , sind $\frac{1}{3}$, $\frac{2}{3}$, $\frac{2}{3}$ und $\frac{2}{3}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{3}$ (obverse Aufstellung) oder $\frac{2}{3}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{2}{3}$ und $\frac{1}{3}$, $\frac{2}{3}$, $\frac{1}{3}$ (reverse Aufstellung). Prinzipiell könnte man also das rhomboedrische Kristallgitter als primitive Zelle beschreiben, doch aufgrund der höheren Symmetrieordnung wurde die hexagonale Aufstellung gewählt.

gelangen, dreht man entlang der c-Achse schauend gegen den Uhrzeigersinn um $2\pi/6 = 60^\circ$ und schiebt dann um $1/6$ vorwärts.

3.2 Röntgenbeugung an Kristallen

3.2.1 Reflexion von Röntgenstrahlen

Als Röntgenstrahlung bezeichnet man sehr energiereiche elektromagnetische Strahlung, die im vorliegenden Fall monochromatisch war und eine Wellenlänge λ im Bereich von 0,91 bis 3,15 Å hatte. Trifft diese Strahlung auf ein Atom, so regt das oszillierende elektrische Feld die Elektronen zur frequenzgleichen Schwingung an, die wiederum Sekundärstrahlung abgeben². Die von den Atomen ausgesandten Wellen summieren sich, was in den meisten Fällen zu einer gegenseitigen Auslöschung führt. Nur wenn durch die Abstände der Atome zueinander ein Gangunterschied zwischen den ausgesandten Wellen von $n\lambda$ mit ganzzahligem n zustande kommt, tritt konstruktive Interferenz auf und es sind sich verstärkende Wellen zu beobachten. In Analogie zum sichtbaren Licht kann man diesen Umstand auch in Form einer Reflexion an Ebenen beschreiben. Die Ebenen, an denen eine solche Reflexion stattfindet, nennt man Netzebenen. Sie werden durch drei Punkte des Translationsgitters festgelegt und mit Hilfe der ganzzahligen Miller'schen Indizes hkl charakterisiert. Hierbei ermittelt man die Netzebenenschar hkl durch die dem Nullpunkt am nächsten gelegenen Netzebene, welche die a-, b- und c-Achse der Elementarzelle in den Achsenabschnitten $1/h$, $1/k$ und $1/l$ mit stets rationalen Brüchen schneidet. Unabhängig der Orientierung umfaßt die Schar paralleler Netzebenen alle Gitterpunkte.

Die Bedingung, unter der bei einer Reflexion ein Gangunterschied von $n\lambda$ zustande kommt und Reflexe auftreten, wird in der Braggschen Gleichung zusammengefaßt, wobei d_{hkl} der Abstand der Netzebenen hkl und θ_{hkl} der Einfalls- bzw. Ausfallswinkel ist:

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

In der Proteinkristallographie braucht man im Wellenlängenbereich von bis zu ca. 1,8 Å meistens nur die Interferenz 1. Ordnung ($n = 1$) berücksichtigen. Mißt man hingegen bei längeren Wellenlängen (z. B. $\lambda = 3,15$ Å), wie sie zur Bestimmung der Kalziumlagen verwendetet wurden, gewinnen auch Interferenzen höherer Ordnungen ($n = 2, 3$) an Bedeutung (siehe Kapitel 4.3.1.2).

² Der Sonderfall der anomalen Streuung wird später betrachtet.

3.2.2 Reziprokes Gitter

In einem Proteinkristall lassen sich eine Vielzahl von Netzebenen konstruieren, für die jeweils ein Reflex berechnet werden kann. Da dies sehr unübersichtlich wird, bietet es sich an, die Netzebenen nicht im realen, sondern im reziproken Gitter darzustellen. Hierzu wird jede Netzebenenschar durch einen Vektor \mathbf{d}_{hkl} beschrieben, der die Länge $|\mathbf{d}_{hkl}|$ zwischen den benachbarten Netzebenen und die Richtung der Flächennormalen besitzt. Aus der Bragg'schen Gleichung ergibt sich $1/2d_{hkl} = \sin \theta_{hkl} / n \lambda$. Somit wird der Beugungswinkel θ_{hkl} ($0^\circ \leq \theta_{hkl} \leq 90^\circ$) um so größer, je kürzer \mathbf{d}_{hkl} wird. Im reziproken Raum ist der reziproke Netzebenenabstand $d_{hkl}^* = 1/d_{hkl}$ und der Vektor \mathbf{d}_{hkl}^* steht ebenfalls senkrecht auf der Ebene hkl . Der Vektor \mathbf{d}_{hkl}^* endet in einem Gitterpunkt eines reziproken Gitters, das aus den reziproken Einheitsvektoren \mathbf{a}^* ($a^* = 1/a$), \mathbf{b}^* ($b^* = 1/b$) und \mathbf{c}^* ($c^* = 1/c$) gebildet wird. Für diese Vektoren gilt: \mathbf{a}^* steht senkrecht auf Ebene (100), \mathbf{b}^* senkrecht auf Ebene (010) und \mathbf{c}^* senkrecht auf Ebene (001). In Entsprechung zum realen Gitter läßt sich jeder reziproke Gitterpunkt durch $\mathbf{d}_{hkl}^* = h \mathbf{a}^* + k \mathbf{b}^* + l \mathbf{c}^*$ beschreiben.

Der entscheidende Vorteil des reziproken Gitters wird an Hand der Ewald-Konstruktion sichtbar (Abbildung 5): Wir befinden uns im zweidimensionalen reziproken Raum und ziehen einen Kreis um den Mittelpunkt M mit dem Radius $1/\lambda$ der eingesetzten Wellenlänge. Auf der Kreisbahn befindet sich der Ursprung O des reziproken Gitters, der identisch mit dem des realen Gitters ist. Dreht man nun den Kristall um O, so dreht sich auch das reziproke Gitter und nacheinander schneiden die Gitterpunkte hkl die Kreisbahn. Die Strecke zwischen einem solchen Schnittpunkt P und dem Ursprung O ist gleich dem Netzebenenabstand $d_{hkl}^* = 1/d_{hkl}$ und es folgt nach der Bragg'schen Gleichung, daß der Winkel zwischen den Strecken MP und MO $2\theta_{hkl}$ ist bzw. $2\sin \theta_{hkl} = OP/MO$ gilt. Hieraus ergibt sich, daß ein Röntgenstrahl s_0 , der durch den Mittel- und Ursprung der Konstruktion geht, nur dann zu einem Reflex hkl führt, wenn ein reziproker Gitterpunkt auf der Kreisbahn liegt. Der erzeugte Streustrahl beginnt im Mittelpunkt M und läuft durch diesen Gitterpunkt hkl . Die hier vorgestellte Ewald-Konstruktion läßt sich auch auf den dreidimensionalen Raum ausdehnen und wird dann Ewald-Kugel genannt.

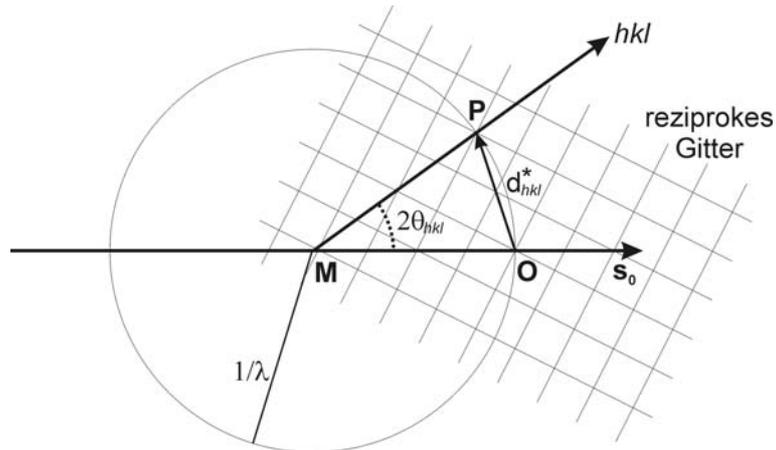


Abbildung 5: Ewald-Konstruktion. Der eintretende Röntgenstrahl s_0 führt dann im Kristall zu einem gestreuten Röntgenstrahl hkl , wenn das reziproke Gitter (hier nur zweidimensional dargestellt) um den Ursprung O gedreht wird und dabei ein reziproker Gitterpunkt P den Kreis mit dem Radius $1/\lambda$ schneidet. Die Strecken zwischen P und dem Mittelpunkt M sowie zwischen M und O umschließen den Winkel 2θ . Die Strecke zwischen O und P hat die Länge d_{hkl}^* .

Dreht man den Kristall um genau 180° um den Ursprung O , so schneiden nicht die reziproken Gitterpunkte hkl , sondern die zentrosymmetrischen Gitterpunkte \overline{hkl} , also die Punkte mit $\mathbf{d}_{hkl}^* = -h \mathbf{a}^* - k \mathbf{b}^* - l \mathbf{c}^*$, die Kreisbahn und es kommt zu den Reflexen \overline{hkl} . Diese Eigenschaft bezeichnet man als Friedelsymmetrie und die Reflexe hkl und \overline{hkl} als ein Friedelpaar. Die Ausnahme hiervon wird später bei der anomalen Streuung besprochen.

Im Beugungsexperiment an Kristallen sorgt die Symmetrie nicht nur dafür, daß durch Überlagerung positiver Interferenzen meßbare Reflexintensitäten entstehen. Es können ebenso Auslöschungen von Reflexen auftreten, die nach der Bragg'schen Gleichung eigentlich beobachtbar wären. Durch das systematische Fehlen von Reflexen im Beugungsbild kann auf den Bravais-Gittertyp geschlossen werden. Beim primitiven Gitter kommt es zu keinen integralen Auslöschungen von Reflexen, das heißt Auslöschungen, bei denen h , k und l betroffen sind. Damit sind für die Reflexe alle Kombinationen von h , k und l erlaubt. Bei der rhomboedrischen Raumgruppe $R3$ kommt es dagegen immer dann zu Auslöschungen, wenn in der obversen Aufstellung $-h+k+l=3n$ und in der reversen Aufstellung $h-k+l=3n$ erfüllt ist. Bei der Raumgruppe $P6_5$ treten zwar keine integralen Auslöschungen auf, wohl aber serielle Auslöschungen für $l=6n$, was auf eine Schraubenachse hinweist.

3.2.3 Phasenverschiebung

Bei der bisherigen Betrachtung wurde eine einatomige Struktur mit punktförmigen Streuzentren genau an den Gitterpunkten angenommen. Da die Streuung der Röntgenstrahlung jedoch an der Elektronenhülle eines Atoms erfolgt, liegt eine räumliche Ausdehnung vor, und die Größe der winkelabhängigen Amplitude $f(\theta)$ (Atomformfaktor)

der gestreuten Welle ist weitgehend proportional zur Elektronenzahl. Die räumliche Ausdehnung der Elektronenhülle bedeutet, daß mit der Entfernung δ von der Ideallage des Gitterpunktes eine Phasenverschiebung $\Phi_{hkl} = \delta \cdot 2\pi/d_{hkl}$ erfolgt, die umso größer wird, je kleiner der Netzebenenabstand d_{hkl} bzw. je größer $\sin \theta_{hkl}/\lambda$ ist. Neben dem winkelabhängigen Atomformfaktor $f(\theta)$ sorgt eine mittlere Auslenkungsamplitude u , z. B. durch thermische Schwingungen der Atome, für eine Phasenverschiebung und man kann beide unter isotropen Bedingungen zu der isotropen Streuamplitude $f_{iso}(\theta) = f(\theta) \cdot \exp(-2\pi^2 u^2/d_{hkl}^2)$ zusammenfassen. Meist wird dabei d_{hkl} durch $\sin \theta_{hkl}/\lambda$ ersetzt, so daß man $f_{iso}(\theta) = f(\theta) \cdot \exp(-8\pi^2 u^2 \sin^2 \theta_{hkl}/\lambda^2)$ erhält. Oft wird der Faktor $8\pi^2$ mit in die mittlere Schwingungsamplitude einbezogen und es ergibt sich der in der Physik verbreitete „Debye-Waller-Faktor“ B mit $B = 8\pi^2 u^2$. Da in den meisten Fällen, wie auch bei Furin und Kollagen IV-NC1, die Atome nicht isotrop, also in alle Raumrichtung gleich stark, sondern anisotrop schwingen, geht ein zusätzlicher Tensor in die Gleichung mit ein, der die Richtungsabhängigkeit der Auslenkungsamplituden berücksichtigt. Die Atomform- und B -Faktoren erlauben es, die Atome bei den Berechnungen wieder zu ihren punktförmigen Mittellagen zu vereinfachen. Nachfolgend wird $f_{iso}(\theta)$ vereinfacht als f geschrieben.

In mehratomigen Strukturen gilt für alle Atome das gleiche Translationsgitter, doch weichen die neu hinzugekommenen Atome j um x_j, y_j, z_j von der Netzebene hkl des ersten Atoms ab, so daß ihre Streuwellen wie oben beschrieben eine Phasenverschiebung $\Phi_{j,hkl} = 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j)$ erfahren. Jede dieser Streuwellen läßt sich als komplexe Größe (in der Gaußschen Zahlenebene als reale und imaginäre Achsen) durch den Vektor $\mathbf{F}_{j,hkl} = f_j \cdot \exp(i \Phi_{j,hkl}) = f_j (\cos \Phi_{j,hkl} + i \sin \Phi_{j,hkl})$ bzw. mit $A_{j,hkl} = f_j \cos \Phi_{j,hkl}$ und $B_{j,hkl} = f_j \sin \Phi_{j,hkl}$ als $\mathbf{F}_{j,hkl} = A_{j,hkl} + i B_{j,hkl}$ darstellen. Alle Streuwellen interferieren miteinander und addieren sich zum Strukturfaktor

$$\mathbf{F}_{hkl} = \sum_j f_j \left[\cos 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j) + i \sin 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j) \right] = \sum_j f_j (\cos \Phi_{j,hkl} + i \sin \Phi_{j,hkl})$$

mit der Phasenverschiebung

$$\Phi_{hkl} = \arctan \left(\frac{\sum_j f_j \sin \Phi_{j,hkl}}{\sum_j f_j \cos \Phi_{j,hkl}} \right) = \arctan \left(\frac{\sum_j B_{j,hkl}}{\sum_j A_{j,hkl}} \right)$$

und der Amplitude $|\mathbf{F}_{hkl}|$. Aus der Friedelsymmetrie ergibt sich

$$\mathbf{F}_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}} = \sum_j f_j (\cos -\Phi_{j,\bar{h}\bar{k}\bar{l}} + i \sin -\Phi_{j,\bar{h}\bar{k}\bar{l}}),$$

so daß beide Reflexe dieselbe Amplitude $|\mathbf{F}_{hkl}| = |\mathbf{F}_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}|$ besitzen, aber der Phasenwinkel das Vorzeichen wechselt. Das Quadrat $|\mathbf{F}_{hkl}|^2$ ist proportional zu der im Streuexperiment beobachteten Intensität I_{hkl} .

Wie oben erwähnt wurde, erfolgt die Röntgenstreuung an der Elektronenhülle. Somit ist der Strukturfaktor \mathbf{F}_{hkl} eine Funktion, die die Elektronendichteverteilung $\rho(x, y, z)$ an der Stelle x, y und z des Realraums auf den reziproken Raum abbildet. Durch eine inverse Fouriertransformation, bei der alle Strukturfaktoren \mathbf{F}_{hkl} aufsummiert werden, gelangt man zur Elektronendichteverteilung:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \mathbf{F}_{hkl} e^{-i\Phi_{hkl}} = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \mathbf{F}_{hkl} \{ \cos[2\pi(hx + ky + lz)] + i \sin[2\pi(hx + ky + lz)] \}$$

Da die Strukturfaktoren Elektronen pro Elementarzelle, die Elektronendichteverteilung aber Elektronen pro Volumen angibt, muß die Summe der Strukturfaktoren durch das Volumen V der Elementarzelle geteilt werden.

3.3 Strukturlösung

Im Streuexperiment kann man derzeit nur die Strukturfaktoramplituden, nicht aber die Strukturfaktoren ermitteln. Die fehlende Phasenverschiebung muß auf anderem Wege bestimmt werden. Diesen Umstand bezeichnet man auch als das Phasenproblem der Kristallographie. Zur Lösung dieses Problems wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit die Methoden der *Multiwavelength Anomalous Dispersion* (MAD) und des molekularen Ersatzes (*Molecular Replacement*) verwendet. Da die entscheidenden Phasierungsschritte mit der MAD gelöst wurde, soll diese Methode hier beschrieben werden:

3.3.1 *Multiwavelength Anomalous Dispersion*

Für die bisherigen Berechnungen der Strukturfaktoren wurde eine klassische elastische Streuung der Röntgenstrahlen angenommen, bei der durch die einzelnen Atome weder eine Änderung der Energie noch der Phase (abgesehen von einer generellen Phasenverschiebung um 180°) hervorgerufen wurde. Wählt man jedoch die Frequenz des verwendeten Röntgenlichts so, daß sie der Eigenfrequenz der Elektronen entspricht, dann wird ein Elektron von einem niedrigen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Zurückfall des Elektrons auf das niedrigere Energieniveau entsteht Fluoreszenzstrahlung und es kommt zur anomalen Streuung des Photons. Hierbei resultiert der anomale Atomformfaktor $f_{\text{ano}}(\theta, \lambda)$ aus dem bereits eingeführten winkelabhängigen, Atomformfaktor $f_{\text{iso}}(\theta)$ sowie den wellenlängenabhängigen Dispersions- und Absorptionstermen:

$$f_{\text{ano}}(\theta, \lambda) = f_{\text{iso}}(\theta) + \Delta f'(\lambda) + i f''(\lambda) = f'(\lambda) + i f''(\lambda)$$

Der dispersive Term $\Delta f'(\lambda)$ verringert den Atomformfaktor und der anomale Term $f''(\lambda)$ liefert einen um 90° phasenverschobenen Beitrag. Mittels der Kramers-Kronig-Relation läßt sich f' aus f'' berechnen. Diagramme der beiden Terme für die Atome Tantal sowie Kalzium, Kalium und Schwefel sind in Abbildung 13 und Abbildung 14 dargestellt. Die Phasenverschiebung sorgt dafür, daß bei anomaler Streuung von Proteinkristallen das Friedelsche Gesetz mit $|\mathbf{F}_{hkl}| = |\mathbf{F}_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}|$ nicht mehr gilt.

Bei den durchgeführten MAD-Experimenten wurden zunächst starke anomale Streuer wie Br^- , $[\text{OsCl}_6]^{2-}$ oder $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}^{2+}$ den Kristallen hinzugefügt, die an beliebigen, aber festen Stellen innerhalb des Gitters banden. Anschließend wurden die Reflexe einschließlich der Friedelpaare bei drei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen. Die ersten beiden Wellenlängen lagen zum einen am Maximum der Absorptionskurve des zugefügten, anomalen Streuers, so daß $f''(\lambda_{\text{peak}})$ (*peak*) maximal wurde und zum anderen am Wendepunkt, wo der dispersive Term $\Delta f'(\lambda_{\text{edge}})$ (*edge*) ein Minimum hatte. Als Vergleichsreflexe wurde ein Datensatz (*remote*) bei einer Wellenlänge (hier $1,05 \text{ \AA}$), die weit von der Absorptionskante entfernt war, gemessen. Beim *remote*-Datensatz ist $\Delta f'(\lambda_{\text{remote}})$ nahezu null, liefert also keinen oder kaum einen dispersiven Beitrag zu $f_{\text{ano}}(\theta, \lambda_{\text{remote}})$. Bildet man nun die sogenannte dispersive Differenz zwischen $f_{\text{ano}}(\theta, \lambda_{\text{edge}})$ und $f_{\text{ano}}(\theta, \lambda_{\text{remote}})$, indem man die Differenz der Strukturfaktoramplituden $\Delta F_{\text{disp}} = |\mathbf{F}_{\text{edge}} - \mathbf{F}_{\text{remote}}|$ berechnet, so ergibt dies den dispersiven Beitrag $\Delta f'_{\text{edge}} \cos(\Phi_{\text{PH}} - \Phi_{\text{H}})$ (PH steht für Beitrag vom Protein und vom Schweratom bzw. H für den alleinigen Beitrag vom Schweratom) des betrachteten anomalen Streuers. Vergleicht man bei der Wellenlänge λ_{peak} $|\mathbf{F}_{hkl}|$ und $|\mathbf{F}_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}|$, dann erhält man die anomale Differenz³ $\Delta F_{\text{ano}} = |\mathbf{F}_{\text{peak}}^+ - \mathbf{F}_{\text{peak}}^-|$, die näherungsweise $2f''_{\text{peak}} \sin(\Phi_{\text{PH}} - \Phi_{\text{H}})$ entspricht. Sowohl aus der dispersiven als auch aus der anomalen Differenz kann mit Hilfe der Patterson-Funktion (siehe nächstes Kapitel) die Lage der anomalen Streuer im Realraum bestimmt werden. Kennt man wiederum die Lage, dann kennt man auch den Strukturfaktor \mathbf{F}_{H} der anomalen Streuer. Ausgehend von \mathbf{F}_{H} , den bei verschiedenen Wellenlängen gemessenen Strukturfaktoramplituden und den berechneten Werten für $\Delta f'(\lambda)$ und $f''(\lambda)$ können die Strukturfaktoren \mathbf{F}_{PH} und \mathbf{F}_{P} (P für alleiniger Beitrag vom Protein) eindeutig bestimmt werden. In Abbildung 6 und Abbildung 7 sind die verschiedenen Vektoren sowie ihre Bestimmung mit Hilfe der Harker-Konstruktion in der Gausschen Zahlenebene dargestellt.

³ Es steht \mathbf{F}^+ für $|\mathbf{F}_{hkl}|$ und \mathbf{F}^- für $|\mathbf{F}_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}|$.

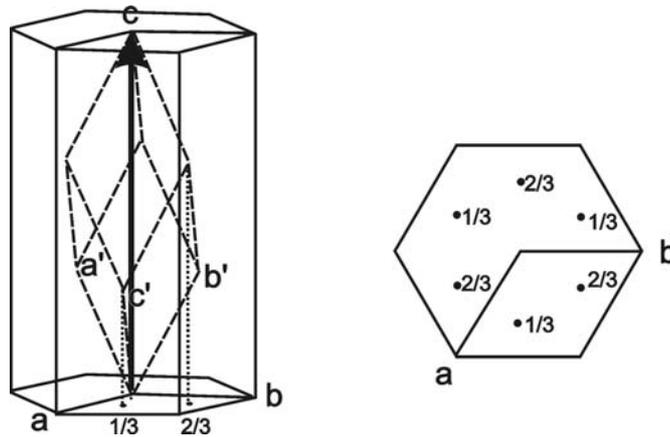


Abbildung 4: Rhomboedrische Elementarzelle in der obersen hexagonalen Aufstellung (links: Seitenansicht; rechts: Grundfläche in der aus a und b gebildeten Ebene).

3.1.2 Raumgruppen

Wie oben erwähnt, stehen für die Proteinkristallographie die Rotation, Translation und Schraubenrotation als Symmetrieeoperationen zur Verfügung: Die Rotation ist eine Drehung aller Punkte um eine Achse, dabei verändern die Punkte auf der Achse nicht ihre Position. Zur Beschreibung einer Rotation muß die Lage der Drehachse, der Drehwinkel und die Richtung der Drehung angegeben werden. Als Beispiel wurde bereits die 3-zählige Symmetrieachse im rhomboedrischen, hexagonal aufgespannten Kristallsystem genannt. „3-zählig“ bedeutet, daß eine Drehung um $2\pi/3$ erfolgt. Die Periodizität des Kristallgitters verlangt nach einer vollständigen Raumauffüllung, was nur durch 1-, 2-, 3-, 4- und 6-zählige Drehachsen gelingt. Die Translation ist eine Verschiebung aller Punkte eines Objektes um den gleichen Translationsvektor und wurde schon mit dem Translationsgitter eingeführt. Die Schraubenrotation ist schließlich eine Verknüpfung aus Translation und Rotation, bei der der Zwischenzustand nicht realisiert wird. Die Objekte werden zunächst um eine Achse gedreht und anschließend entlang des Translationsvektors verschoben. Eine solche Schraubenrotation kommt bei der Raumgruppe $P6_5$ zur Anwendung.

Bei der Nomenklatur der Raumgruppen beschränkt man sich heutzutage in der Proteinkristallographie auf die Hermann-Mauguin-Symbole, die die zur Ableitung der vollen Symmetrie notwendigen Elemente wie Dreh- und Schraubenachsen wiedergeben. Der Buchstabe gibt den Bravais-Gittertyp an, gefolgt von der Zähligkeit der Drehachsen, angefangen mit der Achse mit der höchsten Symmetrie. Bei den Raumgruppen $P6$ und $R3$ bedeutet dies, daß die primitive Zelle eine 6-zählige Drehachse bzw. die rhomboedrische Zelle die erwähnte 3-zählige Achse besitzt. Wird der Zähligkeit eine tiefgestellte Zahl hinzugefügt, so wird aus der Drehachse eine Schraubenachse, wobei die tiefgestellte Zahl die Drehrichtung angibt. Bei $P6_1$ liegt beispielsweise eine rechtsgängige und bei $P6_5$ eine linksgängige Schraubendrehung vor. Um bei $P6_5$ von einem Gitterpunkt zum nächsten zu

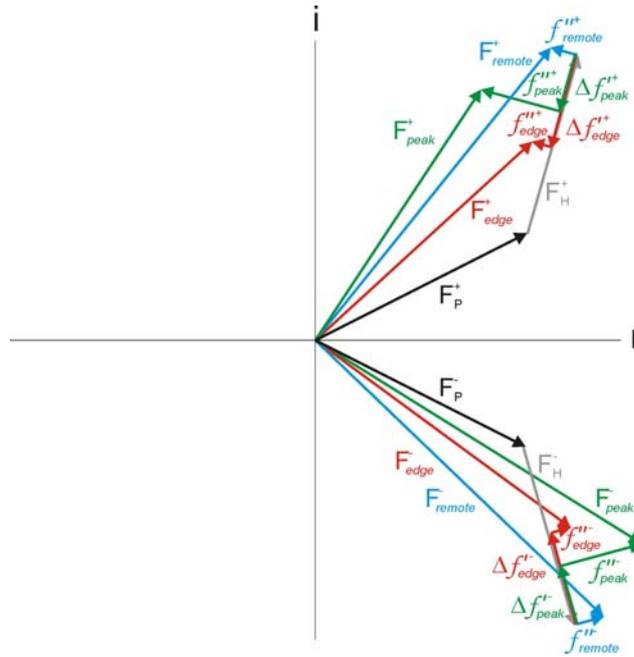


Abbildung 6: Phasendiagramm eines MAD-Experiments mit Darstellung der Strukturfaktoren in der Gaußschen Zahlenebene (reale (r) und imaginäre (i) Achse). Es sind die verschiedenen Strukturfaktoren sowie die dazu führenden dispersiven und anomalen Anteile der einzelnen Wellenlängen abgebildet (blau: λ_{remote} , grün: λ_{peak} , rot: λ_{edge}). Die Strukturfaktoren vom Protein (F_P) und von den Schweratomen (F_H) sind in schwarz bzw. grau gezeigt.

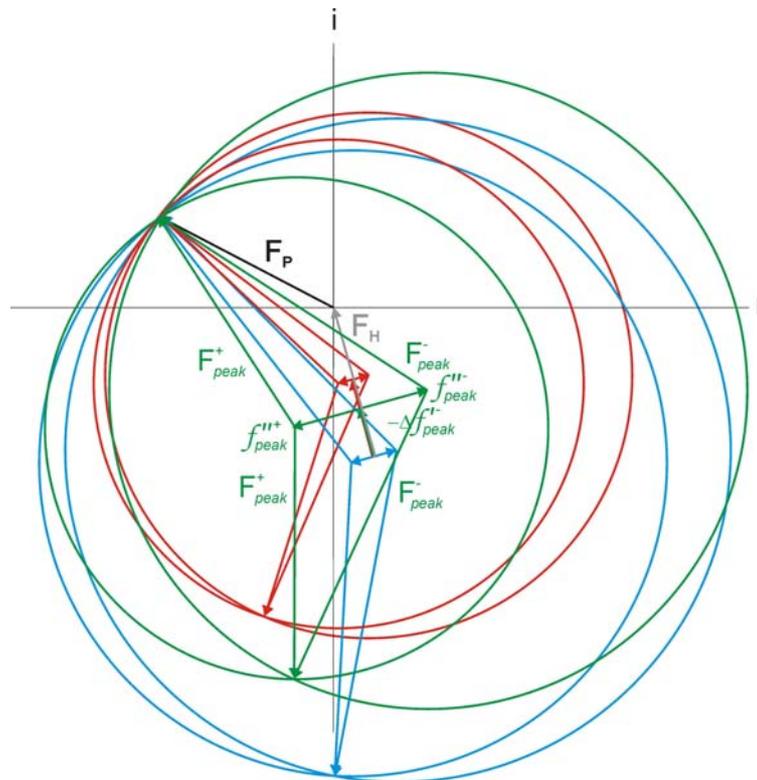


Abbildung 7: Harker-Konstruktion der Proteinphasen eines MAD-Experiments. Der Vektor F_H in der Gaußschen Zahlenebene ist der bekannte Strukturfaktor der anomalen Streuer und $-\Delta f'$ (λ_{peak}) und $f''(\lambda_{\text{peak}})$ sind seine anomalen Anteile bei der Wellenlänge λ_{peak} . Die Radien der Kreise entsprechen den in Abbildung 6 dargestellten Strukturfaktoramplituden, die bei den drei verschiedenen Wellenlängen gemessen wurden (blau: λ_{remotes} , grün: λ_{peaks} , rot: λ_{edge}). Die Mittelpunkte liegen am Ende der Summe der Vektoren $f'(\lambda_{\text{peak}}) + if''(\lambda_{\text{peak}})$. Idealerweise entsteht nur ein Schnittpunkt aller Kreise, der das Ende des gesuchten Vektors F_{PH} markiert. Aus F_H und F_{PH} läßt sich dann der Strukturfaktor F_P der nativen Proteinstruktur berechnen.

3.3.2 Pattersonfunktion

In Analogie zur Umwandlung der Strukturfaktoren in die Elektronendichteverteilung durch die inverse Fouriertransformation werden bei der Pattersonfunktion $P(u, v, w)$ die gemessenen Intensitäten bzw. die Quadrate der Strukturfaktoramplituden in einen Patterson- bzw. Vektorraum überführt. Durch die fehlende Phaseninformation kennt man die Größe des Terms $i \sin\Phi_{hkl}$ nicht, so daß er weggelassen wird. Für die Pattersonfunktion ergibt sich:

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

Da für die resultierende Amplitude nur die relative Verschiebung der überlagerten Streuwellen von Bedeutung ist, erhält man aus der Pattersonfunktion die interatomaren Abstandsvektoren. Die Höhe der auftretenden Maxima, die die Endpunkte der Abstandsvektoren markieren, errechnet sich aus dem Produkt der Elektronenzahl der beteiligten Atome. Berechnet man mit den gemessenen Intensitäten eines Proteinkristalls die Pattersonfunktion, dann erhält man so viele Abstandsvektoren, daß eine Auswertung nicht mehr möglich ist. Untersucht man jedoch nur die dispersiven oder anomalen Differenzen, erhält man im Idealfall wenige Abstandsvektoren. Hierbei kommen interatomare Vektoren zwischen symmetrieverwandten Atomen auf den Harker-Ebenen zu liegen. Die Lage der Harker-Ebenen und der symmetrieverwandten Atome werden durch die Raumgruppe bestimmt. Da die auf einer solchen Harker-Ebene liegenden Maxima um eine Translationskomponente verschoben sind, können nur zwei der drei Werte der Koordinaten x, y, z aus ihnen berechnet werden. Die ungefähre Lage des ersten anomalen Streuers ergibt eine erste, stark fehlerbehaftete Elektronendichteverteilung. Innerhalb dieses Realraums kann nach weiteren Maxima, also weiteren anomalen Streuern gesucht werden. Nach einer Fouriertransformation wird die Phaseninformation dieser Lagen mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden kombiniert und mittels der inversen Fouriertransformation eine neue, verbesserte Elektronendichteverteilung errechnet. An Hand dieser Elektronendichteverteilung können zum einen die Lagen der bereits gefundenen anomalen Streuer genauer bestimmt werden und zum anderen eventuell weitere Lagen gefunden werden. Dieser Vorgang wird zyklisch wiederholt, bis keine Verbesserung der Elektronendichteverteilung zu beobachten ist und begonnen werden kann, das Strukturmodell zu bauen.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

Wenn nichts anderes vermerkt ist, wurden die Chemikalien von mindestens analytischem Reinheitsgrad der Firmen Fluka, Aldrich, Sigma, Merck und Biomol verwendet.

4.2 Proteinchemische Arbeiten

4.2.1 Klonierung und Proteinexpression

Die Klonierungsarbeiten wurden von Dr. Angus Cameron und Prof. Iris Lindberg, LSUHC New Orleans, durchgeführt und werden hier nur kurz zusammenfassend dargestellt (Cameron *et al.*, 2000):

Die murine Furin-cDNA, kodierend für den Bereich vom N-Terminus des Propeptides bis zum Beginn der Transmembrandomäne bei His711, wurde mittels *Polymerase Chain Reaction* vervielfältigt und das Produkt in pcDNA3.1(-)-Myc-His (Invitrogen) subkloniert. Dihydrofolatereduktase-negative DG44 *Chinese Hamster Ovary* Zellen (CHO) wurden mit Lipofectin (Life Technologies, Inc.) transfiziert und die Kolonien bei 37 °C und 5 % CO₂ auf Minimalmedium ohne Nukleoside, aber mit 10 % Rinderserum selektioniert. Das Medium der Kolonien wurde auf Furinaktivität getestet und entsprechende Klone ausgewählt. Eine Überexpression von Furin in den Zellen wurde durch eine Methotrexatsteigerung erreicht, bis die Zellen bei einer Konzentration von 50 µM Methotrexat zweimal pro Woche im Verhältnis 1:6 geteilt wurden. Das konditionierte Medium (Opti-MEM, Life Technologies, Inc.), entweder aus Rollflaschen oder aus einem Fermenter, wurde durch Zentrifugation von den Zellen abgetrennt und für die weitere Aufreinigung bei -80 °C eingefroren.

4.2.2 Proteinreinigung

Alle proteinchemischen Arbeiten wurden entweder im Kühlraum bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Ein Liter des eingefrorenen konditionierten Mediums wurde aufgetaut und mit 2 l Puffer I (20 mM HEPES, 5 mM CaCl₂, pH 7,4) verdünnt. Zur Aufreinigung der ersten Proteinchargen wurden 0.1 % des Detergenses Brij35, für die späteren Chargen jedoch 0,3-0,4 mM des Detergenses Dodecyl-β-D-Maltosid (Biomol GmbH) dem Puffer hinzugefügt. Zur Verringerung des Volumens wurde das verdünnte Medium mit 40 ml/min über eine Sartorius D100 Anionenaustauschmembran (Sartorius AG, Göttingen) gepumpt und anschließend die Membran mit Puffer I und dann mit Puffer I + 50 mM NaCl gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mit 200 ml Puffer I + 250 mM NaCl. Das Eluat wurde im Verhältnis 1:4 mit Puffer I verdünnt und mit einem Fluß von 1 ml/min auf

eine 1 ml-Mono Q HR5/5 Anionentauschersäule (Amersham Pharmacia Biotech) gegeben. Nach dem Waschen mit Puffer I wurde zum Eluieren des Furins ein linearer Gradient von 0-500 mM NaCl in Puffer I gefahren und die Elution von Proteinen mittels UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Die Fraktionen wurden gesammelt und bei ihnen sowohl die Proteinkonzentration als auch die Enzymaktivität bestimmt. Fraktionen, die Furin enthielten, wurden mit einem 10 %igem denaturierenden SDS-Gel analysiert und die reinen Fraktionen vereinigt.

Für Inhibitortests wurde das erhaltene Furin bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Ein Verlust an Aktivität durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen konnte nicht festgestellt werden. Für die Kristallisation bestimmtes Furin wurde unmittelbar nach der Reinigung mit einem vierfachen molaren Überschuß des in Methanol gelösten, kovalent bindenden Inhibitors Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chloromethylketon (Alexis Biochemicals und Bachem) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erfolgreicher Inaktivierung wurde das Protein auf 10 mg/ml konzentriert. Hierzu wurde eine Proteinkonzentrierung nach dem Prinzip der Ultrafiltration in Centricons (Millipore, Eschborn) mit einer Retentionsgröße von 30 kDa bei einer Gravitation von 6400 g verwendet. Zum Entfernen des NaCl wurde das Protein während der Proteinkonzentrierung mehrmals mit Puffer I verdünnt und wieder konzentriert. Die Lagerung des konzentrierten Furins erfolgte bei 4 °C.

Da sich bei den Kristallisationsversuchen die zugesetzten Detergenzien als mögliche Störfaktoren erwiesen, wurden sie vor den Kristallisationsansätzen über einen erneuten Reinigungsschritt entfernt. Das Protein wurde dazu über eine 1 ml-QSepharoseFF-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) gepumpt, mit Puffer I ohne Detergens gewaschen und mittels eines linearen Gradienten von NaCl in Puffer I ohne Detergens wieder eluiert. Es wurde ein Gradient von 0-400 mM NaCl gefahren. Das Elutionsmaximum lag bei ungefähr 150-250 mM NaCl. Die entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt, entsalzt und auf 10 mg Protein pro ml konzentriert.

4.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

4.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

200 µl der Fraktionen wurden mit 600 µl Wasser und 200 µl des Bradford-Reagenzes BIO-ASSAY (Biorad) gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Extinktion dieser Lösung bei 595 nm gemessen und anhand einer Eichgerade (Rinderserumalbumin-Lösung in Wasser) die Proteinkonzentration bestimmt. Um nach einer chromatographischen Trennung bei einer Vielzahl von Fraktionen die

Proteinkonzentration zu bestimmen, kam auch ein Spektrometer für 96-Loch-Platten (Labsystems) zur Anwendung.

4.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Absorptionsmessung

Bei der Einkonzentrierung der Fraktionen wurde zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen die auf Tyrosine, Tryptophane und Cysteine zurückzuführende Absorption von UV-Licht bei 280 nm mit einem UV/Vis-Spektrometer gemessen. Der Extinktionskoeffizient wurde mit ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>; (Gill und von Hippel, 1989)) gemäß der Proteinsequenz ermittelt und nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Proteinkonzentration errechnet:

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

E = Extinktion

c = Proteinkonzentration [M]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

$\epsilon_{280\text{nm}}$ = berechneter Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

4.2.4 Enzymaktivitätstest

Zum Testen der Aktivität des in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Furins wurde ein Fluorometer (Labsystems, Inc.) mit den dazugehörigen 96-Loch-Platten verwendet. Zunächst wurden 10 μl einer Fraktion mit 15 μl Puffer I in eine Vertiefung der Platte gegeben und zum Reaktionsstart 25 μl Puffer II (100 mM HEPES, pH 7,0, 2 mM CaCl_2 , 0,2 % Brij-35) mit 400 μM des fluorogenen Substrats pERTKR-amc (Bachem) hinzugefügt. Nach dem Aufwärmen der Platte auf 37 °C wurde die Probe mit Licht der Wellenlänge von 380 nm angeregt und über die Fluoreszenz bei der Wellenlänge von 460 nm die Umsetzung des Substrats verfolgt. Aus der Zunahme der Fluoreszenz konnte die relative Furinaktivität pro Fraktion bestimmt werden.

4.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Kontrolle der Reinheit des Furins wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) mit Teilen der Fraktionen durchgeführt, bei der die denaturierten Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld aufgetrennt wurden. Zur Herstellung eines 10 %igen SDS-Geles (9 ml Trenngel, 5 ml Sammelgel) wurden die unten aufgeführten Puffer verwendet. Die Trenngellösung wurde nach Zugabe von 4 μl TEMED und 100 μl (0.1 g/ml) Ammoniumpersulfat (APS) in die vorbereitete Gelgießapparatur gegossen und mit wenig Wasser überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Wasser abgegossen, die Sammelgellösung mit 5 μl TEMED und 50 μl (0.1 g/ml) APS versetzt und auf das Trenngel gegeben. Ein Teflon-Kamm für die Geltaschen wurde luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt, bevor dieses aushärtete.

Für die Gelelektrophorese wurden die Proteinproben mit reduzierendem Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und in die Geltaschen gefüllt. Als Größenstandard wurde ein Proteinmarker (Sigma) mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit einer konstanten Stromstärke von 30 mA in SDS-Laufpuffer. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Färbelösung blau gefärbt und anschließend überschüssiger Farbstoff mit Entfärbelösung aus dem Gel gewaschen.

Sammelgel 5 %:

830 µl Acrylamid-Mix 30 % (w/v)
3,4 ml H₂O
630 µl 1 M TRIS-HCl pH 6,8
50 µl 10 % (w/v) SDS

Trenngel 10 %:

3,3 ml Acrylamid-Mix 30 % (w/v)
4,0 ml H₂O
2,5 ml 1 M TRIS-HCl pH 8,8
100 µl 10 % (w/v) SDS

Auftragspuffer 2x:

100 mM TRIS/AcOH, pH 6.8
100 mM DTT
5 mM EDTA
20 % (v/v) Glycerin
0.04 % (w/v) Bromphenolblau

Färbelösung:

50 % Ethanol (v/v)
10 % Essigsäure
0.1 % Coomassie R250 (w/v)

Entfärber:

30 % Ethanol (v/v)
7 % Essigsäure (v/v)

4.2.6 Test von Inhibitoren

Die Wirkung von Inhibitoren auf die Furinaktivität wurde wie beim Enzymaktivitätstest mit dem fluorogenen Substrat pERTKR-amc (Bachem) in einem Fluorometer (Kontron) unter Verwendung von 1 ml-Quarzglasküvetten untersucht. Zunächst wurden die Inhibitoren, sofern sie nicht bereits in Lösung vorlagen, in DMSO in einer Konzentration von ca. 10 mM gelöst. In unterschiedlichen Volumina wurden Inhibitorlösung, Substratpuffer und humanes Furin gemischt und bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Kurz vor der Messung wurde das Substrat hinzugegeben, der Ansatz gemischt und im Fluorometer auf 37 °C erwärmt. Die Umsetzung des Substrats wurde über die Zunahme der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 460 nm nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 380 nm gemessen. Bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen [I] wurde die Steigung V_i im linearen Bereich der Kurven bestimmt und als relative Aktivität V_i/V_0 (mit V_0 als Anfangsgeschwindigkeit ohne Zugabe von Inhibitor) gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Der IC_{50} -Wert, also die Inhibitorkonzentration bei der die Aktivität des Enzyms um 50 % gehemmt war, konnte bei der relativen Aktivität von 0,5 aus dem Diagramm abgelesen werden.

4.3 Röntgenkristallographische Messungen

4.3.1 Erzeugung und Aufzeichnung von Röntgenstrahlen

Die Erzeugung von Röntgenstrahlen kann auf verschiedene Arten erfolgen. Für die röntgenkristallographischen Messungen innerhalb der Abteilung Strukturforschung am

Max-Planck-Institut für Biochemie sowie bei der Firma Proteros Biostructures GmbH standen mehrere Kupfer-Drehanodengeneratoren (Rigaku, Japan) zur Verfügung, doch die für die Strukturbestimmung entscheidenden Messungen, sowohl von Furin als auch von Kollagen IV-NC1, wurden an der Wiggler Beamline BW6 des Deutschen Elektronen Synchrotrons (DESY) in Hamburg durchgeführt.

4.3.1.1 Kupfer-Drehanodengeneratoren

Bei Kupfer-Drehanodengeneratoren treffen von einer Glühanode ausgehende und im elektrischen Feld beschleunigte Elektronen mit hoher kinetischer Energie auf das Anodenmaterial aus Kupfer. Durch das Abbremsen der Elektronen wird ein Teil der kinetischen Energie über einen weiten Wellenlängenbereich als Bremsstrahlung freigesetzt. Ein weiterer Teil der Energie verursacht das Herausschlagen von Elektronen aus dem Anodenmaterial. Die so entstandenen Fehlstellen der inneren Schalen werden unter Abgabe von Röntgenstrahlung der Wellenlängen $1,542 \text{ \AA}$ (K_{α} -Strahlung) und $1,392 \text{ \AA}$ (K_{β} -Strahlung) durch Elektronen äußerer Schalen wieder aufgefüllt. Bei röntgenkristallographischen Messungen mit einer Kupferanode nutzt man die K_{α} -Strahlung mit dem Übergang von der L- zur K-Schale. Die verwendeten Röntgengeneratoren RU200 (Rigaku, Japan) wurden mit 50 kV und 100 mA betrieben.

4.3.1.2 Beamline BW6

Die Beamline BW6 ist Bestandteil des Speicherrings DORIS III. In diesem Speicherring werden Positronen im Hochvakuum mit Hilfe von Resonatoren auf nahezu Lichtgeschwindigkeit beschleunigt und über Ablenkmagnete auf eine Kreisbahn gebracht. Bei der Ablenkung der Elektronen entstehen tangential zu dieser Kreisbahn extrem starke, gebündelte Röntgenblitze, die sogenannte Synchrotronstrahlung. Den gleichen Effekt nutzt man bei den sich innerhalb des Speicherrings befindenden Wiggler und Undulatoren, die durch hintereinanderliegende Magnete die Elektronen auf eine Schlangenbahn zwingen. Dies führt zu einer Erhöhung ihrer Winkelgeschwindigkeit und damit zu einer Abgabe kurzwelligeren Röntgenlichts als bei den Ablenkmagneten. Für die Beamline BW6 wird ein 4 m langer, 56-poliger Wiggler aus Permanentmagneten verwendet. Die Röntgenstrahlung gelangt über eine Öffnung mit Verschluss (*shutter*) in der Betonwandung des Speicherrings zur Optik der BW6, die essentiell aus zwei goldbeschichteten Spiegeln und einem Doppelkristallmonochromator besteht (Abbildung 8; (Blume *et al.*, 2001; Buth *et al.*, 1996)). Der erste Spiegel ist eben und lenkt die vom Wiggler kommenden Strahlen zum Monochromator. Der zweite Spiegel, ein sogenannter Toroidalspiegel, liegt hinter dem Monochromator und fokussiert den Strahl auf den Kollimator. Der Monochromator besteht aus

zwei symmetrisch zugeschnittenen Siliziumkristallen als Spiegel, die es erlauben, über eine Winkeländerung die Wellenlänge in einem Bereich von 0,6 bis ca. 3,2 Å mit einer Genauigkeit von $\Delta\lambda/\lambda \sim 4 \times 10^{-4}$ zu variieren. Wie im Kapitel 3.2 beschrieben wurde, lassen sich nach der Braggschen Gleichung bei einem gegebenen Winkel nur Reflexe mit dem Vielfachen einer bestimmten Wellenlänge beobachten. Die Oberschwingungen können bei den Standardmessungen bis zu einer Wellenlänge von 1,8 Å vernachlässigt werden. Bei Messungen an der Kalziumkante mit einer Wellenlänge von bis zu 3,15 Å mußten jedoch auch die Oberschwingungen berücksichtigt werden und es wurde ein planer Spiegel zwischen Monochromator und Kollimator platziert, der dazu führte, daß nur die erste Oberschwingung reflektiert wurde. Die Änderung des Strahlengangs aufgrund des zwischengeschalteten Spiegels mußte durch Kippen der gesamten nachfolgenden Optik um 0,5° kompensiert werden.

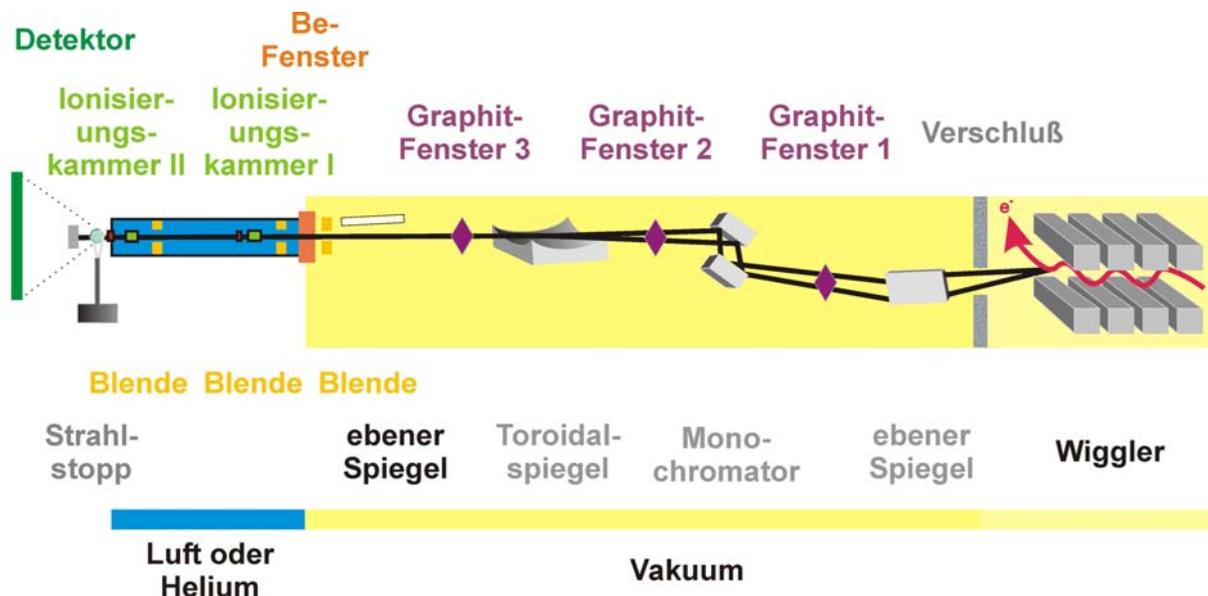


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der Wiggler Beamline BW6. Es ist der Strahlengang des Röntgenlichts vom Wiggler bis zum Detektor für Messungen bei Wellenlängen bis 1,8 Å dargestellt (weitere Erläuterungen siehe Text).

Der monochromatische Röntgenstrahl gelangt im weiteren Verlauf über ein Berylliumfenster vom Vakuum in den helium- oder luftgefüllten Kollimator, in dem sich mehrere Blenden und Intensitätsmeßgeräte für die Feinjustage befinden. Im Normalfall wird der Kollimator mit Luft betrieben, da unter Helium die Kontrolle der Optik mit Hilfe von Ionenkammern nicht möglich ist. Die Luft absorbiert jedoch bei langen Wellenlängen weitgehend die Röntgenstrahlen, so daß der Kollimator für solche Messungen mit Helium gefüllt werden muß.

Der aus dem Kollimator tretende Strahl trifft auf die Probe und es kommt zur Röntgenbeugung, wobei der größte Teil ungehindert den Kristall passiert. Zum Schutz des

Detektors befindet sich ein Strahlstopp zwischen Kristall und Detektor, so daß nur die Sekundärstrahlen, nicht aber der Primärstrahl detektiert werden. Bei Messungen mit kurzen Wellenlängen ($< 1,8 \text{ \AA}$) kann auch hier die Absorption der Röntgenstrahlung durch Luft vernachlässigt werden, doch für die Messungen bei langen Wellenlängen ($> 1,8 \text{ \AA}$) wurde ein mit einer für Röntgenstrahlen durchlässigen Folie bespannter Kunststoffring (Heliumbox) in den Bereich zwischen Strahlstopp und Detektor gebracht (Abbildung 9). Die Heliumbox wurde über zwei seitliche Anschlüsse mit Helium gefüllt.

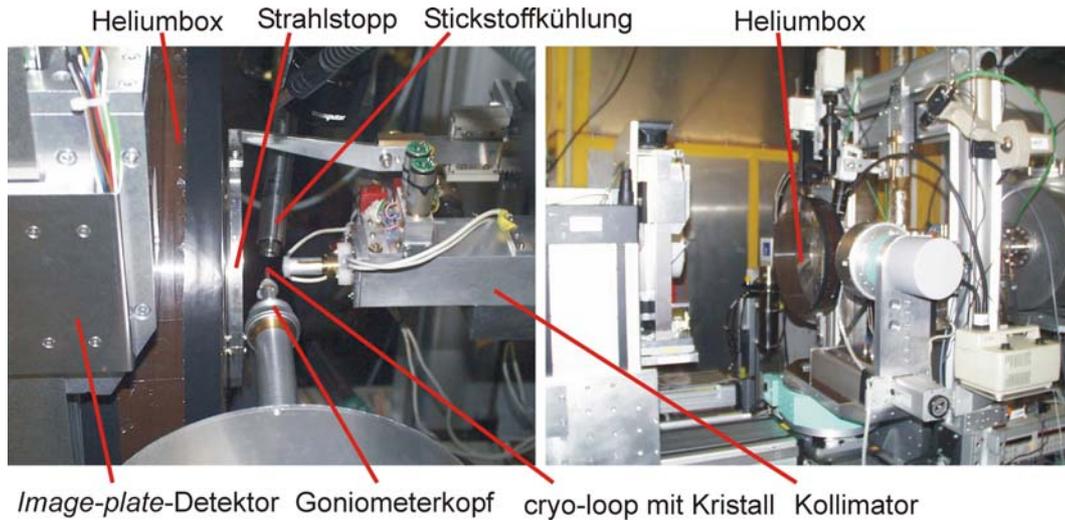


Abbildung 9: Meßanordnung für lange Wellenlängen. Für die Messungen bei langen Wellenlängen wurde zur Verringerung der Luftabsorption der Röntgenstrahlen eine heliumgefüllte Box zwischen Strahlstopp und Detektor gebracht (links). Der *image-plate*-Detektor (MAR research, Hamburg) wurde zum Auslesen von der Heliumbox entfernt, damit diese zum einen nicht mit dem Auslesegerät kollidierte und sich zum anderen das Helium während des Abregevorgangs nicht erwärmte.

Die Aufnahme der Diffraktionsdaten erfolgte nicht wie gewöhnlich mit einem 165 mm CCD-Detektor (MAR research, Hamburg), da dieser Röntgenlicht der gewünschten Wellenlänge von ca. 3 \AA nicht mehr detektieren kann, sondern es wurde ein 345 mm *image-plate*-Detektor (MAR research, Hamburg) verwendet. Um den Abstand zwischen Kristall und der röntgenlichtsensitiven Schicht zu verkleinern, wurde die Detektorabdeckung entfernt und der Detektor möglichst nahe an die Heliumbox gebracht. Vor dem Auslesen der Daten wurde der *image-plate*-Detektor einen halben Meter von der Heliumbox entfernt (Abbildung 10). Hierdurch wurde gewährleistet, daß der Ausleselaser, der die gesamte röntgenlichtsensitiven Schicht abtasten mußte, nicht mit der Heliumbox kollidierte. Ein weiterer Grund war die Wärmeentwicklung, die von der Lampe ausging, die zum Abregen der röntgenlichtsensitiven Schicht nötig war. So kam es bei zu geringem Abstand während des Abregevorgangs zu einer Aufwärmung des Heliums, was bedingt durch die Volumenänderung zu einer Berührung der Heliumbox mit dem Strahlstopp und zu kleinen

Vibrationen des Kristalls führte. Ferner kühlte das Helium anschließend ab und kleine Mengen Luft wurden angesaugt, was zur Absorption der Röntgenstrahlen führte.

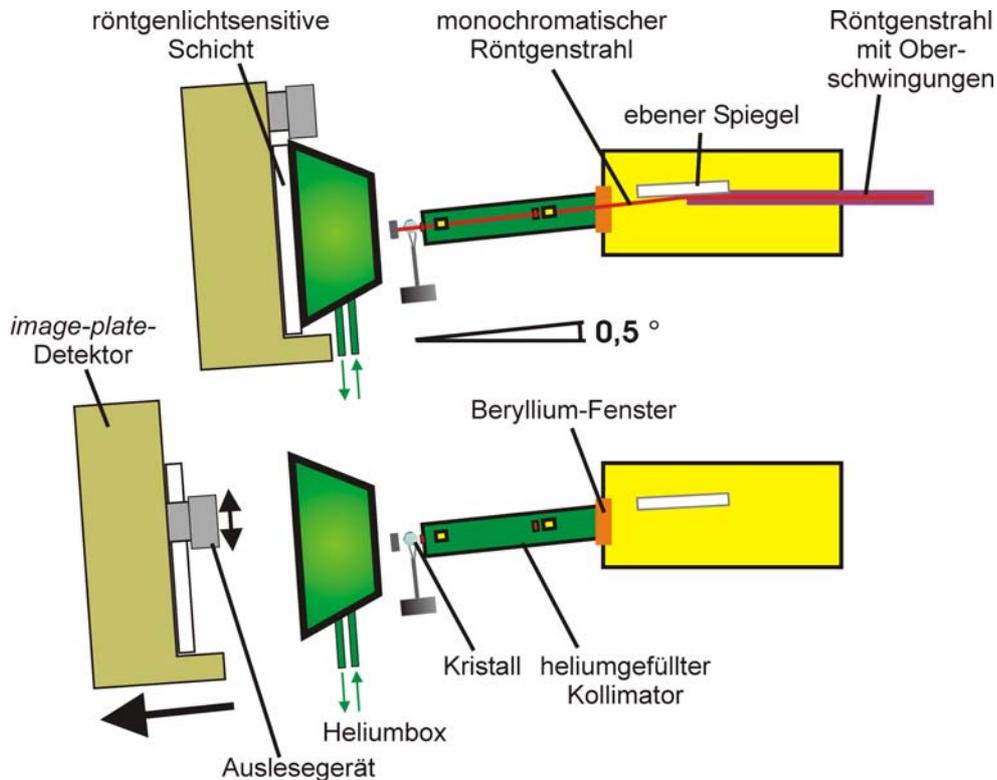


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der BW6 für Messungen bei langen Wellenlängen ($>1,8 \text{ \AA}$). Oben ist der Position des *image-plate*-Detektors während der Belichtung und unten während des Auslesevorgangs dargestellt. Der gelb gekennzeichnete Bereich enthält Vakuum und der grün gekennzeichnete Helium. Durch die zusätzliche Heliumbox zwischen Strahlstopp und der röntgenlichtsensitiven Schicht wird eine Absorption der Röntgenstrahlen durch Luft verhindert.

4.3.2 Kristallisation

Bei der Kristallisation von Proteinen geht man prinzipiell davon aus, daß man das in einem geeigneten Lösungsmittel gelöste Protein in die Nähe der Sättigungsgrenze bringt, dort sich Kristallkeime bilden und diese in einem Bereich leichter Übersättigung zu Kristallen heranwachsen. Eine geeignete Kristallisationsbedingung läßt sich nicht vorhersagen, so daß die Suche auf das Testen vieler verschiedener Lösungen basiert. Für die Kristallisation des Furins wurden dazu sowohl käufliche (HamptonResearch) als auch selbst hergestellte Lösungen verwendet, die in Salzkonzentration, Präzipitans, Puffer, pH-Wert und möglichen Detergenzien variierten. Als Kristallisationsmethode wurde die Dampfdiffusionsmethode bei 20°C mit sitzenden Tropfen (*sitting drop*) in CrysChem-Platten (Charles Supper Company) gewählt. Das Reservoir der CrysChem-Platten wurde mit $0,5 \text{ ml}$ und der Kristallisationsbereich mit $1,5 \mu\text{l}$ der jeweiligen Präzipitanslösung gefüllt. Die $1,5 \mu\text{l}$ Lösung wurden wiederum mit $1,5 \mu\text{l}$ des im Kristallisationspuffer (20 mM HEPES, 5 mM CaCl_2 , pH 7,4) vorliegenden und auf 10 mg/ml konzentrierten Furins gemischt. Bei einigen Versuchsansätzen wurden zusätzlich $0,3 \mu\text{l}$ eines Additivs zu

dem Tropfen hinzugefügt und vermischt. Die gesamte CrysChem-Platte wurde mit transparenter Klebefolie (CrystalClear, MancoInc., Avon, USA) verschlossen und bei Raumtemperatur eine mögliche Kristallisation über mehrere Monate hin mit einem Stereomikroskop verfolgt. Da das Protein-Lösungsmittelgemisch im Kristallisationsbereich eine niedrigere Salzkonzentration als die Reservoirolösung hatte, diffundierte Wasser von dort in die Reservoirolösung, so daß die Proteinkonzentration langsam anstieg und es unter geeigneten Bedingungen zur Kristallbildung kam.

4.3.3 Kryokristallographie und Kristalltransformation

Da Kristalle durch die hochenergetische Röntgenstrahlung des Synchrotrons Strahlenschäden erleiden, was eine Verschlechterung des Streubildes führt, wurden die verwendeten Kristalle auf 100 K abgekühlt. Um zu verhindern, daß beim Einfrieren das im Kristall vorhandene Wasser Eisstrukturen ausbildet und eine Zerstörung des geordneten Kristallgitters hervorruft, wurden die triklinen Kristalle des Furins in 12 % (v/v) 2,3-Butandiol enthaltene Mutterlauge gelegt. Mit einem sogenannten *cryo-loop*, bestehend aus einem Halter und einer kleinen Schlaufe aus synthetischer Faser, wurden die Kristalle aus der Mutterlauge geholt und direkt im Gasstrom eines Stickstoff-Kühlaggregates (Oxford Cryosystem) auf 100 K gekühlt. Die gefrorenen Kristalle konnten bis zu den Diffraktionsmessungen in flüssigem Stickstoff (77 K) gelagert werden.

Im Falle der hexagonalen Furinkristalle war bei Raumtemperatur die Mosaizität, also die Abweichung von einem idealgeordneten Kristall, sehr hoch. Aus diesem Grund wurden die Kristalle zunächst in Perfluoropolyether (PFPE; PFO-X125/03, Fa. Lancaster) überführt und von dort mit Hilfe eines *cryo-loops* im Kristallhalter des Free-Mounting-Systems (Fa. Proteros Biostructures; (Kiefersauer *et al.*, 2000)) plaziert (Abbildung 11). In diesem System umgab ein Luftstrom mit regelbarer Feuchte den Kristall, wodurch der Wassergehalt im Kristall gezielt verändert werden konnte. Die relative Feuchte des Luftstroms wurde auf 81 % eingestellt, der Kristall in den Röntgenstrahl eines Drehanodengenerators gebracht und die Güte des Kristalls über mehrere Diffraktionsbilder hinweg beobachtet. Bei Erreichen einer geringen Mosaizität wurden die Kristalle im Kühlstrom auf 100 K gekühlt und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

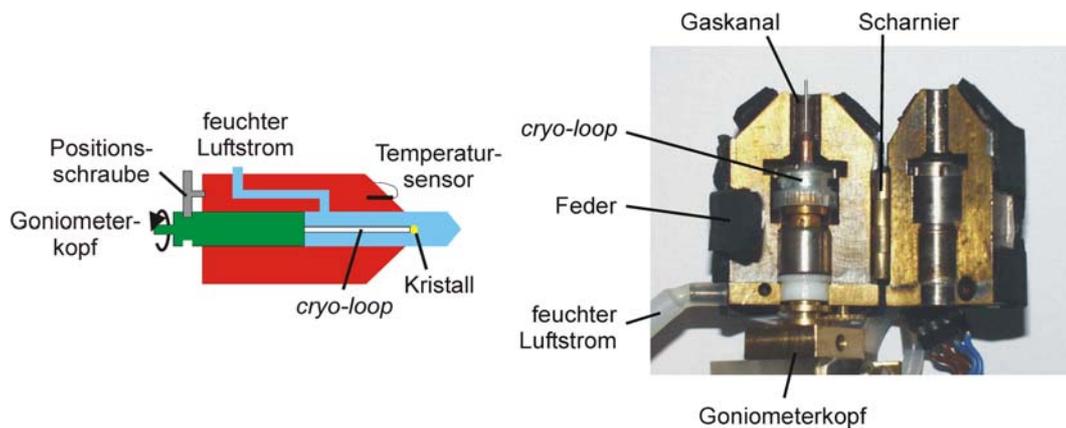


Abbildung 11: Kristallhalter des Free-Mounting-Systems. Links ist eine schematische Skizze und rechts ein Photo des geöffneten Kristallhalters dargestellt.

4.3.4 Datensammlung und Datenreduktion

Während der Röntgendiffraktionsmessungen am Synchrotron wurden die Kristalle auf 100 K gekühlt und um einen bestimmten Winkelbereich entlang einer horizontalen, senkrecht zum Strahl stehenden Achse gedreht. Bei den Messungen an den triklinen Furinkristallen war eine genaue Orientierung der Zellachsen bezüglich des Strahlenganges nicht nötig, da in jeder Orientierung die Reflexe bis zur maximalen Auflösung von einander getrennt werden konnten.

Die Datenaufnahme bei den Diffraktionsexperimente an den hexagonalen Furinkristallen gestaltete sich durch die lange c -Achse von über 470 Å schwieriger. In Kapitel 3.2.2 wurde gezeigt, daß die reziproken Einheitsvektoren umgekehrtproportional zu den Einheitsvektoren der Elementarzelle sind. Das bedeutete, daß bei den großen Zellkonstanten der Abstand der Netzebenen zueinander sowie der Winkelunterschied zwischen aufeinanderfolgenden Reflexionswinkeln θ_{hkl} sehr klein wird. Ist dieser Winkelunterschied bei einem gegebenen Kristall-Detektor-Abstand zu klein, so können die Reflexe auf dem Detektor nicht mehr von einander getrennt werden und es kommt zu einer Überlagerung. In diesem Fall muß der Abstand zwischen Kristall und Detektor soweit vergrößert werden, bis eine Auflösung der Reflexe wieder möglich ist. Bei einem Abstand von 285 mm konnten an den hexagonalen Kristallen mit einem CCD-Detektor Daten bis zu einer Auflösung von 3,9 Å aufgenommen werden. Da der Durchmesser des verwendeten CCD-Detektors auf 165 mm begrenzt war, wurde zum Sammeln der Reflexe hoher Auflösung der größere *image-plate*-Detektor (Durchmesser 345 mm) bei einem Abstand von 800 mm senkrecht zum Röntgenstrahl ausgelenkt (Abbildung 12). Über drei Datensätze an verschiedenen Detektorpositionen konnten Reflexe bis zur maximalen Auflösung von 2,7 Å aufgezeichnet werden. Diese Datensätze wurden mit dem vom CCD-Detektor vereinigt und gemeinsam ausgewertet.

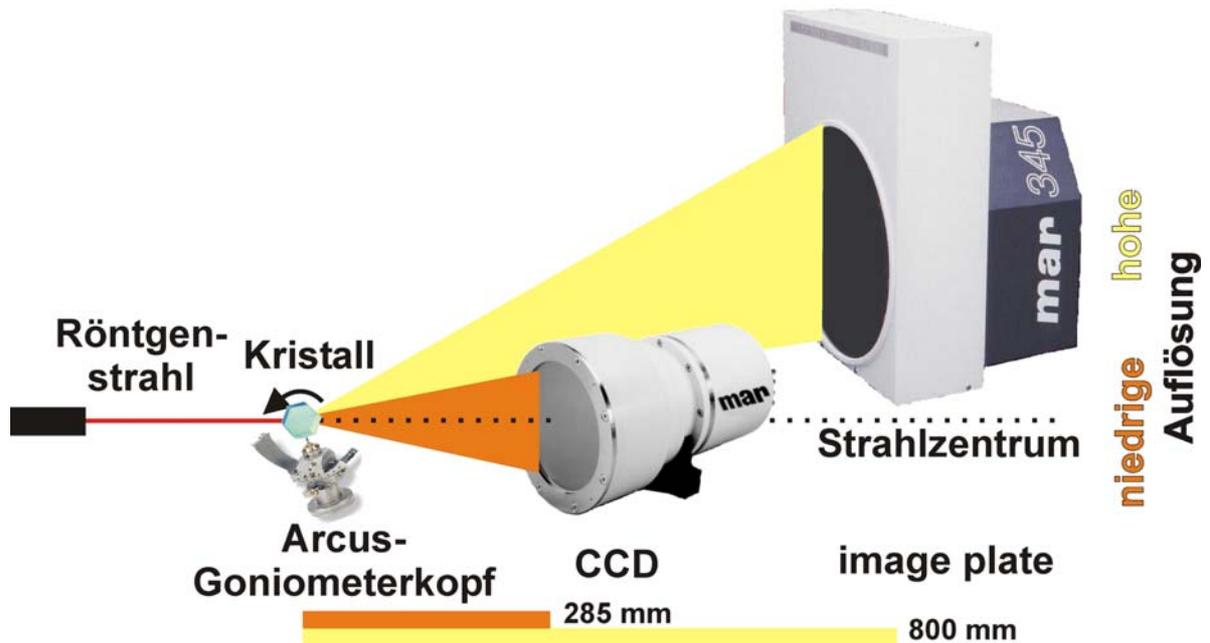


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Meßanordnung zur Aufnahme eines nativen Datensatzes. Bedingt durch eine Elementarzelle mit Zellachse von mehr als 470 Å wurde die lange Achse mit einem Arcus-Goniometerkopf parallel zur Drehachse ausgerichtet. Diffraktionsdaten bis zu einer Auflösung von 3,9 Å wurden mit einem CCD-Detektor (Durchmesser: 165 mm; MAR research, Hamburg) aufgenommen. Um Reflexe bis zur maximalen Auflösung von 2,7 Å trennen zu können, wurde auf den größeren *image-plate*-Detektor (Durchmesser: 345 mm; MAR research, Hamburg) gewechselt und dieser bei einem Kristall-Detektor-Abstand von 800 mm seitlich ausgelenkt. Hierdurch konnte erreicht werden, daß die effektive Detektorfläche vergrößerte.

Um mit einem Diffraktionsbild die Reflexe mehrerer Netzebenen aufzunehmen, wurde der Kristall um ein bestimmtes Winkelinkrement $\Delta\varphi$ entlang der Goniometerspindelachse gedreht. Die Größe dieses Winkelinkrements wurde zum einen durch Lage und Länge der Zellachsen sowie durch den Reflexionsbereich φ_R eines Reflexes begrenzt. Der Reflexionsbereich wird bestimmt durch die Mosaizität η , den horizontalen und vertikalen Röntgenstrahldivergenzwinkeln γ_{hor} und γ_{ver} als auch der spektralen Bandbreite $\Delta\lambda/\lambda$ des Strahls. Zusätzlich ist φ_R eine Funktion der reziproken Koordinaten ζ^2 eines gegebenen reziproken Gitterpunktes. Die Koordinaten können durch $\zeta^2 = [h^2 / (h^2 - v^2)] \sin^2(2\theta_{hkl})$ mit h und v für die horizontale und vertikale Entfernung eines gemessenen Reflexes vom Röntgenstrahl beschrieben werden. Es steigt ζ^2 mit θ_{hkl} und der Entfernung zur Rotationsachse an (Bellamy *et al.*, 2000; Bellamy *et al.*, 2004; Helliwell *et al.*, 1993). Außerdem haben die Netzebenen eine unterschiedliche winkelabhängige Verweilzeit im Strahl, so daß die Reflexe unterschiedlich lange detektiert werden, was durch den Lorentz-Faktor $L=1/\sin 2\theta$ korrigiert wird. Aus den obigen Parametern ergibt sich für den Reflexionsbereich:

$$|\varphi_R| = (L^2 \zeta^2 \gamma_{\text{hor}}^2 + \gamma_{\text{ver}}^2)^{1/2} + L 2\sin\theta_{hkl} \cos\theta_{hkl} [\eta + (\Delta\lambda/\lambda) \tan\theta_{hkl}]$$

Wenn $|\varphi_R + \Delta\varphi| \leq d_{\text{min}} / a$, mit a für die längste, nicht parallel zur Spindelachse stehenden Zellachse, nicht mehr erfüllt ist, dann führt dies zu einer Überlagerung von Reflexen, die

auch nicht über eine Vergrößerung der Kristall-Detektor-Distanz kompensiert werden kann. Aus diesem Grund wurden die hexagonalen Kristalle bei den Messungen mit einem Arcus-Goniometerkopf (BW6, DESY, Hamburg) so orientiert, daß die längste Achse möglichst parallel zur Goniometerspindelachse lag und nicht die Länge der c- sondern der a- bzw. b-Achse in die Gleichung eingesetzt werden mußte.

Die Bestimmungen der Kristallorientierungen, der Elementarzellen und der Raumgruppen, sowie die Integration und Skalierungen der Reflexintensitäten erfolgte mit den Programmen MOSFLM, Version 6.11 (Leslie, 1991) und SCALA (CCP4, 1994) bzw. DENZO und SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997).

4.3.5 Phasierung, Dichtemodifikation, Modellbau und Strukturverfeinerung

Die Phasen der Strukturfaktoren wurden mit Hilfe eines MAD-Experiments bestimmt. Hierzu wurden der Mutterlauge eines Kristalls für mehrere Stunden eine Ta₆Br₁₄-Lösung (Dodeca- μ -bromo-hexatantalumdibromid; (Knäblein *et al.*, 1997; Schneider und Lindqvist, 1994)) zugesetzt, so daß Ta₆Br₁₂²⁺-Ionen in das Kristallgitter eingebaut wurden. Vor der Überführung des Kristalls in PFPE wurden nichtgebundene Schweratomionen durch Spülen mit Reservoirlösung wieder entfernt. Der Kristall wurde anschließend bei einer relativen Feucht von 81 % im Free-Mounting-System transformiert und auf 100 K gekühlt (Kapitel 4.3.3). Zur Bestimmung der Absorptionskante des Tantals wurde am Synchrotron die Wellenlänge langsam verändert und die vom Kristall emittierte Fluoreszenz, die proportional zu f'' war, detektiert (Abbildung 13). Bei den Wellenlängen 1,2547 Å (*peak*), 1,2552 Å (*edge*) und 1,05 Å (*remote*) wurden mit einem CCD-Detektor drei Datensätze bis zu einer Auflösung von 3,95 Å aufgezeichnet (Tabelle 5). Die Messungen erfolgten jeweils über ein kontinuierliches Winkelsegment von 60°, gefolgt von weiteren 60° in inverser Strahlengeometrie zum direkten Messen der Friedelpaare. Die anschließende Integration und Skalierungen der Reflexintensitäten wurde mit SCALA (CCP4, 1994) bzw. DENZO und SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) durchgeführt.

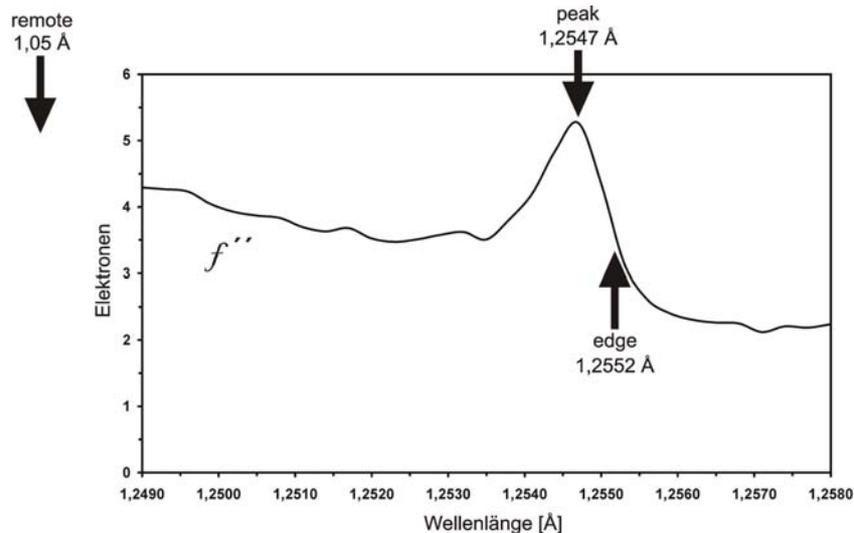


Abbildung 13: Fluoreszenzmessung zur Bestimmung der K-Absorptionskante von Tantal. Die durch Anregung mit Röntgenlicht gemessene Fluoreszenz des mit $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}^{2+}$ -behandelten Kristalls ist proportional zum anomalen Streuteil f'' des Tantals. Bei dem durchgeführten MAD-Experiment wurden Datensätze bei den Wellenlängen 1,2547 Å (*peak*), 1,2552 Å (*edge*) und 1,05 Å (*remote*) aufgenommen.

Mit dem Programm RSPS (CCP4, 1994) wurden dispersive und anomale Differenzpattersondichten berechnet und die Positionen eines $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}^{2+}$ -Klusters bestimmt. In MLPHARE (CCP4, 1994) wurden die Positionen verfeinert und mit FFT (CCP4, 1994) eine Elektronendichtekarte berechnet, in der nach weiteren Klustern gesucht wurde (PEAKMAX, (CCP4, 1994)), die wiederum verfeinert wurden. Mit neun Schweratomlagen wurde eine Elektronenkarte bis zu einer Auflösung von 4,5 Å berechnet und durch Mittelung über die Lösungsmittelbereiche (*solvent flattening*) in DM (CCP4, 1994) verbessert. Innerhalb der Elektronendichtekarte konnte die katalytische Domäne von Subtilisin (PDB-Code: 1CSE) manuell orientiert werden. Nach Bestimmung der nicht-kristallographischen Symmetrieeoperatoren (LSQKAB, (CCP4, 1994)) und Hinzunahme der Strukturfaktoramplituden des nativen Datensatzes wurde die Elektronendichtekarte mit DM (CCP4, 1994) über die acht Monomere der asymmetrischen Einheit gemittelt und die Phasen auf 2,7 Å expandiert.

Mit dem Bauprogramm MAIN (Turk, 1992) wurde ein erstes Modell erstellt und dieses in CNS 1.1 (Brünger *et al.*, 1998) verfeinert. Unter Verwendung der Phasen des Modells und der experimentell bestimmten Strukturfaktoramplituden wurde eine Neuberechnete Elektronendichtekarte in MAIN zyklisch gemittelt, das Modell verbessert und mit CNS wiederum verfeinert. Während der gesamten Verfeinerung wurden die geometrischen Standardwerte von Engh und Huber (Engh und Huber, 1991) und ein einheitlicher Testbereich an Strukturfaktoramplituden von 5 %, angeordnet in dünnen Auflösungsschalen, zur Berechnung des freien R-Faktors (Brünger, 1992) eingehalten. Die fehlenden

Topologie- und Parameterwerte für den kovalent gebundenen Inhibitor, wurden nach Konformationen bekannter Verbindungen erstellt.

Das Strukturmodell eines Furinmoleküls der hexagonalen Kristallform diene als Vorlage zur Phasierung der triklinen Kristallform mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1987) nach der Methode des molekularen Ersatzes. Nach der Orientierung von acht Molekülen pro asymmetrische Einheit, wurde das Strukturmodell der Elektronendichtekarte der triklinen Raumgruppe angepaßt und in CNS verfeinert.

4.3.6 Messungen an der K-Absorptionskante vom Kalzium

Um die Lage von Kalziumionen im Kristall zu bestimmen, wurden an den hexagonalen Kristallen zwei Datensätze mit den Wellenlängen 2,99 Å und 3,15 Å nahe der K-Absorptionskante vom Kalzium aufgenommen (Abbildung 14) und das anomale Signal untersucht. Bei der Wellenlänge 2,99 Å, das heißt energetisch oberhalb der K-Absorptionskante von Kalzium, erreicht der anomale Streuanteil f'' des Kalziums nahezu sein Maximum. Auch Kalium und Schwefel zeigen ein starkes anomales Signal. Mißt man hingegen bei der Wellenlänge 3,15 Å, also genau zwischen den K-Absorptionskanten von Kalium und Kalzium, steigt der anomale Streuanteil von Kalium und Schwefel weiter an, während der von Kalzium verschwindend gering wird. Bildet man nun die Differenz

$$\Delta\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \left(\left(F_{hkl, 2,99\text{\AA}}^+ - F_{hkl, 2,99\text{\AA}}^- \right) - \left(F_{hkl, 3,15\text{\AA}}^+ - F_{hkl, 3,15\text{\AA}}^- \right) \right) e^{-i2\pi(hx+ky+lz)+i(\Phi_{hkl}-\pi/2)}$$

aus beiden Datensätzen, erhält man den anomalen Streuanteil, der ausschließlich vom Kalzium ausgeht. Das heißt, daß nur dort ein Kalziumion mit hoher Besetzungszahl gebunden ist, wo eine deutliche Differenz zu erkennen ist. An den Stellen, an denen kein anomales Signal bei der Wellenlänge 3,15 Å vorliegt, kann weder Schwefel noch Kalium gebunden sein.

Da das Phasenproblem bereits gelöst war, wurden die Modellphasen in Verbindung mit den Strukturfaktoramplituden bei den Wellenlängen 2,99 Å und 3,15 Å für die Berechnung von Elektronendichtekarten verwendet.

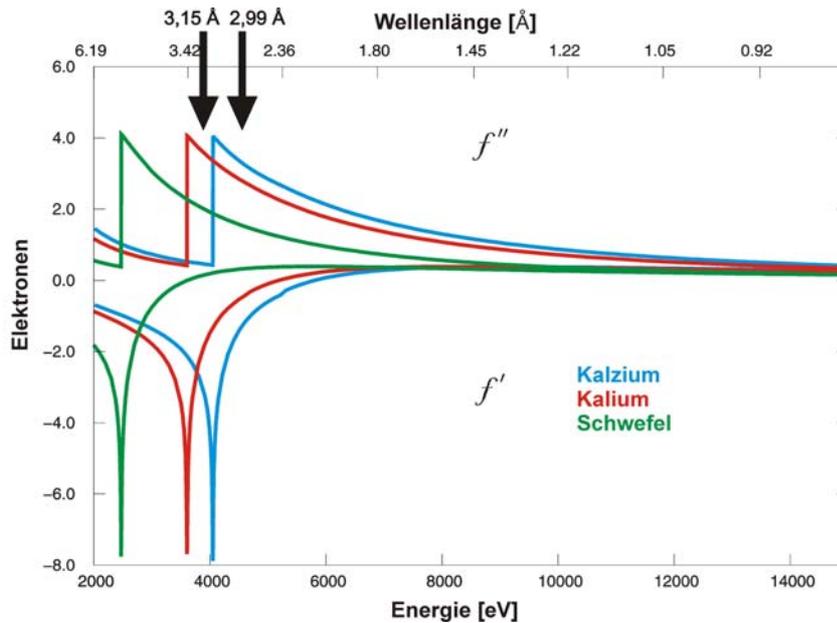


Abbildung 14: Diagramm der dispersiven und anomalen Beiträge im Bereich der K-Absorptionskanten der Elemente Kalzium (blau; 3,07 Å), Kalium (rot; 3,44 Å) und Schwefel (grün; 5,02 Å). Es sind die beiden Wellenlängen 2,99 Å und 3,15 Å angegeben, bei denen zur Analyse der Kalziumbindestellen Datensätze gemessen wurden. Die Kurven wurden über <http://www.bmsc.washington.edu/scatter/> erstellt.

4.4 Modellierung

Auf der Grundlage der zwei Kristallstrukturen von Furin und Kex2 sowie der Aminosäuresequenzen von PC1, PC2, PC4, PC5, PC7 und PACE4 (sp|P29120|NEC1_HUMAN, sp|P16519|NEC2_HUMAN, tr|Q62094|PCK4_MOUSE, sp|Q92824|PCK5_HUMAN, sp|Q16549|PCK7_HUMAN, sp|P29122|PAC4_HUMAN, (Gasteiger *et al.*, 2003)) wurden die katalytische und die P-Domänen der weiteren Mitglieder der Proproteinkonvertase-Familie modelliert. Es wurden die Das homologe Modellieren erfolgte mit dem Programmpaket Insight II (Insight_II, 2000) auf einer Silicon Graphics Octane Workstation.

4.4.1 Bau von homologen Modellen

Die Koordinaten der beiden Kristallstrukturen wurden in HOMOLEGY (Homology, 2000) eingelesen und eine interatomare $C\alpha$ -Abstandsmatrix zwischen beiden Molekülen berechnet. Gemäß ihrer mittleren quadratischen Abweichung wurden die Strukturen überlagert und ein entsprechendes Sequenzalignment erstellt. Nach einer automatischen Bestimmung strukturkonservierter Bereiche (*structurally conserved region*, SCR) auf Grundlage der Abstandsmatrix wurden diese Bereiche manuell überprüft und korrigiert. Durch die Festlegung der SCRs ergab sich ein erster Anhaltspunkt, welche Bereiche innerhalb der Proproteinkonvertasen konserviert und welche unterschiedlich sind.

Zu dem Sequenzvergleich wurde die Sequenz der katalytischen und der P-Domäne des jeweils zu bauenden Modells eingelesen, paarweise mit der Sequenz von Furin verglichen und nach ihr ausgerichtet (Needleman und Wunsch, 1970). Anschließend wurde dieser Sequenzvergleich manuell mit einem in ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) erstellten Sequenzvergleich zwischen allen Proproteinkonvertasen verglichen und stellenweise angepaßt. Für strukturkonservierte Bereiche, bei denen in der Modellsequenz keine Insertionen oder Deletionen vorlagen, wurden trotzdem SCRs als Teilbereiche definiert. Die zwischen den SCRs liegenden variablen Bereiche (*variable regions*, VRs) stellten die sogenannten Schleifen (*loop*) dar.

Nach dem Festlegen der konservierten Regionen und dem Ausrichten der Modellsequenz in diesen Bereichen wurden die ersten Teile des Modells gebaut. Hierzu wurde die Lage der konservierten Reste von Furin oder Kex2 als Vorlage verwendet und auf die entsprechenden Reste des Modells übertragen. Die zwischen Vorlage und Modell abweichenden Reste wurden als mutierte Reste (*mutated*) gekennzeichnet und die Seitenketten entsprechenden ausgetauscht. Die Hauptkette entsprach der der Vorlage, doch für die ausgetauschten Seitenketten ergänzte bzw. entfernte das Programm automatisch fehlende oder überzählige Atome, wobei die Lage der Seitenketten so weit wie möglich der Vorlage angepaßt wurde.

Für den Bau der variablen Bereiche gab es drei Möglichkeiten:

1. Hatten die Schleifen von Vorlage und Modell die gleiche Anzahl an Resten und stammten zudem die flankierenden SCRs von der gleichen Vorlage, dann konnten für diesen Bereich die Koordinaten der Vorlage übernommen werden. Diese Schleifen unterschieden sich daher zunächst nicht von den SCRs, wurden jedoch später bei der Energieminimierung anders behandelt.
2. Lag bei der Modellsequenz entweder eine Deletion oder Insertion bezüglich der Vorlagesequenzen vor, so konnten die Koordinaten nicht von den beiden vorgegebenen Strukturen übernommen werden. Es wurden stattdessen Start- und Endpunkt der zu bauenden Schleife festgelegt und der Abstand zwischen den C α -Atomen der flankierenden SCR-Reste mit einer vorberechneten Matrix, die an Hand der in der Brookhaven PDB bekannten Proteinstrukturen erstellt wurde, verglichen. In diese Matrix gingen Strukturen ein, bei denen bei gegebener Länge sowohl die entsprechende Anzahl flankierender wie auch der dazwischenliegenden Reste gleich des zu bauenden Zielpeptides waren. Aus den zehn vorgeschlagenen Peptidsequenzen für den Schleifenbereich wurde die ausgesucht, die sich am besten in

die Umgebung einfügte, die niedrigste mittlere quadratische Abweichung zwischen Modell und Datenbankprotein hatte und nicht zur Kollisionen mit Nachbarresten führte.

3. Bei der dritten Methode wurde nicht auf bekannte Strukturen zurückgegriffen, sondern es wurden neue Peptide mit gegebener Restezahl und Länge erzeugt. Diese Methode wurde nur für die variablen Bereiche an den Termini der Proteinmodelle verwendet.

Zwischen den verschiedenen variablen und konservierten Bereichen war die Hauptkette leicht gegeneinander verschoben und konnte nicht immer gemäß der zu berücksichtigenden Bindungswinkel und Bindungslängen fortgeführt werden. Um später bei der Energieminimierung die Übergänge glätten zu können, wurden die Reste am Übergang als Splice Stellen definiert (*splice*). Sie wurden bei der Energieminimierung ähnlich wie Schleifenbereiche behandelt.

Durch die bisher in diesem Kapitel beschriebenen Schritte entstand in HOMOLOGY ein Anfangsmodell, bei der jeder Aminosäure der Modellsequenz Koordinaten zugewiesen wurden. Der gebundene Inhibitor von Furin, die Kalziumionen oder Ladungen wurden zu dem Zeitpunkt noch nicht berücksichtigt. Um dieses Anfangsmodell in eine für Proteine sinnvolle Konformation zu bringen, folgten Minimierungsschritte, die zunächst in HOMOLOGY und anschließend in DISCOVER (Discover, 1994) durchgeführt wurden.

4.4.2 Energieminimierung der Modelle nach der Kraftfeldmethode

Bei der Kraftfeldmethode geht man davon aus, daß Moleküle aus Atomen aufgebaut sind, zwischen denen eine gewisse Atomanordnung besteht. Bei den gebundenen Atomen wird die Anordnung überwiegend durch die Bindungen und bei nicht gebundenen Atomen durch die van der Waals-Kräfte bestimmt. Man nimmt an, daß für die Winkel und Längen von Bindungen gewisse Standardwerte gelten und daß die Moleküle ihre Geometrie so einrichten, daß diese natürlichen Werte möglichst gut realisiert werden. In Systemen, die nicht alle Standardwerte erreichen können, wird die lokale Geometrie in einer voraussagbaren Art und Weise deformiert, wobei Spannungsenergie aufgebaut wird, die berechnet werden kann. Die Summe der Spannungsenergien soll dabei einen möglichst kleinen Wert besitzen und auf das Molekül in viele kleine Komponenten verteilt werden. Bei der Berechnung der Energien wird das Kraftfeld des Moleküls in eine Summe von Modellkräften zerlegt, die mit klassischer Mechanik beschrieben werden können (Kunz, 1991).

Die Energieminimierung der Modelle in HOMOLOGY und DISCOVER erfolgte nach dem CVFF-Kraftfeld (*consistent valence forcefield*; (Dauber-Osguthorpe *et al.*, 1988)), bei

dem sich die Spannungsenergie aus den Einzelsummen elf verschiedener Terme zusammensetzt. Zwei Terme beschrieben die nicht-gebundenen Wechselwirkungen (van der Waals-Interaktion mit Lennard-Jones-Funktion, elektrostatische Coulomb-Wechselwirkungen). Mit den vier Termen des Morse-Potentials und den fünf Cross-Termen wurde die Deformationsenergie aus Bindungslänge und den Bindungs-, Dieder- und Improperwinkeln bzw. die Koppelung interner Koordinaten berücksichtigt.

Nachdem mit Hilfe des Kraftfelds eine programminterne Gleichung aufgestellt wurde, die die Energie des Systems als eine Funktion der Koordinaten beschreibt, mußten in einer Zielfunktion externe Kraftterme definiert werden, welche die Minimierung beeinflussten. Diese Terme lieferten je nach definiertem Teilbereich der Modellstruktur (SCR, *loop*, *mutated*, *splice*) einen unterschiedlich starken Kraftbeitrag, um die verschobenen Atomkoordinaten wieder in ihre ursprüngliche Lage zu bringen. Hierdurch wurde erreicht, daß z. B. konservierte Bereiche weniger weit von ihrer Ausgangslage wegbewegt wurden, als variable Regionen.

Der nächste Schritt bei der molekularmechanischen Minimierung war, die Konformation so anzupassen, daß der Wert der Zielfunktion geringer wurde. Die Veränderung der Konformation erfolgte so lange, bis der Energiewert der Zielfunktion unterhalb eines vorgegebenen Schwellenwertes konvergierte oder weitere Abbruchkriterien erreicht wurden. Zum Auffinden eines geringeren Wertes wurde das Gradientenverfahren (*steepest descents method*) verwendet, bei der die Suchrichtung, also die Richtung in der die Konformation als nächstes verändert wurde, durch den steilsten Gradienten vorgegeben wurde. Diese Methode war zwar im Vergleich zu anderen Minimierungsmethoden wenig effizient, führte jedoch auch bei einem vom Energieminimum weit entfernten Startpunkt zu einem lokalen Minimum. Das Problem, daß bei den verschiedenen Minimierungsmethoden immer nur ein lokales, nicht aber ein globales Minimum gefunden werden konnte, ist derzeit noch nicht gelöst. Es war daher wichtig, die Konformation des zu minimierenden Ausgangsmodells nahe der vermuteten Zielkonformation zu bringen. So kam es beispielsweise aufgrund von mutierten Seitenketten in den SCRs, bei denen kleine gegen große Seitenketten ausgetauscht wurden, oder in den schlecht definierten variablen Schleifen immer wieder zu Kollisionen zwischen Seitenketten oder zwischen Haupt- und Seitenketten. Um dies zu verhindern, wurde das Modell vor dem ersten Minimierungszyklus durchgesehen und kollidierende Seitenketten gemäß einer Rotameren-Bibliothek so gedreht, daß die Stellung der Seitenketten die geringsten, aus den van der Waals-Abständen berechneten Energien hatten.

Da für die einzelnen Teilbereiche unterschiedliche Vorlagen verwendet wurden, kam es zwischen den Hauptketten zu unsteten Übergängen mit ungünstigen Konformationen. In der nun folgenden Minimierung wurden diese Übergänge angeglichen (*splice repair*), indem die meisten Atome festgehalten wurden. Nur die Atome im unmittelbaren Bereich der Peptidbindung zwischen beiden Teilbereichen durften ihre Lage ändern und dabei nach molekularmechanischen Kriterien eine sinnvolle Konformation einnehmen.

Trotz des manuellen Drehens verschiedener Seitenketten kam es in einigen Bereichen des Modells zu sterischen Überlappungen. Aus diesem Grund bestand der nächste Verfeinerungsschritt in einer Lockerung (*relaxation*) der Seitenketten von den variablen und den mutierten Bereichen. Die Hauptkette wurde weiterhin festgehalten, doch die Seitenketten konnten eine für sie energetisch günstige Konformation einnehmen und so kollidierenden Nachbaratomen ausweichen. Im letzten Schritt innerhalb von HOMOLGY wurden die Schleifen molekularmechanisch solange minimiert, bis die Ableitung (*derivative*) des Energieterms unter $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ lag. Um nicht zu weit von dem Startmodell abzuweichen, wurden die Atome während der Minimierung mit einer Kraft von $1000 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ auf die Ausgangsposition gezogen.

Da in HOMOLGY eine Verfeinerung der konservierten Bereiche so wie das Hinzufügen von Inhibitoren und Ionen nicht möglich ist, wurde zu dem Programm DISCOVER gewechselt. Es wurden die Koordinaten der Kalziumionen Ca1 und Ca2, wie auch die Reste der katalytischen Triade und von P1-P4 des Dekanoyl-RVKR-Inhibitors von der Furinstruktur übernommen, die Ladungen der Ionen angepaßt und die Wasserstoffe entsprechend einem pH-Wert von 7,0 eingebaut. Es wurde davon ausgegangen, daß diese Atome auch in den zu modellierenden Proproteinkonvertasen konserviert sind. Daher wurden sie während der nachfolgenden Minimierungsschritte fixiert, so daß sie ihre Lage nicht verändern konnten. Wie oben bereits erwähnt, wurde außerdem davon ausgegangen, daß Proteine in konservierten Sequenzbereichen nur wenig voneinander abweichen. Um dies während der molekularmechanischen Minimierung zu berücksichtigen, wurden die Teilbereiche mit folgenden Kraftkonstanten auf ihre Ausgangslage gezogen:

Teilbereich	Kraftkonstante [$\text{kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$]
SCR-konservierte Hauptkette	1800-3000
SCR-konservierte Seitenkette	1500-2500
SCR-mutierte Hauptkette	1500-2500
SCR-mutierte Seitenkette	800-1200
VR-Hauptkette	800-1200
VR-Seitenkette	500-1200
<i>Splice</i> -Stelle	800-1200

Zu Beginn der Verfeinerungsschritte waren die Modelle weit von einem energetischen Minimum entfernt. Um zu verhindern, daß der Energieterm aufgrund zu großer Schwankungen nicht gegen einen Schwellenwert konvergierte, wurden für die ersten Zyklen weder Ladungen noch Cross- und Morse-Terme berücksichtigt. Erst als die Ableitung des Energieterms unter $10 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ sank, wurden sie hinzugenommen und die Strukturen bis zu einem Wert von maximal $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ verfeinert.

4.5 Strukturanalyse und graphische Darstellung

Nach der Verfeinerung der kristallographischen und der modellierten Strukturen wurde die Qualität der Modelle mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) kontrolliert. Falls sich in den verschiedenen Statistiken und Grafiken (z. B. Ramachandran-Plot und Planarität von aromatischen Ringen) Abweichungen zu Standardwerten zeigten, wurden die entsprechenden Aminosäuren noch einmal überprüft. Eine Überprüfung der Modell-Elektronendichte-Korrelation der Kristallstruktur erfolgte mit dem Programm SFCHECK (CCP4, 1994).

Überlagerungen von mehreren Proteinen wurden mit dem Programm TOP3D (Lu, 2000) durchgeführt.

Zur Erstellung von Sequenzvergleichen wurden ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) und GCG (Genetics Computer Group, Madison, USA) und für deren graphische Darstellung ALSCRIPT (Barton, 1993) verwendet. So weit nichts anderes angegeben ist, wurden die Moleküldarstellungen mit dem Programm MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) erstellt und mit RASTER3D (Merritt und Bacon, 1997) in die endgültige Form gebracht. Zur graphischen Darstellung von Moleküloberflächen kamen die Programme BOBSCRIPT (Esnouf, 1999) und GRASP (Nicholls *et al.*, 1993) zur Anwendung. Die Nachbearbeitung und Beschriftung von Bildern erfolgte im Programm Corel Draw (Version 10, Coral Corporation).

5 Ergebnisse

5.1 Reinigung, Kristallisation und Kristalltransformation

5.1.1 Reinigung

Aus zwei Liter konditioniertem Zellkulturmedium von CHO-Zellen, die den löslichen Teil der Ektodomäne von Furin der Maus überexprimierten, konnten nach der Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie zwischen 1 und 3 mg aktives Furin isoliert werden. Die direkt am Elutionsmaximum gesammelten Fraktionen des zweiten Reinigungsschrittes zeigten in der SDS-Polyacrylgelelektrophorese eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 61 kDa (Abbildung 15), dessen Intensität mit der Furinaktivität korrelierte. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Furin vollständig durch Zugabe von Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chloromethylketon (Dec-RVKR-CMK; Alexis Biochemicals und Bachem, (Angliker *et al.*, 1993; Hallenberger *et al.*, 1992; Jean *et al.*, 1998; Stieneke-Gröber *et al.*, 1992)) inaktiviert. Der Inhibitor band kovalent an den Resten His194 und Ser367 der katalytischen Triade. Ein Überschuß an Inhibitor wurde bei der Proteinkonzentrierung mittels Ultrafiltration entfernt.

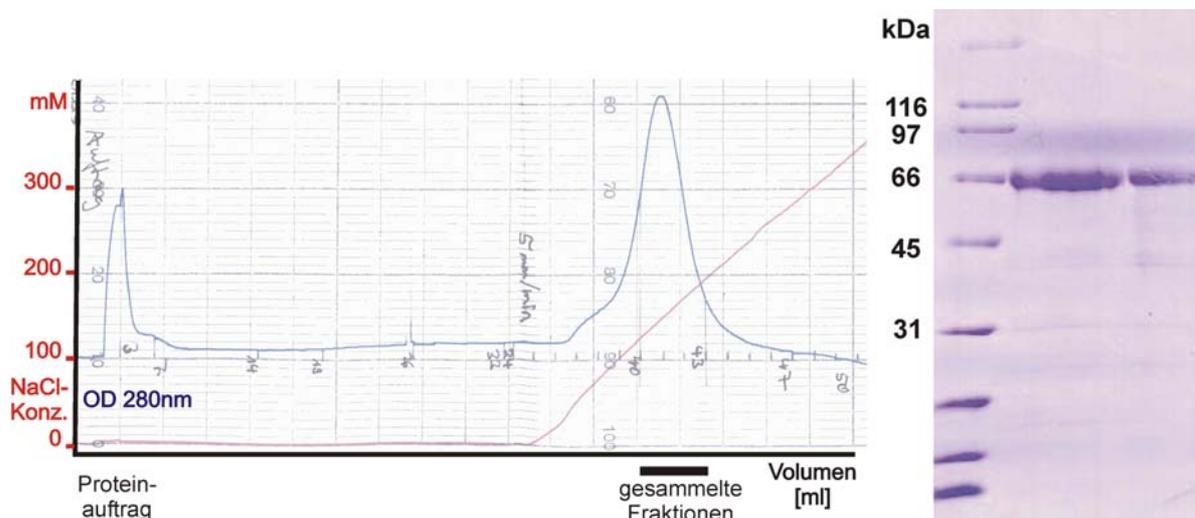


Abbildung 15: Reinigung von Furin. Links ist ein Chromatogramm der Furinreinigung über eine Anionenaustauschersäule dargestellt. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten. Es wurden für die Kristallisation nur die angegebenen Fraktionen verwendet und deren Reinheit auf einem 10 %igen denaturierenden SDS-Gel (rechts) überprüft.

5.1.2 Größenbestimmung des Proteins

Mit Hilfe der Größenausschlußchromatographie konnte gezeigt werden, daß das aktive, glykosilierte Furin der Maus als Monomer mit einem Molekulargewicht von 59 kDa vorlag (Cameron *et al.*, 2000) und damit ungefähr der in der SDS-Gelelektrophorese beobachteten Größe von 61 kDa entsprach. Gemäß dem klonierten Genkonstrukt sollten die CHO-Zellen allerdings die komplette Ektodomäne des Profurins (Aminosäurereste 1-711) herstellen, von

der autokatalytisch die Prodomäne abgespalten wurde. Berechnet man die theoretische Größe des aktiven Furins von Rest Asp108 bis His711 zuzüglich zwei N-glykosidisch verknüpfter Zucker von jeweils etwa 3,5 kDa (Cameron *et al.*, 2000), so ergibt dies ein Molekulargewicht von 72 kDa.

Aufgrund der Differenz zwischen der beobachteten und der theoretischen Größe wie auch der nur bis zum Rest Leu578 definierten Elektronendichtekarte (Tabelle 6), erfolgten massenspektrometrische Untersuchungen zur Größenbestimmung. Hierzu wurde das inaktivierte Furin der Maus verwendet, so daß für den kovalent gebundenen Inhibitor ca. 1 kDa zur theoretischen Gesamtgröße addiert werden mußten. Die von Frau Monica Zobawa (Abteilung Lottspeich) und Herrn Dr. Frank Siedler (Abteilung Oesterheld) durchgeführten Messungen mittels Matrix-unterstützter Laserdesorptions/Ionisations- bzw. Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie ergaben aufgrund einer Inhomogenität der Probe nur ein ungenaues Molekulargewicht in der Größenordnung von 59 kDa. Erst durch den von Herrn Reinhardt Mentele (Abteilung Lottspeich) durchgeführten Verdau des Furins mit 70 % Ameisensäure für zwei Tage bei Raumtemperatur, bei dem zwischen den Resten Asparagin und Prolin gespalten wurde, konnte in der anschließenden Sequenzierung der Fragmente mit Hilfe des Edman-Abbaus die Länge näher bestimmt werden. Es zeigte sich, daß das Protein mit Asp108 anfang, doch das Kettenende sehr wahrscheinlich im Bereich der Reste 580 bis 600 und nicht bei His711 lag. Eine genauere Eingrenzung war leider nicht möglich.

5.1.3 Kristallisation

Das Furin der Maus konnte mit Hilfe der Dampfdiffusionsmethode in einer triklinen und einer hexagonalen Kristallform kristallisiert werden. Für die Gewinnung der triklinen Form wurde das im Kristallisationspuffer (20 mM HEPES, 5 mM CaCl₂, pH 7,4) vorliegende, auf 10 mg/ml konzentrierte und mit Dec-RVKR-CMK inaktivierte Protein mit einem gleichen Volumen an Präzipitanzlösung (1,0 M (NH₄)₂SO₄, 0,4 M LiSO₄, 0,1 M Natriumcitrat, pH-Wert 6,0) gemischt und bei 20 °C gegen 500 µl ReservoirLösung äquilibriert. Innerhalb von zwei Wochen entstanden entweder kleine stäbchenförmige Einzelkristalle mit einer Größe von 20 µm x 20 µm x 70 µm oder 100 µm große, stark verwachsene Kristalle (Abbildung 16). Durch Überführen der Einzelkristalle in einen neuen Kristallansatz, bestehend aus der obigen Protein- und Präzipitanzlösung zuzüglich 0,08 mM Dodecyl-β-D-Maltosid, war es möglich innerhalb von drei Monaten, die Kristalle bis auf 50 µm x 50 µm x 100 µm zu vergrößern. Da diese Kristalle sehr schwer zu reproduzieren waren, konnte an ihnen nur ein nativer Datensatz aufgenommen, nicht aber die fehlenden Phasen bestimmt werden. Die

Raumgruppe war P1 mit den Zellkonstanten $a=93,3 \text{ \AA}$, $b=135,4 \text{ \AA}$, $c=137,8 \text{ \AA}$, $\alpha=103,6^\circ$, $\beta=99,0^\circ$, $\gamma=107,1^\circ$.

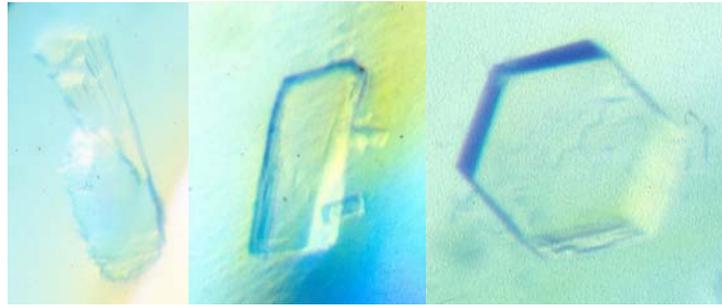


Abbildung 16: Kristallformen vom Furin der Maus. Es sind stark (links) und wenig (mitte) verwachsene Kristalle der Raumgruppe P1, sowie ein Kristall (rechts) der Raumgruppe P6₅ dargestellt. Beim hexagonalen Kristall liegen die Achsen a und b der Elementarzelle in der Blattebene, senkrecht dazu steht die sechszählige c -Achse.

Mischte man 1,5 μl Proteinlösung mit 1,5 μl der Präzipitanzlösung und fügte 0,3 μl 30 %iges 1,5-Pentandiol als Additiv hinzu, so entstanden nach zwei bis fünf Monaten sechseckige Kristalle (Abbildung 16) der hexagonalen Raumgruppe P6₅ mit den Zellkonstanten $a=b=135,5 \text{ \AA}$, $c=472,0 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$. Diese Kristalle hatten eine Größe von ca. 200 μm , zugleich jedoch auch eine sehr hohe Mosaizität.

5.1.4 Kryokristallographie

Durch die Bestrahlung von Kristallen mit hochenergetischem Röntgenlicht, wie sie bei Diffraktionsmessungen am Synchrotron verwendet wird, entstehen freie Radikale, was meist zu Veränderungen im Kristallgitter und einer Verschlechterung der Streubilder führt. Mißt man statt bei Raumtemperatur bei Temperaturen um 100 K, so kann man die Diffusion der Radikale im Kristall stark verlangsamen und ihre schädliche Wirkung minimieren (Garman und Murray, 2003). Das Problem beim Kühlen liegt in der Wahl eines geeigneten Gefrierschutzmittels, das die Ausbildung von kristallinen Eisstrukturen im Lösungsmittel verhindert. Kommt es zur Eisbildung, kann sich zum einen die Mosaizität erhöhen und zum anderen können sich starke Reflexe bei charakteristischen Auflösungs-schalen ausbilden, die eine Auswertung erschweren oder unmöglich machen.

Bei den triklinen Furinkristallen hatte sich die Mutterlauge mit 12 % 2,3-Butandiol als geeignetes Gefrierschutzmittel herausgestellt. Ein darin für wenige Sekunden eingelegerter Kristalle wurden mit einem *cryo-loop* herausgeholt und so auf dem Goniometerkopf plaziert, daß er sich sowohl im Röntgenstrahl wie auch im Fokus des Gasstroms eines Stickstoff-Kühlaggregates (Oxford Cryosystem) befand. Hierbei konnten die besten Ergebnisse erzielt werden, wenn zunächst der Kühlstrom abgedeckt, der *cryo-loop* in Position gebracht und dann der Kühlstrom wieder geöffnet wurde. Nach dem Schockkühlen lag die Mosaizität bei $0,6^\circ$.

5.1.5 Kristalltransformation

Die hexagonalen Kristalle hatten bei Raumtemperatur eine so hohe Mosaizität, daß bedingt durch die lange c-Achse eine räumliche Trennung der Reflexe im Röntgendiffraktionsexperiment, unabhängig vom Drehwinkelinkrement, nicht möglich gewesen wäre (vgl. Kapitel 4.3.4). Von Versuchen an anderen Kristallen war bekannt, daß eine Änderung der Umgebungsfeuchte mit Hilfe des Free-Mounting-Systems zu einer Transformation des Kristallgitters führte, bei der die Mosaizität verringert bzw. die Auflösung verbessert werden konnte (Kiefersauer *et al.*, 2000). Zur Durchführung einer solchen Kristalltransformation mußte zunächst die Startfeuchte der Mutterlauge bestimmt werden. Ein schon im Kristallhalter vormontierter *cryo-loop* wurde mit Mutterlauge benetzt und über ein Videosystem die Tropfengröße verfolgt, bis bei einer relativen Feuchte von 86 % keine Größenänderung mehr auftrat.

Für die Kristalltransformation wurden die hexagonalen Kristalle zusammen mit der Mutterlauge in eine Vertiefung eines Kunststoffbänkchens gegeben und mit Perfluoropolyether überschichtet. Durch ein Loch im Boden der Vertiefung, dessen Durchmesser kleiner als der Kristall war, wurde die untenliegende Mutterlauge abgesaugt, bis der Kristall ausschließlich von PFPE umgeben war (Abbildung 17). Mit einem *cryo-loop* wurde ein

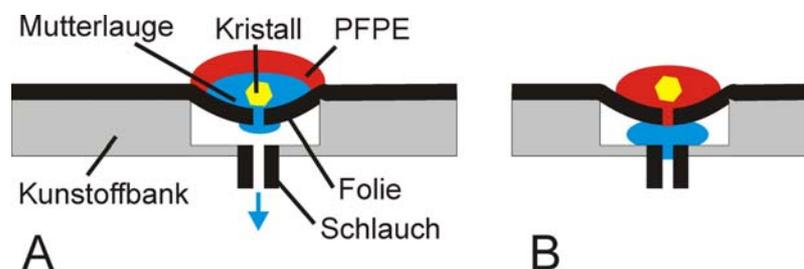


Abbildung 17: Überführen eines Kristalls in Öl. A. Der Kristall wurde in eine mit Mutterlauge (blau) gefüllte Vertiefung gelegt und mit PFPE (rot) überschichtet. Über eine Öffnung am Boden der Vertiefung wird die Mutterlauge entfernt. B. Der Kristall war vollständig vom PFPE umgeben und wurde mit einem *cryo-loop* entnommen.

Kristall aus dem PFPE genommen und im Kristallhalter positioniert, die relative Feuchte auf den Startwert von 86 % reguliert und zunächst die Größenänderung sowie anschließend die Diffraktionseigenschaften verfolgt. Aus mehreren Vorversuchen ergab sich eine optimale Feuchte von 81 %, woraufhin die Kristalle direkt bei diesem Wert montiert wurden. Bei konstanter relativer Feuchte wurden aufeinanderfolgend mit einer Belichtungszeit von zwei Minuten Diffraktionsbilder aufgenommen (Abbildung 18). Bedingt durch eine sehr lange Zellachse und einem fehlenden Drehwinkel während der Aufnahme war eine exakte Bestimmung der Zellkonstanten und Kristallorientierung nicht möglich, wodurch auch die Mosaizität nicht genau bestimmt werden konnte. An den in Abbildung 18 dargestellten

Diffractionsbildern erkennt man, daß innerhalb der ersten Minuten sich die Anzahl der Reflexe und die Mosaizität deutliche verringerte.

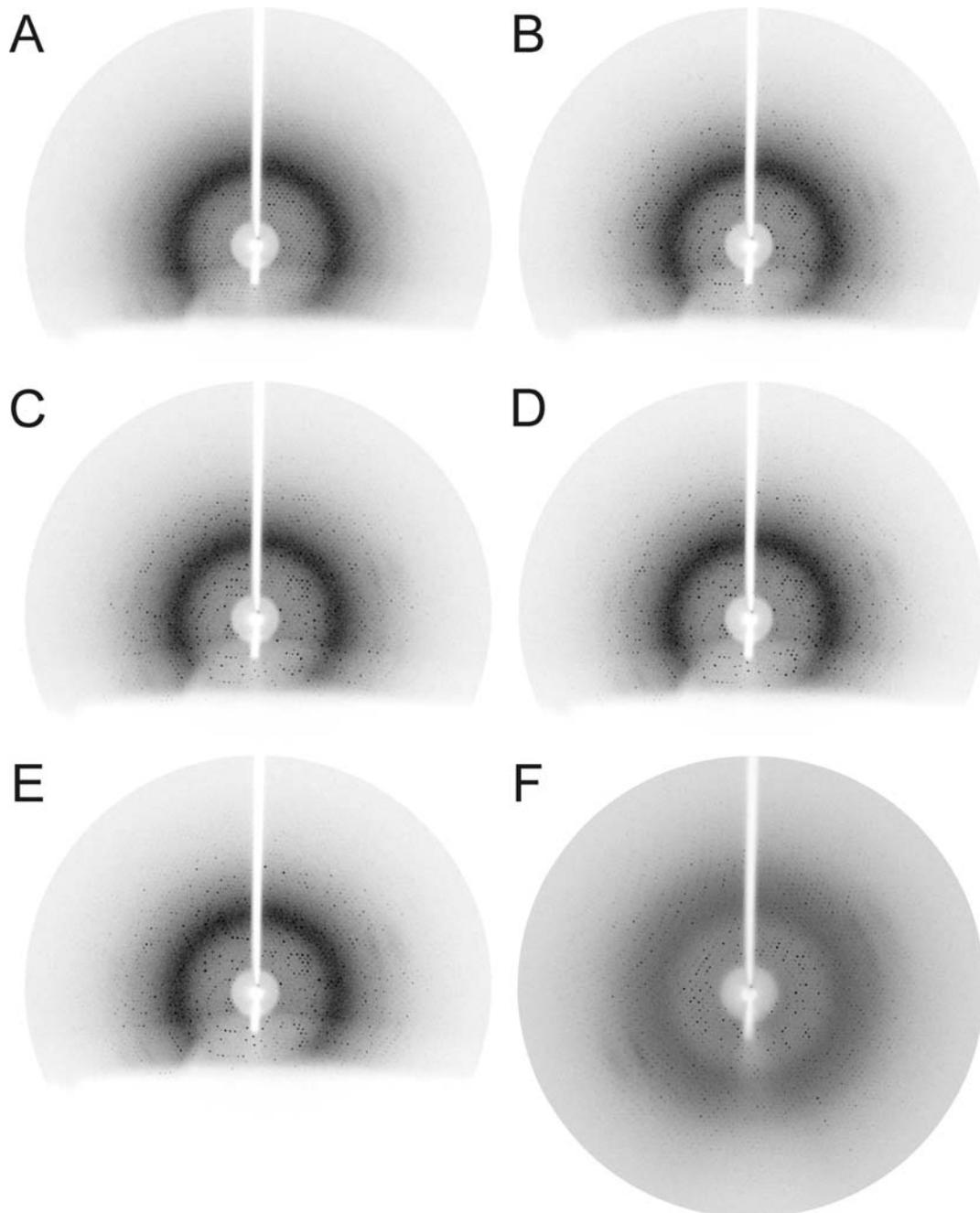


Abbildung 18: Kristalltransformation eines Kristalls. Die mit Ta_6Br_{14} -getränkten und in PFPE überführten hexagonalen Kristalle wurden im Kristallhalter des Free-Mounting-Systems montiert und die relative Feuchte auf 81 % eingestellt. Aufeinanderfolgend wurden Diffractionsbilder ohne Drehung des Kristalls mit einer Belichtungszeit von je 2 Minuten aufgenommen (Abb. A-E). Zwischen den einzelnen Bildern erkennt man sowohl eine Verringerung der Mosaizität als auch eine leichte Veränderung der Zellkonstanten. Nach Bild E wurde der Kristall auf 100 K gekühlt und Diffractionsbild mit neuer Kristallorientierung aufgenommen (Abb. F).

Nachdem keine weitere Verbesserung der Diffractionsbilder beobachtet werden konnte, wurde der Kristallhalter von der Röntgenmaschine genommen, geöffnet und der *cryo-loop* schnell in den Stickstoffstrom gebracht, so daß der Kristall auf 100 K gekühlt wurde. Zur

Kontrolle der Schockkühlung wurden weitere Diffraktionsbilder aufgenommen (Abbildung 18, F). Die Mosaizität der gekühlten Kristalle lag bei ungefähr $0,4^\circ$.

5.2 Strukturlösung

5.2.1 Datenaufnahme bei den triklinen Kristallen

Die ersten Diffraktionsmessungen zur Bestimmung der Furinstruktur erfolgten an den auf 100 K gekühlten triklinen Kristallen. Da nur sehr wenige große, gut streuende Kristalle zur Verfügung standen, wurde ein Kristall sowohl zur Messung eines nativen Datensatzes als auch zur strahlenschadeninduzierte Phasierung (RIP, *radiation damage-induced phasing*; (Ravelli *et al.*, 2003)) verwendet. Diese Phasierungsmethode funktioniert ähnlich der SIR-Methode (*single isomorphous replacement*; (Kendrew *et al.*, 1958; Perutz, 1956; Taylor, 2003)), basiert jedoch nicht auf den Vergleich zweier Kristalle mit und ohne Schweratom, sondern auf Unterschiede vor und nach der Zerstörung von Disulfidbrücken eines Kristalls. Hierzu wurde an der Beamline BW6 zunächst ein Datensatz (SS 1) mit geringer Strahlendosis aufgenommen, gefolgt von einem Datensatz mit langer Belichtungszeit (SS 2; Tabelle 4). Dieser Datensatz diente zum einen dazu, möglichst hochaufgelöste Diffraktionsdaten zu messen und zum anderen, dem Kristall einen Strahlenschaden zuzufügen, bei dem die Disulfidbrücken zerstört werden sollten. Ein weiterer, niedrigdosierter Datensatz (SS 3) wurde aufgezeichnet und die Differenz zum ersten Datensatz errechnet.

Tabelle 4: Statistik der Datenaufnahme der triklinen Kristalle

Triklone Kristalle	Nativ		
	SS 1	SS 2	SS 3
Raumgruppe	P1		
Zellkonstanten			
a (Å)	93,3		
b (Å)	135,4		
c (Å)	137,8		
α (°)	103,6		
β (°)	99,0		
γ (°)	107,1		
Wellenlänge (Å)	1,05		
Auflösung (Å)	33 – 3,0	18,83 – 2,60	33 – 3,0
Zahl der Diffraktionsbilder	160	190	160
Winkelinkrement (°)	1,2	1,0	1,2
Kristall-Detektor-Abstand (mm)	170	140	170
Dosis ^a	420	3500	420
Detektor	CCD	CCD	CCD
Zahl der Reflexe			
gemessen	252185	382695	246850
unabhängig	119404	182735	118671
Vollständigkeit (%)			
gesamt	98,3	97,7	96,7
letzte Auflösungsschale ^b	97,6	97,2	87,0
	(3,00 – 3,15)	(2,60 - 2,74)	(3,00 – 3,15)
R _{sym} ^b (%)			
gesamt	15,8	10,0	19,1
letzte Auflösungsschale ^c	37,4	34,7	26,4
	(3,00 – 3,15)	(2,60 - 2,74)	(3,00 – 3,15)

^a Digitale Einheitenangabe der Mar345-Meßsoftware eines kartesischen Bildes.

^b Die Angaben in Klammern geben die Auflösung der letzten Schale in Å an.

^c $R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i}| - \langle I \rangle_{hkl}}{\sum_{hkl} \sum_i \langle I \rangle_{hkl}}$, $\langle I \rangle_{hkl}$ ist die durchschnittliche Intensität der i Beobachtungen eines gegebenen Reflexes.

Auf Grundlage dieser Unterschiede in den Strukturfaktoramplituden (SS 1–SS 3) war es nicht möglich, die Position der Disulfidbrücken mit Hilfe der Differenzpattersonmethode zu bestimmen. Erst unter Verwendung der Phasen des fertigen Strukturmodells konnte eine Elektronendichtekarte berechnet werden, an denen strahleninduzierte Veränderungen zu erkennen waren. Die größten Differenzen in der Elektronendichtekarte entsprachen den Positionen der Disulfidgruppen (Abbildung 19).

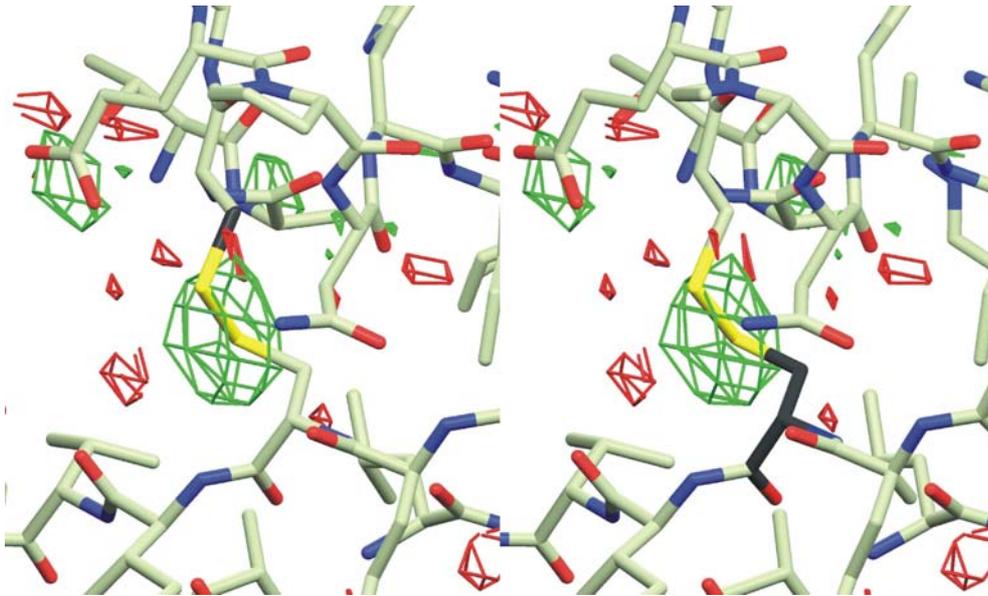


Abbildung 19: Strahleninduzierte Strukturveränderungen in den triklinen Kristallen. Beispiel für eine Disulfidbrücke (Cys450-Cys474) mit den umgebenden Resten und der Differenz aus den Elektronendichtekarten SS 1-SS 3 (grün: 3σ ; rot: -3σ).

5.2.2 Datenaufnahme bei den hexagonalen Kristallen

Die hexagonalen Furinkristalle hingegen besaßen mit über 470 Å eine sehr lange c-Achse, so daß für eine Auflösung der Reflexe eine Ausrichtung dieser Achse entlang der Goniometerspindelachse mit Hilfe eines Arcus-Goniometerkopfs (BW6, DESY, Hamburg) erforderlich war. Mit dem Ausrichten des Kristalls war es möglich bei einem Kristall-Detektor-Abstand von 285 mm mit einem CCD-Detektor, der einen Durchmesser von 165 mm hatte, Reflexe bis zu einer Auflösung von 3,9 Å zu messen (Abbildung 20, Tabelle 5). Die Aufnahme von Reflexen bis zur maximalen Auflösung des Kristalls von 2,7 Å erfolgte mit einem *image-plate*-Detektor mit einem Durchmesser von 345 mm. Dieser wurde auf einen Kristall-Detektor-Abstand von 800 mm gefahren und senkrecht zum Röntgenstrahl verschoben (Abbildung 20). An drei verschiedenen Detektorpositionen wurden Datensätze aufgenommen (Tabelle 5).

Mit diesem großen Kristall-Detektor-Abstand, der Verschiebung des Detektors senkrecht zum Röntgenstrahl, einer geringen Strahldivergenz der BW6, der Drehung um die lange Achse und der Reduzierung der Mosaizität durch die Kristalltransformation war es schließlich möglich, trotz der großen Elementarzelle einen nativen Datensatz bis zu einer Auflösung von 2,7 Å aufzunehmen und den Kristall dabei pro Diffraktionsbild um 1° zu drehen.

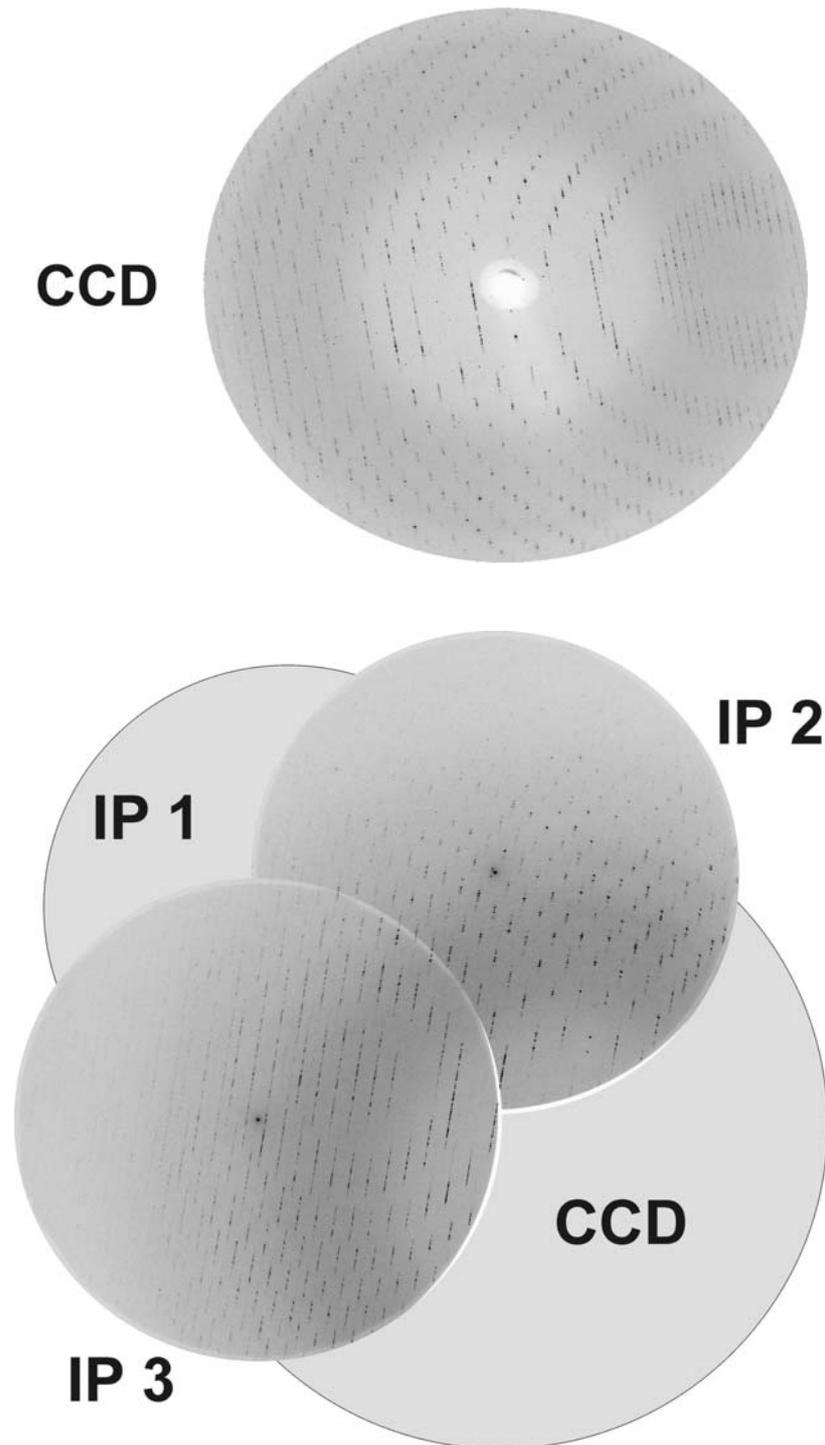


Abbildung 20: Diffractionsbilder von hexagonalen Kristallen. Die Reflexe bis zu einer Auflösung von $3,9 \text{ \AA}$ des nativen, hexagonalen Kristalls wurden mit einem CCD-Detektor (oben) und bis zu einer Auflösung von $2,7 \text{ \AA}$ mit dem *image-plate*-Detektor (unten) aufgenommen. Der Durchmesser und Kristall-Detektorabstand für den CCD-Detektor waren 165 mm bzw. 285 mm und für den *image-plate*-Detektor 345 mm bzw. 800 mm . Das Zentrum des *image-plate*-Detektors wurde bei den drei Datensätzen horizontal und vertikal bezüglich des Röntgenstrahls verschoben (IP1: $172 \text{ mm}/175 \text{ mm}$, IP2: $50 \text{ mm}/223 \text{ mm}$, IP3: $217 \text{ mm}/52 \text{ mm}$). In der unteren Abbildung ist auch der Bereich eingezeichnet, der bei einem Abstand von 800 mm durch den CCD-Detektor (CCD) abgedeckt wurde.

Tabelle 5: Datenstatistik

Hexagonale Kristalle	Nativ			Ta ₆ Br ₁₂ ²⁺ (CCD)		
	CCD	3 x image-plate	CCD + 3 x image- plate	edge	peak	remote
Raumgruppe	P6 ₃			P6 ₃		
Zellkonstanten						
a = b (Å)	135,5			135,8		
c (Å)	472,0			472,7		
α = β (°)	90			90		
γ (°)	120			120		
Wellenlänge (Å)	1,05			1,2552	1,25470	1,05
Auflösung (Å)	20 – 3,90	36 – 2,70	36 – 2,70	34 – 3,95	34 – 3,95	34 – 3,95
Zahl der Diffraktionsbilder	47	76 / 61 / 199		120	120	120
Winkelinkrement (°)	1	1 / 1 / 1		1	1	1
Kristall-Detektor- Abstand (mm)	285	800 / 800 / 800		240	240	240
Zahl der Reflexe gemessen	131856	742924	874780	328928	324973	334120
unabhängig	43594	133241	133288	85626 ^a	84871 ^a	86054 ^a
Vollständigkeit (%)						
gesamt	99,2			99,4	98,6	99,7
letzte Auflösungs- schale ^b	99,5			98,7	97,7	97,7
	(2,75 – 2,70)			(4,00 – 3,95)	(4,00 – 3,95)	(4,00 – 3,95)
R _{sym} ^c (%)						
gesamt	6,2	11,6	4,5 ^d	7,6	7,9	7,5
letzte Auflösungs- schale ^b	8,9	51,0	6,1 ^d	11,0	11,0	9,6
	(3,95 - 3,90)	(2,60 -2,69)	(3,95 - 3,90)	(4,00 – 3,95)	(4,00 – 3,95)	(4,00 – 3,95)

^a Für die MAD-Datensätze wurden die Friedelpaare als unabhängige Reflexe gezählt.

^b Die Angaben in Klammern geben die Auflösung der letzten Schale in Å an.

$${}^c R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{i,hkl} - \overline{I_{hkl}}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{i,hkl}}, \quad {}^d R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{j=1}^N \|F_{hkl} - |F_{hkl}(j)|\|}{\sum_{hkl} N \times |F_{hkl}|}$$

5.3 MAD-Phasierung und Dichtemodifikation

Die Gewinnung der fehlenden Phaseninformation erfolgte über ein MAD-Experiment, bei dem die dispersiven und anomalen Beiträge von den Kristallen zugefügten Ta₆Br₁₂²⁺-Klustern ausgenutzt wurden. Für die Bestimmung des dispersiven Beitrags $\Delta f'(\lambda_{\text{edge}})$ und des anomalen Beitrags $f''(\lambda_{\text{peak}})$ des Tantals wurde am Minimum von f' bei der Wellenlänge 1,2552 Å (*edge*) bzw. am Maximum von f'' bei 1,2547 Å (*peak*) gemessen. Als isomorphe Referenz, bei dem der Einfluß $\Delta f'$ des Tantals möglichst klein war, diente ein dritter Datensatz bei der Wellenlänge 1,05 Å (*remote*).

Die dispersive Differenzpattersondichte, berechnet aus den Intensitäten der *remote*- und *edge*-Datensätze, zeigte an sechs Stellen große Maxima, die in der Harker-Ebene $z=1/6$ (Abbildung 21) deutlich zu erkennen sind. Bedingt durch die hexagonale Raumgruppe

entsprachen diese sechs Maxima einer Position in der asymmetrischen Einheit. Ein entsprechendes Ergebnis wurde auch bei der Berechnung einer anomalen Differenzpattersondichte aus $|F_{peak}^+ - F_{peak}^-|$ erzielt.

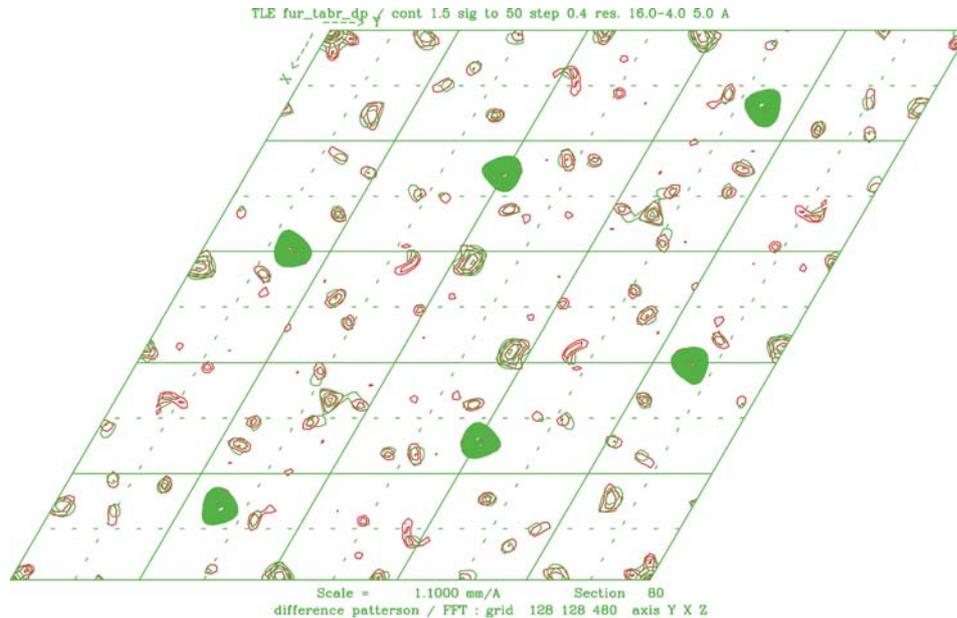


Abbildung 21: Harker-Ebene. Es ist die Harker-Ebene $z=1/6$ einer Differenzpattersondichte eines $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}^{2+}$ -Derivats dargestellt. Deutlich sind sechs Maxima zu erkennen. Bedingt durch die hexagonale Raumgruppe zeigen sie auf die gleiche Schweratomlage in der asymmetrischen Einheit.

Die stark fehlerbehafteten x- und y-Koordinaten (die z-Koordinate war bedingt durch die fehlende Translationskomponente zunächst unbestimmt und wurde durch die erste Lage festgelegt) der ersten potentiellen Schweratomlage wurden in MLPHARE (CCP4, 1994) nach der *lack of closure*-Methode (Blow und Crick, 1959) verfeinert. An Hand der ersten, verfeinerten Schweratomlage wurde eine Differenzelektronendichtekarte berechnet, in der nach weiteren Lagen gesucht wurde. Die neu gefundenen Lagen wurden nacheinander in mehreren Zyklen verfeinert und schließlich insgesamt neun $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}^{2+}$ -Kluster für die Phasierung verwendet. An dieser Stelle sei noch erwähnt, daß eine Patterson-Kreuzsuche in RSPS (CCP4, 1994), bei der die erste gefundene Schweratomlage zur Definition des Ursprungs der dispersiven Differenzpattersondichte vorgegeben wurde, zu den gleichen weiteren acht Lagen führte.

Bei einem $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}^{2+}$ -Kation handelt es sich um einen Oktaeder von Tantalionen, die von 12 Bromidionen umgeben werden und dem Protein 856 Elektronen zufügen (Knäblein *et al.*, 1997; Schneider und Lindqvist, 1994). Es stellt einen starken anomalen Streuer dar, der bei einer maximalen Auflösung von 4 Å als ganzes behandelt werden mußte und zunächst Phaseninformation bis zu 4,5 Å lieferte. Die *figure of merit* (FOM) lag insgesamt bei 0,55 und in der letzten Auflösungsstufe (4,5-5,0 Å) bei 0,28. Unter der Annahme eines

Lösungsmittelanteils im Kristall von 50 %, wurden die Lösungsmittelbereiche geglättet und eine verbesserte Elektronendichtekarte berechnet (FOM 0,63 in Auflösungsschale 4,63-4,50 Å). Diese Elektronendichtekarte war so gut, daß aufgrund der Händigkeit der zu erkennenden Helices zwischen den beiden möglichen, enantiomorphen Raumgruppen $P6_1$ und $P6_5$ eine Entscheidung zu Gunsten von $P6_5$ getroffen werden konnte.

Die katalytischen Domänen von Furin und Subtilisin sind strukturell ähnlich, so daß die bekannte Subtilisinstruktur (PDB-Code: 1CSE, (Bode *et al.*, 1987)) als Vorlage hergenommen werden konnte, um die Lage der katalytischen Domäne des Furins in der initialen Elektronendichtekarte zu positionieren. Hierbei stellte sich heraus, daß die asymmetrische Einheit acht und nicht wie zunächst angenommen vier Monomere enthält. Nach der Orientierung von acht Subtilisinmolekülen innerhalb der asymmetrischen Einheit, war es möglich, die nicht-kristallographischen Symmetrieeoperatoren zu bestimmen. Anschließend wurde die resultierende Elektronendichtekarte aus den Strukturfaktoramplituden des nativen Datensatzes und den Derivatphasen unter Verwendung der ermittelten nichtkristallographischen Symmetrieeoperatoren achtfach gemittelt (Abbildung 22). Durch diese Mittelung wurden die Phasen auf den gesamten Auflösungsbereich von 2,7 Å expandiert und FOM in den Auflösungsschalen 2,77-2,70 Å und 4,63-4,41 Å auf 0,47 bzw. 0,85 verbessert.

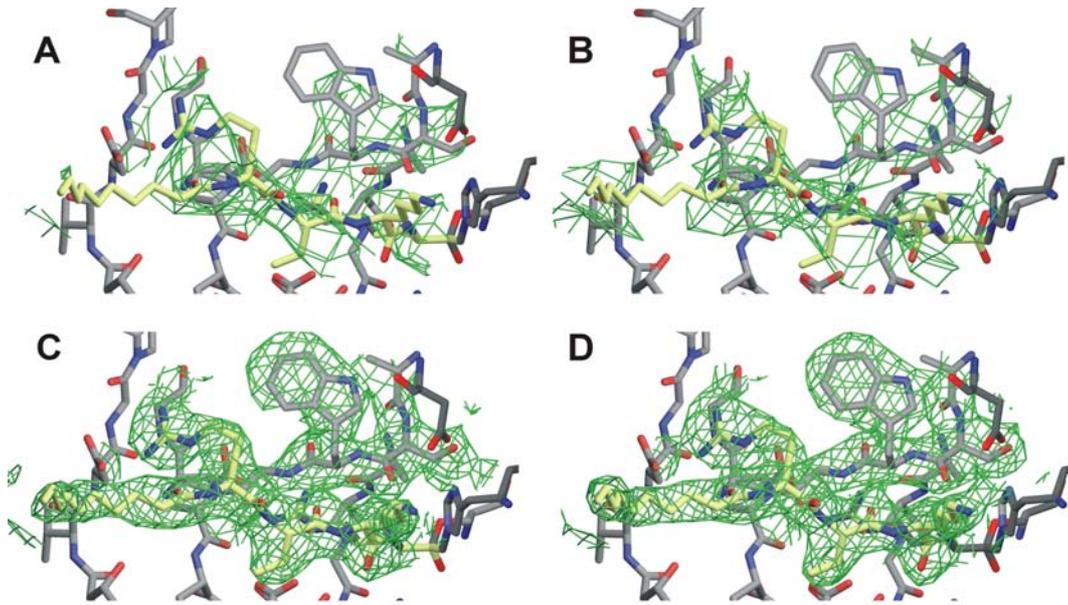


Abbildung 22: Dichtemodifikation der Elektronendichtekarte. Der Inhibitor und einige umgebende Reste der verfeinerten Struktur aus der hexagonalen Kristallform sind zusammen mit den Elektronendichtekarten verschiedener Schritte der Dichtemodifikation dargestellt (auf 1σ konturiert). Die erste Dichte (A) wurde aus den experimentellen $4,5\text{ \AA}$ -MAD-Strukturfaktoren berechnet und bei einem Lösungsmittelanteil von 50 % geglättet (B). In Kombination mit den $2,7\text{ \AA}$ -Strukturfaktoramplituden wurden die Dichte zyklischen über die achtfache nichtkristallographische Symmetrie gemittelt und so die Phasen expandiert (C). Die letzte Elektronendichtekarte ist eine $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Dichte, die durch Verwendung der Modellphasen des verfeinerten Modells entstand.

5.4 Modellbau und Verfeinerung

Die Dichte der hexagonalen Kristallform ermöglichte es, ein Furinmolekül von Rest 112 bis 574 durchgängig zu bauen und dieses auf die anderen sieben Positionen in der asymmetrischen Einheit zu kopieren. Eine erste Verfeinerung in CNS (Brünger *et al.*, 1998) unter Verwendung der Modellphasen und der nicht-kristallographischen Symmetrie (NCS) mit einer hohen Kraftkonstanten ($300\text{ kcal mol}^{-1}\text{ \AA}^{-2}$) auf alle Reste ergab bereits einen R-Faktor von 30 % und einen freien R-Faktor (R_{free}) von 32 %. Um eine durch die hohe NCS bedingte Aufnahme voneinander abhängigen Reflexen im Testbereich zu verhindern, wurden komplette Auflösungsbereiche (5 % der gesamten unabhängigen Reflexe) als Testbereich definiert. Die Reflexe dieser Auflösungsbereiche wurden nicht zur Strukturverfeinerung verwendet.

Eine achtfache, zyklische Mittelung der, die einzelnen Monomere umschließenden Dichtebereiche führte zu einer weiteren Verbesserung der Elektronendichtekarte (Abbildung 22). Hierzu wurde in MAIN (Turk, 1992) aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden und den Modellphasen eine Elektronendichteverteilung berechnet. In dieser wurden Bereiche festgelegt, die die Monomere vollständig umgaben, welche dann mit Hilfe der NCS-Operatoren gemittelt wurden. Für die nachfolgenden

Zyklen wurden die Phasen der jeweils vorherigen gemittelten Elektronendichteverteilung verwendet und erneut mit den experimentellen Strukturfaktoramplituden kombiniert. Das unvollständige Strukturmodell (ohne Kalzium- und Sulfationen) wurde anschließend in mehreren Schritten bis zu einem R-Faktor von 22 % (R_{free} 25 %) verfeinert.

Um die trikline Kristallform phasieren zu können, wurde eines dieser acht Monomere als Suchmodell für die Methode des molekularen Ersatzes verwendet. Mit AMoRe (Navaza, 1987) konnten in P1 acht Moleküle in der asymmetrischen Einheit gefunden und orientiert werden. Die Elektronendichtekarte der triklinen Kristallform war geringfügig besser als die der hexagonalen Form, so daß das Strukturmodell in der Raumgruppe P1 mit weiteren CNS-Verfeinerungszyklen verbessert (Tabelle 7) und schließlich in der Proteindatenbank (PDB-Code: 1P8J) hinterlegt wurde. In der ausgezeichneten Elektronendichtekarte waren für alle Monomere mindestens die Reste 110 bis 575 (Tabelle 6), sowie der Inhibitor gut definiert. Aufgrund der hohen nichtkristallographischen Symmetrie konnten bei der Verfeinerung 424 der 466 NCS-verwandten Reste (Reste 110 bis 575) mit einer relativ großen Kraftkonstante ($60 \text{ bis } 200 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$) aufeinander gezogen werden, was auch für den entsprechend der Auflösung von $2,6 \text{ \AA}$ niedrigen R-Faktor von 19,9 % (R_{free} 22,8 %) verantwortlich ist. Die Berechnung eines Ramachandran-Plots (Ramachandran und Sasisekharan, 1968) ergab, daß außer bei den Resten Asp158, Cys211 und Glu485 der Monomere A-H und dem Rest 109 von Monomer A alle Hauptkettenkonformationen mindestens innerhalb des erweiterten erlaubten Bereichs lagen. Bei allen Monomeren konnten drei potentielle Kalziumbindungsstellen und bei einigen N-glykosidisch verknüpfte Zuckerketten an den Resten Asn387 und Asn440 gefunden werden (Tabelle 6).

Raumgruppe	P6 ₅	P1	P1	P1
Monomer	Aminosäure- reste	Aminosäure- reste	Anzahl der Zuckerreste bei Asn387	Anzahl der Zuckerreste bei Asn440
A	110-575	109-578	1	11
B	110-575	109-576	1	-
C	110-576	109-575	-	-
D	109-575	109-575	-	-
E	110-575	109-576	1	-
F	110-574	109-575	1	1
G	110-574	109-575	-	4
H	110-574	110-575	1	-

Tabelle 6: In der Elektronendichtekarte der hexagonalen und der triklinen Kristallform definierte Sequenzbereiche der verschiedenen Monomere, sowie die Anzahl der Zuckerbausteine in der triklinen Raumgruppe.

Tabelle 7: Verfeinerungsstatistik der Furinstrukturen der hexagonalen und der triklinen Kristalle^a

Raumgruppe	P6 ₅	P1
Zellkonstanten a, b, c (Å) α, β, γ (°)	135,5, 135,5, 472,0 90, 90, 120	93,3, 135,4, 137,8 103,6, 99,0, 107,1
Auflösung (Å)	36 – 2,70	18,83 – 2,60
Anzahl der Reflexe Gesamt / Testbereich	125525 / 6691	182726 / 9564
Zellvolumen (Å ³)	7505000	1556000
Matthews-Koeffizient (M _r =60000 Da, 8 Moleküle/AU) ^b	2,6	3,2
Lösungsmittelanteil (%)	52,4	61,8
R-Faktor (%)	22,2 (32,7 ^c)	19,9 (24,0 ^c)
R _{free} -Raktor (%)	25,0	22,8
Anzahl der Atome		
Aminosäuren + Inhibitor	28715	28991
Zuckeratome	- ^a	268
Kalzium	- ^a	16
Lösungsmittel		
Wasser	1077	2305
Sulfat	- ^a	350
Nicht-Wasserstoffatome gesamt	29976	31642
Standardabweichung von der Standardbindungslänge(Å)	0,007	0,007
Durchschnittlicher B-Faktor (Å ²)	29,3	21,3 (27,4 ^d)
Standardabweichung der B-Faktoren zwischen gebundenen Atomen	1,338	1,402

^a Das Strukturmodell der hexagonalen Raumgruppe wurde nur teilweise verfeinert, so wurden z. B. keine Sulfat- und Kalziumionen eingebaut.

^b Molekulargewicht (M_r) pro Monomer; asymmetrische Einheit (AU)

^c Letzte Auflösungsstufe von P6₅ 2,70 - 2,72 und P1 2,60 - 2,62 Å.

^d Wilson-plot-B-Faktor

5.5 Kristallpackung

Die acht Moleküle der asymmetrischen Einheit beider Kristallformen sind zu je zwei nahezu identischen Tetrameren angeordnet. Vergleicht man die vier Tetramere miteinander, dann erkennt man in allen eine interne 222-Pseudo-Symmetrie und eine gleiche Orientierung der Monomere zu einander (Abbildung 23 und Abbildung 24). Auffällig ist, daß der Dekanoylteil des Inhibitors nicht der 222-Pseudo-Symmetrie folgt, sondern in zwei verschiedene Richtungen zeigt und damit nur eine zweizählige Symmetrie innerhalb des Tetramers besitzt. Überlagert man alle sechzehn Furinmoleküle, so erkennt man, daß sie bis auf einen Schleifenbereich (Leu124-Asn133 von Monomer F der Raumgruppe P1) sehr wenig voneinander abweichen (Abbildung 25). Diese geringe Abweichung ermöglichte die achtfache Mittelung der Elektronendichtekarte innerhalb einer asymmetrischen Einheit und die Verwendung der nicht-kristallographischen Symmetrie bei der Strukturverfeinerung.

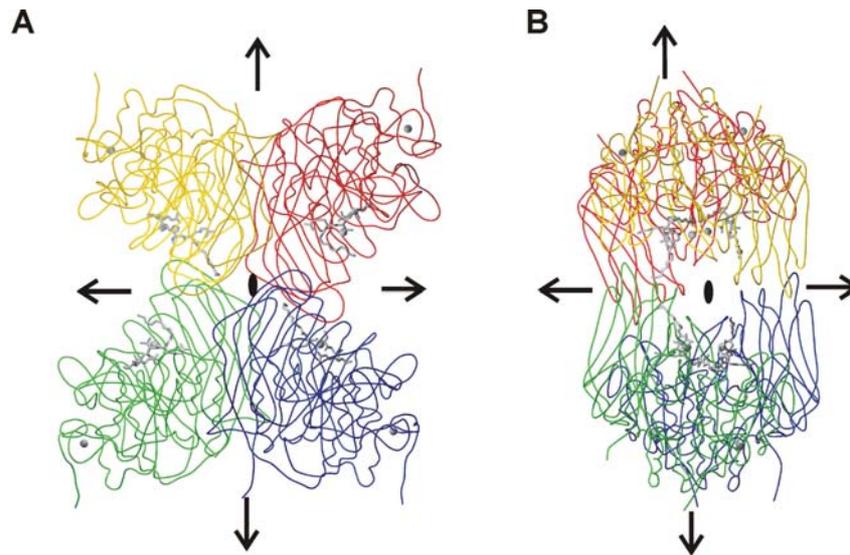


Abbildung 23: Kristallpackung eines Tetramers in P1. In den triklinen Kristallen lagerten sich jeweils vier der acht Monomere von Furin zu einem Tetramer zusammen. Die beiden entstehenden Tetramere besaßen eine 222-Pseudo-Symmetrie. Es sind die Hauptketten der Monomere in unterschiedlichen Farben zusammen mit dem gebundenen Inhibitor in grau und den ungefähren Lagen der Symmetrieachsen dargestellt. Zwischen den Abbildungen A und B wurde eine Drehung um 90° um die vertikale durchgeführt.

Betrachtet man die Zahl der Atom-Atom-Kontakte (manuell bestimmt) innerhalb eines Abstandes von bis zu 3,7 Å zwischen den Monomeren, dann stellt man fest, daß in der triklinen Raumgruppe 44 und in der hexagonalen Raumgruppe nur 30 Kontakte anzutreffen sind, was mit einer Erhöhung des Lösungsmittelanteils von 52,4 auf 61,8 % einhergeht (Tabelle 7 und Tabelle 8). Während in der triklinen Zelle die beiden Tetramere keine besonders ausgezeichnete Symmetriebeziehung zueinander haben, können bei den hexagonalen Kristallen die beiden Tetramere durch eine zweizählige Pseudo-Rotationsachse ineinander überführt werden. Interessanterweise entspricht das Symmetriezentrum genau der Lage des am stärksten phasierenden $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}^{2-}$ -Klusters. Diese besondere Lage führt offenbar zu der starken Phasierungskraft des einzelnen Schweratomklusters und dem deutlichen Hervortreten in der Patterson-Suche (Abbildung 21). Die anderen acht für die Phasierung verwendeten Schweratomlagen zeigen keine besonderen Positionen innerhalb der asymmetrischen Einheit oder eines Tetramers.

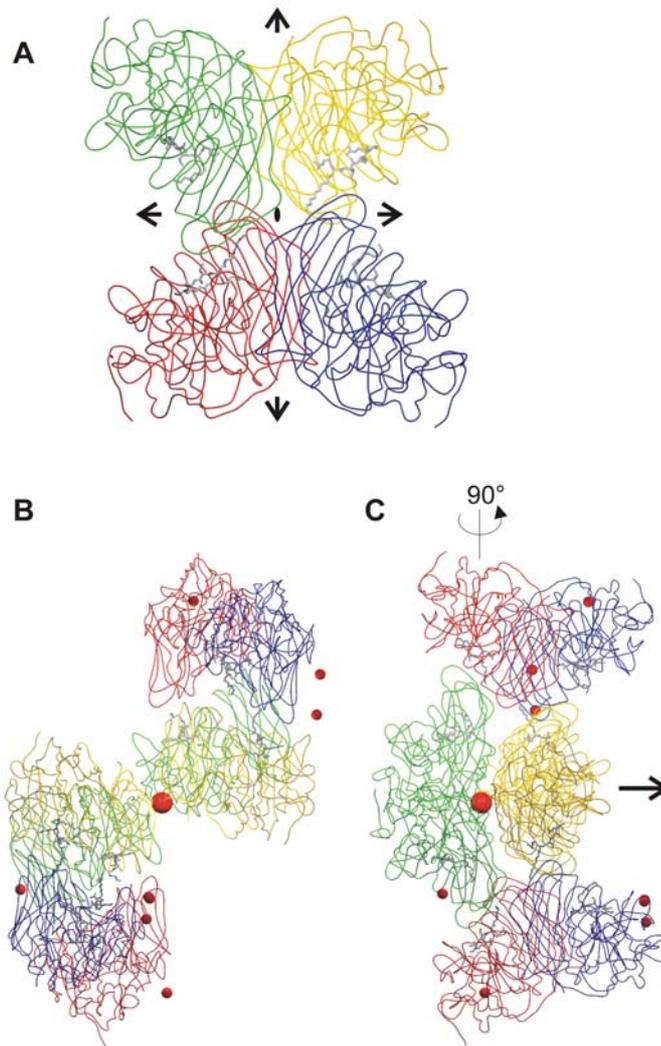


Abbildung 24: Monomeranordnung in P6₅. Wie bei den triklinen Kristallen lagern sich in den hexagonalen Kristallen jeweils vier der acht Monomere einer asymmetrischen Einheit zu einem Tetramer mit einer 222-Pseudo-Symmetrie zusammen. In Abb. A ist ein solches Tetramer mit den farblich unterschiedlichen Hauptketten der Monomere und den gebundenen Inhibitoren (grau) dargestellt. Zwei Tetramere bilden zudem ein Oktamer und können über eine zweizählige Pseudo-Symmetrieachse ineinander überführt werden (Abb. B und C). In der Mitte zwischen beiden Tetrameren fand sich bei den Ta₆Br₁₂²⁺-behandelten Kristallen eine hoch besetzte Ta₆Br₁₂²⁺-Lage (großer roter Ball), während die acht weiteren gebundenen Kluster (kleine Bälle) ungleichmäßig verteilt sind. Es sind die Monomere beider Tetramere, die über die zweizählige Pseudo-Symmetrie verbunden sind, in gleicher Farbe dargestellt.

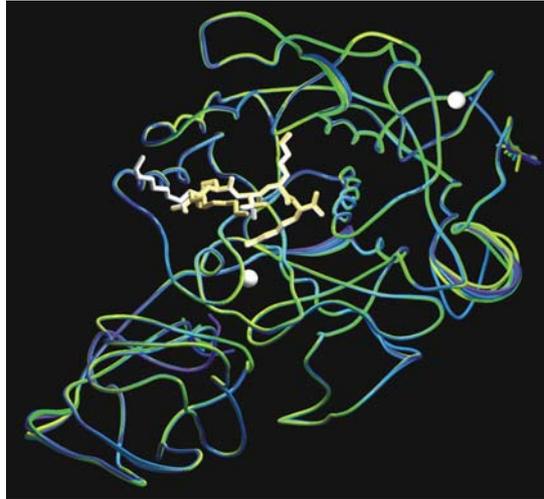


Abbildung 25.: In der Überlagerung sind alle 16 Monomere aus den triklinen (blau) und den hexagonalen Kristallen (grün) zusammen mit den zwei vorkommenden Konformationen vom Inhibitor (gold) dargestellt. Die Monomere zeigen eine hohe Übereinstimmung und weichen nur in wenigen Bereichen voneinander ab. Für den Inhibitor findet man zwei Konformationen, die sich nur im Dekanoylteil unterscheiden.

P1	A	B	C	D	E	F	G	H
A		2	1	1		1	1	
B	2		1	1	1			
C	1	1		2	1	1		
D	1	1	2		1	1		1
E		1	1	1		1	1	1
F	1		1	1	1		1	1
G	1				1	1		1
H				1	1	1	1	
$\Sigma=44$	6	5	6	7	6	6	4	4

P6 ₅	A	B	C	D	E	F	G	H
A		1			1	1	1	
B	1		1	1		1		
C		1		1				
D		1	1					1
E	1					1	1	1
F	1	1			1		1	1
G	1				1	1		1
H				1	1	1	1	
$\Sigma=30$	4	4	2	3	4	5	4	4

Tabelle 8: Ausbildung von Kontakten zwischen den acht Furinmolekülen in der triklinen (links) bzw. der hexagonalen Raumgruppe (rechts). Es bilden jeweils die Moleküle A-D und E-H Tetramere mit einer 222-Pseudo-Symmetrie. Bei P1 werden 44 Kontakte (Abstand < ca. 3,7 Å) und bei P6₅ nur 30 Kontakte ausgebildet.

5.6 Strukturbeschreibung

5.6.1 Allgemeine Übersicht

In den triklinen wie auch in den hexagonalen Kristallen sind acht Furinmoleküle pro asymmetrische Einheit vorhanden. Jedes dieser 16 Monomere umfaßt die katalytische und die P-Domäne der löslichen Ektodomäne des Mausfurins, sowie den kovalent gebundenen Inhibitor Dekanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chloromethylketon und Kalziumionen. Desweiteren sind zum Teil gut koordinierte Wasser- und Sulfatmoleküle in der Elektronendichtekarte definiert. Die katalytische und die P-Domäne sind deutlich von einander abgesetzt, zeigen aber große interagierende Bereiche. Da sich die verschiedenen Monomere sehr ähnlich sind,

bezieht sich die nachfolgende Beschreibung weitgehend auf das am besten definierte Monomer A der triklinen Kristalle (Abbildung 26).

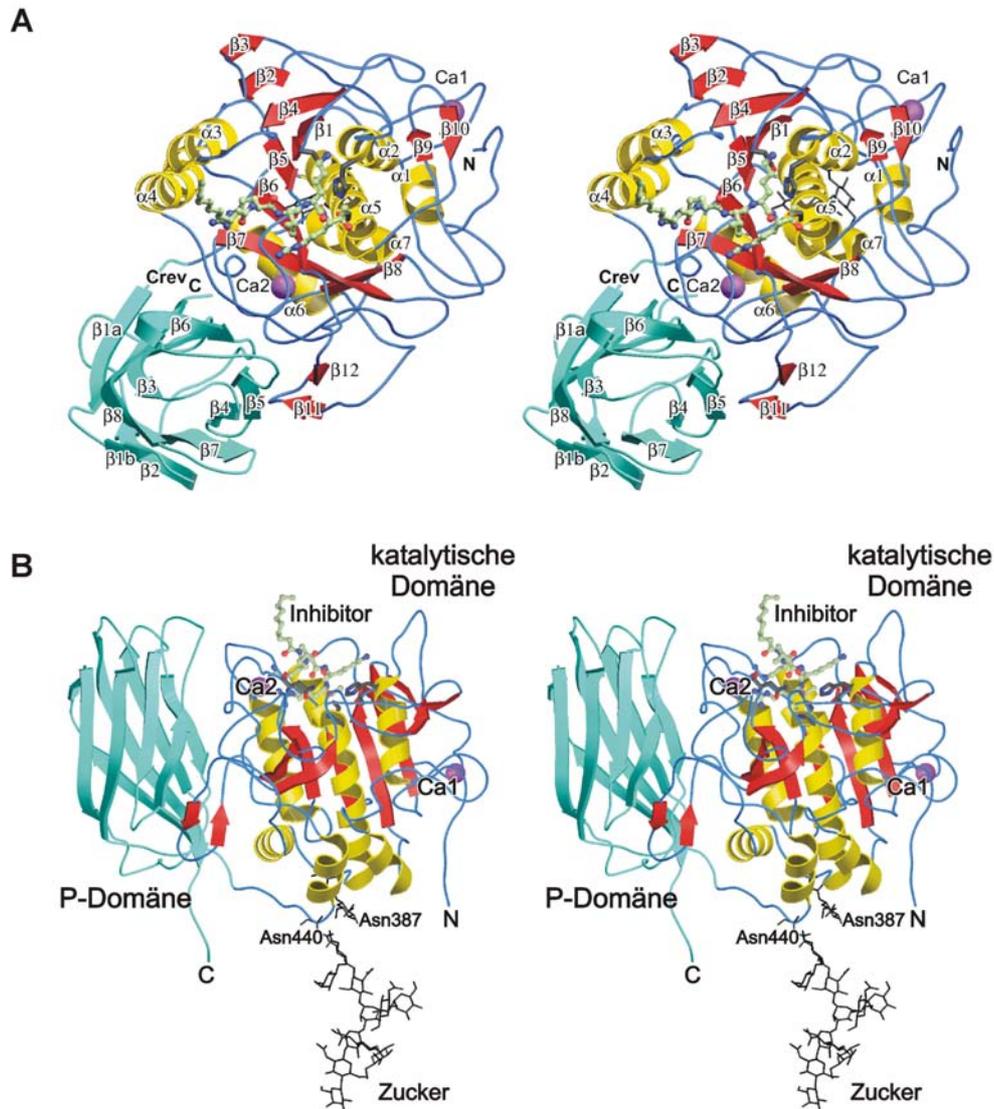


Abbildung 26: Übersichtsdarstellung der Ektodomäne von Furin der Maus. Helices, β -Stränge und unregelmäßige Strukturen der katalytischen Domäne sind in gelb, rot bzw. dunkelblau und die P-Domäne in hellblau abgebildet. Von den Resten des aktiven Zentrums (dunkelgrau) und des Dec-RVKR-CMK-Inhibitors (Ball-und-Stäbchen-Darstellung) sind auch die Seitenketten gezeigt. Die gebundenen Kalziumionen (Ca1 und Ca2) sind als violette Bälle und die N-glykosidisch verknüpften Zucker als Stäbchen dargestellt. Die tiefe Rinne zwischen der katalytischen und der P-Domäne ist mit Crev (*crevice*) markiert. In Abbildung A schaut man in Standardorientierung auf das aktive Zentrum und den Inhibitor, während für Abbildung B zum besseren Blick auf die P-Domäne die Struktur um ca. 90° um die Horizontale gedreht wurde.

5.6.2 Katalytische Domäne

Die katalytische Domäne des Furins der Maus reicht von Rest Asp108 bis Ala445, wobei die Peptidketten der verschiedenen Monomere erst ab Val109 in der Elektronendichtekarte definiert sind. Der Kernbereich ähnelt der katalytischen Domäne des Subtilisins (Bode *et al.*, 1987; Siezen *et al.*, 1994) und besteht aus sieben parallelen und einem antiparallelen

β -Peptidsträngen, die zusammen ein starkverdrehtes β -Faltblatt (C β 1-C β 8⁵, Abbildung 27 und Abbildung 28) bilden. Umgeben wird dieses Faltblatt von fünf direkt benachbarten (Ca2-Ca6) und zwei peripheren Helices (Ca1 und Ca7) sowie zwei peripheren β -Haarnadelschleifen (β -hairpin-loops). Die beiden β -Haarnadelschleifen sind jeweils aus zwei kurzen, 2 bis 4 Aminosäuren langen β -Strängen C β 9-C β 10 und C β 11-C β 12 aufgebaut, wobei das letztere β -Faltblatt in Nachbarschaft zur P-Domäne steht.

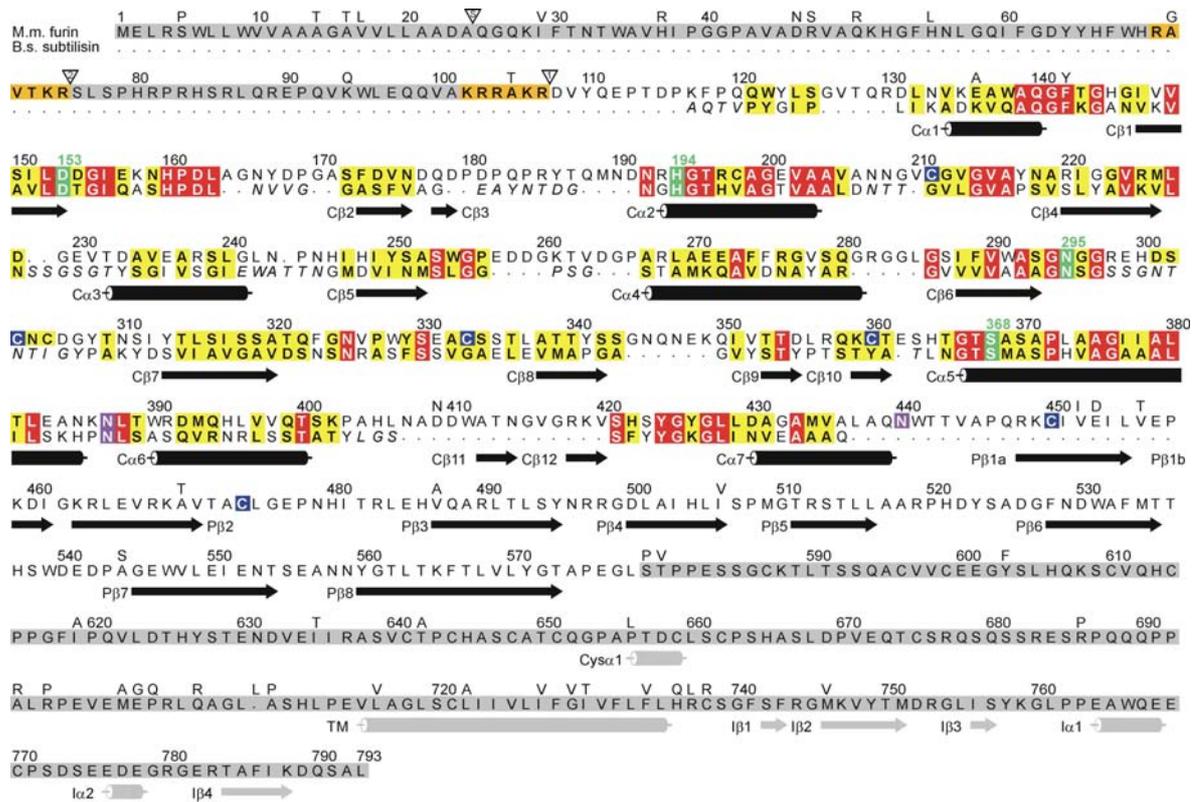


Abbildung 27: Primärstruktur vom Furin der Maus. Strukturbasierter Aminosäurevergleich zwischen Mausfurin (M.m. furin) und Subtilisin Carlsberg (B.s. subtilisin). Für Subtilisin sind alle topologisch ungleichen Reste in kursiv dargestellt. Identische und ähnliche Reste sind rot bzw. gelb, Cysteine von Disulfidbrücken blau, die Reste des aktiven Zentrums grün und die zwei glykosylierten Asparagine violett markiert. Die Erkennungssequenzen für die autokatalytische Prozessierung der Prodomäne sind orange hinterlegt und die zwei Spaltstellen mit Pfeilen und in der Reihenfolge ihrer Spaltung mit den Zahlen 1 und 2 markiert. S bezeichnet die Spaltstelle für das Signalpeptid. Die Sequenznummerierung entspricht dem Preprofurin der Maus und die Sequenzunterschiede zum menschlichen Enzym stehen über der Maussequenz. Unter den Sequenzen sind in schwarz die in der Kristallstruktur gefundenen und in grau die vorhergesagten Sekundärstrukturelemente angegeben. Reste, die nicht in der Elektronendichte zu erkennen sind, wurden grau hinterlegt.

⁵ Bei der gewählten Nomenklatur der Sekundärstrukturelemente bezeichnen C und P die katalytische bzw. P-Domäne, α und β eine α -Helix bzw. einen Strang eines β -Faltblatts, gefolgt von der Nummer innerhalb der Domäne. Sind zwei Strukturelemente durch einen Bindestrich verbunden ist der gesamte Bereich gemeint, bei einem Schrägstrich nur der Schleifenbereich zwischen den Helices bzw. β -Strängen.

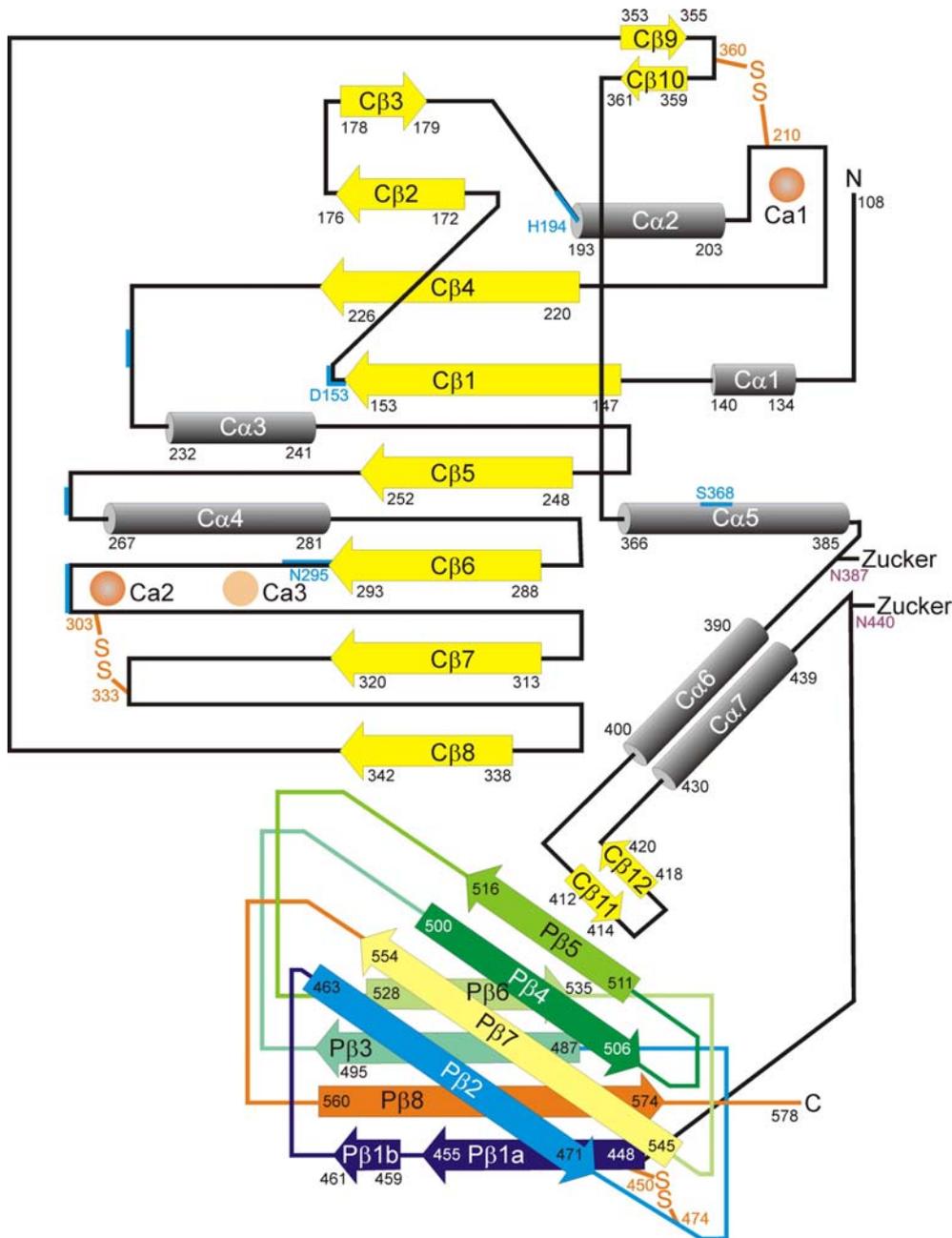


Abbildung 28: Topologiediagramm der katalytischen und der P-Domäne von Furin. Helices sind als Zylinder und β -Stränge als Pfeile mit jeweils der Sequenznummer des ersten und letzten Restes dargestellt. Die Lage der Sekundärstrukturelemente entspricht ungefähr der räumlichen Anordnung. Die katalytische Domäne im oberen Teil der Abbildung besteht aus einem zentralen achtsträngigen β -Faltblatt ($C\beta 1$ - $C\beta 8$), das beidseitig von den benachbarten Helices ($Ca 2$ - $Ca 6$) flankiert wird. Die Aminosäuren der katalytischen Triade und Bereiche, die das aktive Zentrum formen, sind blau, Disulfidbrücken und (potentielle) Kalziumionen orange markiert. Neben dem zentralen Bereich besitzt die katalytische Domäne zwei periphere Helices ($Ca 1$ und $Ca 7$) und zwei β -Haarnadelschleifen ($C\beta 9/C\beta 10$ und $C\beta 11/C\beta 12$). Die acht β -Stränge der P-Domäne im unteren Teil der Zeichnung bilden zwei antiparallele β -Faltblätter, die zusammen zu einem *jelly-roll*-Motiv angeordnet sind. Der Verlauf der Kette ist durch Regenbogenfarben (blau: N-Terminus, rot: C-Terminus) hervorgehoben.

Unterschiede zum bakteriellen Subtilisin finden sich besonders in Länge und Konformation der ausgedehnten Oberflächenschleifen, von denen mehrere die Tasche des aktiven Zentrums umgeben oder in Wechselwirkung mit der P-Domäne treten. Das aktive Zentrum wird durch die Schleifenbereiche $C\beta 1/C\beta 2$, $C\beta 3/Ca 2$, $C\beta 4/Ca 3$, $C\beta 5/Ca 4$ und

C β 6/C β 7 und der Helix Ca5 gebildet. Eine Quervernetzung durch Disulfidgruppen innerhalb der katalytischen Domäne erfolgt zwischen den bei den PCs konservierten Resten Cys211 und Cys360 bzw. Cys303 und Cys333. An zwei Stellen konnten Kalziumionen nachgewiesen werden, die in Abschnitt 5.6.4 näher beschrieben werden.

5.6.3 Aktives Zentrum und Inhibitor

Die für die Serinproteasen typische katalytische Triade besteht beim Furin aus den Resten Ser368 (C α 5), His194 (C β 3/C α 2) und Asp153 (C β 1/C β 2). Die Methylengruppe des Inhibitors Dekanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chloromethylketon ist unter Abspaltung des Chlors kovalent an His194-N ϵ gebunden, während eine weitere Bindung zwischen Ser368-O γ und dem Carbonyl-Kohlenstoff des P1-Inhibitor-Arginins ausgebildet wurde und so ein Halbketal (Michaelis Komplex) entsteht. Der Carbonyl-Kohlenstoff geht dabei in einen tetraedrischen Zustand über, der dem Übergangszustand natürlicher Substrate ähnelt (Kreutter 1994). Stabilisiert wird dies durch Asn295 (C β 6/C β 7) im sogenannten Oxyanionloch.

In der Kristallstruktur tritt der Inhibitor mit den Resten der katalytischen Triade sowie mit den Aminosäuren Asp154 (C β 1/C β 2), Asp191 (C β 3/C α 2), Glu236 (C β 4/C α 3), Ser253 bis Asp258, Asp264 (C β 5/C α 4), Ala292, Ser293, Asp306, Tyr308 (C β 6/C β 7) in Wechselwirkung. Die neun mit dem Inhibitor interagierenden sauren Aminosäuren (Asp und Glu) sorgen für ein sehr negativ geladenes aktives Zentrum (Abbildung 29) und eine hohe Spezifität für basische Substrate (Hosaka *et al.*, 1991; Krysan *et al.*, 1999; Molloy *et al.*, 1999). Das aktive Zentrum von Furin unterscheidet sich in Tiefe, Form und Ladung von dem des bakteriellen Subtilisins (Bode *et al.*, 1987). Der Bereich Leu227-Thr232 von Furin ist kürzer als der entsprechende Bereich im Subtilisin.

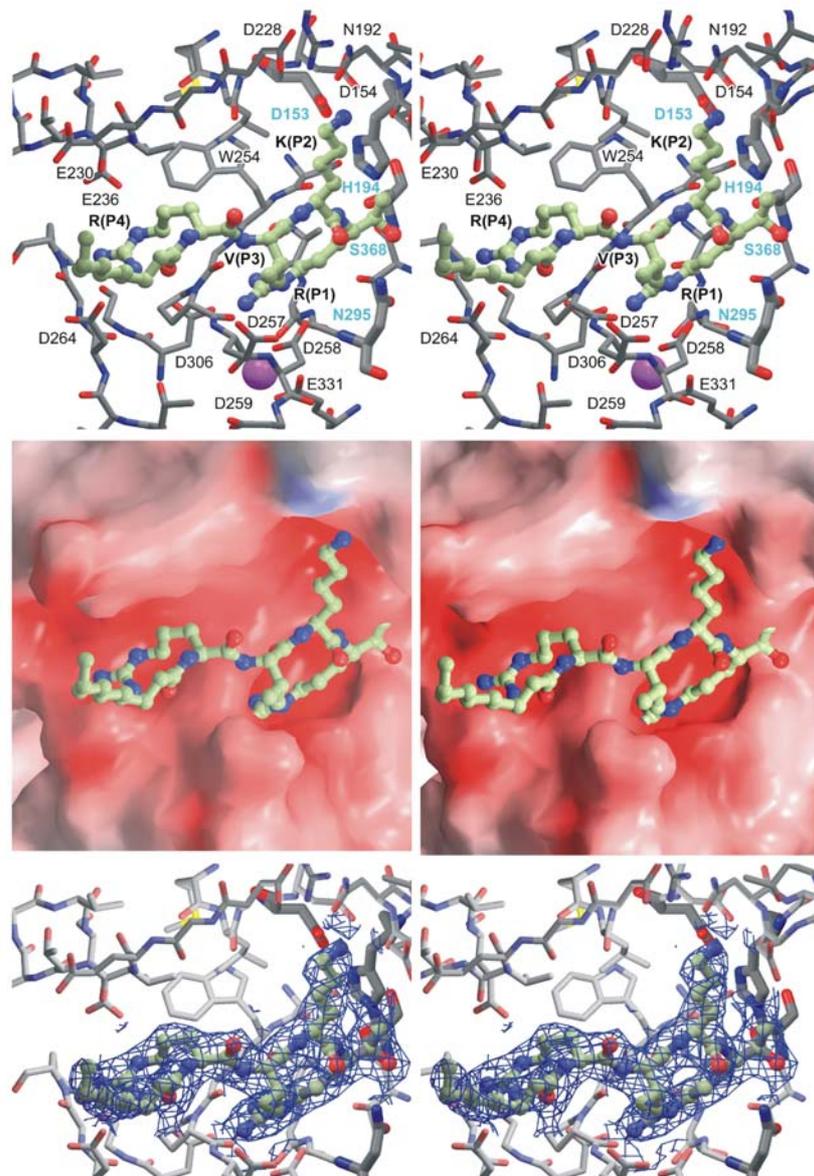


Abbildung 29: Interaktionen zwischen dem Inhibitor und dem aktiven Zentrum. Mit dem Stereobild schaut man auf die Region des aktiven Zentrums von Furin und den Dec-RVKR-CMK-Inhibitor. Oben: Stäbchenmodell der umgebenen Reste (grau Kohlenstoff, blau Stickstoff und rot Sauerstoff) zusammen mit dem Inhibitor (grau in Ball- und Stäbchen-Darstellung) und dem Kalzium Ca^{2+} (violetter Ball). Die vier Inhibitorseitenketten, die Reste des aktiven Zentrums wie auch benachbarte, überwiegend saure Reste sind mit der Sequenznummer beschriftet. Mitte: Der Inhibitor in Ball- und Stäbchen-Darstellung ist vor der Oberfläche der katalytischen Domäne, die entsprechend ihrer berechneten elektrostatischen Potentiale eingefärbt wurde, gezeigt (rot: -27 e kT^{-1} ; blau: 27 e kT^{-1}). Unten: Stäbchenmodell wie in der obersten Abbildung jedoch mit der auf 1σ konturierten, endgültigen $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte in blau.

Durch die Verwendung eines tetrapeptidischen Inhibitors lassen sich die Substratbindungstaschen S1 bis S4 und deren Wechselwirkungen zum Substrat an den Stellen P1 bis P4 mit der Kristallstruktur gut beschreiben. Der peptidische Teil des Inhibitors ist dem Bereich Ser253-Trp-Gly-Pro-Asp-Asp258, der auch als Eingangsrahmen (*entrance frame*) der S1-Tasche bezeichnet wird, benachbart. Beide zusammen bilden ein verdrehtes antiparalleles β -Faltblatt (Abbildung 30). Der Eingangsrahmen umgibt gemeinsam mit dem

Bereich Ser293 bis Asn295 die Arg-P1-Seitenkette (Abbildung 31). Die Guanidiniumgruppe ist perfekt über die Carbonyl-Sauerstoffe der Aminosäurereste Pro256 und Ala292 und die Carboxylate von Asp258 und Asp306 gebunden, was die hohe Substratspezifität für Arg-P1 erklärt ((Jean *et al.*, 1995; Nakayama, 1997; Rockwell und Fuller, 2002; Rockwell *et al.*, 2002). Das Asp258-Carboxylat am Boden der S1-Tasche koordiniert nicht nur $N\epsilon$ und $N\eta$ vom Arg-P1 sondern auch gleichzeitig das benachbarte Kalziumion Ca^{2+} . Auf diese Kalziumbindestelle wird weiter unten noch näher eingegangen.

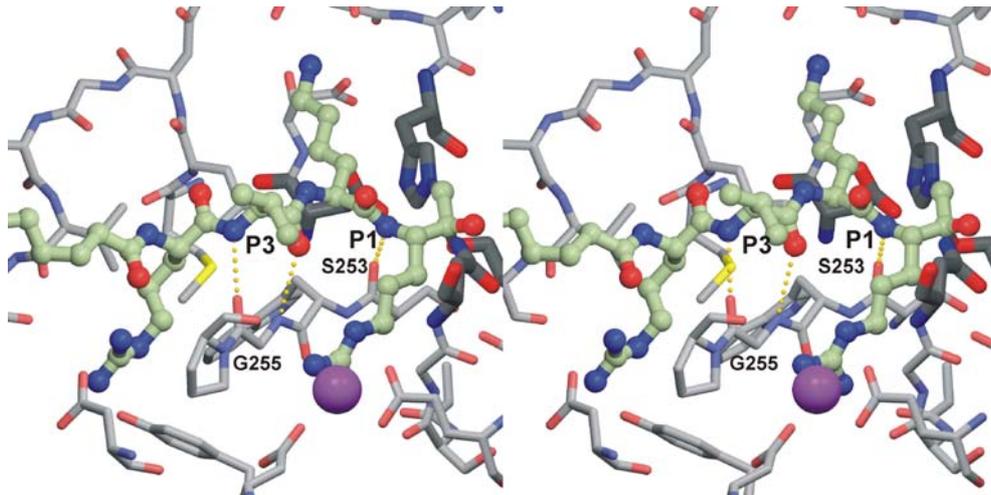


Abbildung 30: Eingangsrahmen zur S1-Tasche. Der Bereich Ser253-Trp-Gly-Pro-Glu257, der sogenannte Eingangsrahmen zur S1-Tasche, ist über die Wasserstoffbrückenbindungen Gly255-O/Val-P3-N, Gly255-N/Val-P3-O und Ser253-O/Arg-P1-N zum Inhibitor Dekanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chloromethylketon gebunden, die zusammen ein antiparalleles β -Faltblatt bilden.

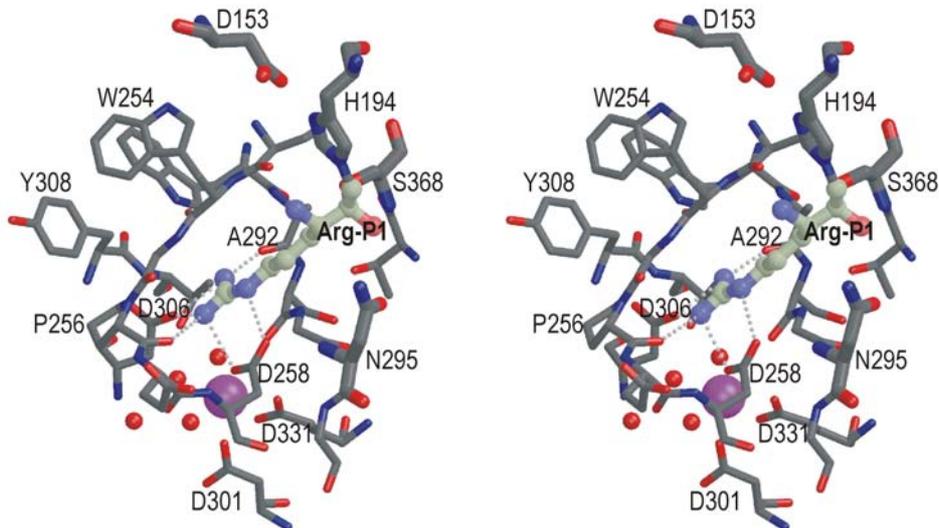


Abbildung 31: Stereoabbildung der Substratspezifitätstasche S1. Das Arg-P1 ist in Ball- und Stäbchen-Darstellung mit hellgrauem Kohlenstoff und die umliegenden Reste von Furin in Stäbchen-Darstellung mit dunkelgrauem Kohlenstoff gezeigt. Sauerstoffe sind rot, Stickstoffe blau, Kalzium violett dargestellt. Das Arg-P1 ist über Wasserstoffbrücken (gepunktet) zu den Carboxylaten von Asp258 und Asp306 sowie den Carbonylsauerstoffen von Ala292 und Pro256 gebunden.

Im Gegensatz zur gut für die Bindung von Arg-P1 ausgebildeten S1-Tasche gestaltet sich die Erkennung basischer Reste in der Substratbindungstasche S2 einfacher. Die P2-Seiten-

kette liegt in einer seichten Oberflächenvertiefung und kann über mehrere Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren am Ende der Tasche gebunden werden (Abbildung 32). In der vorliegenden Kristallstruktur wird das Lys-P2-Nε von einem Asp154-Carboxylatsauerstoff, dem Asn192-Carboxamid und dem Carboxylsauerstoff des Asp191 umgeben. Die S2-Tasche zeigt wesentlich geringere Spezifität als die S1-Tasche, auch wenn die basischen Reste Lys und Arg deutlich bevorzugt werden. Untersuchungen mit Substraten, bei denen Lys an P2 durch ungeladene Reste wie Gln und Leu ausgetauscht wurde, ergaben eine deutlich geringere Substratumsetzung. Bei der Verwendung von sauren Resten wie Asp war die Umsetzung noch schlechter (Rockwell *et al.*, 1997).

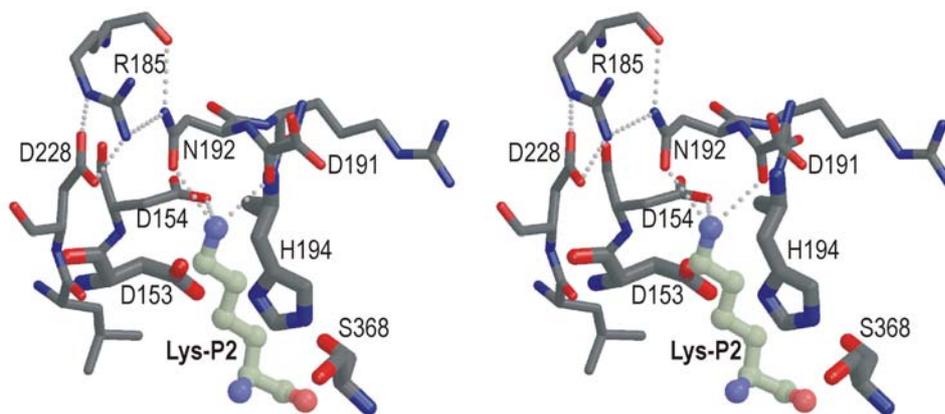


Abbildung 32: Stereoabbildung der Substratspezifitätstasche S2. Das Lys-P2 ist in Ball- und Stäbchen-Darstellung mit hellgrauem Kohlenstoff und die umliegenden Enzymreste in Stäbchendarstellung mit dunkelgrauem Kohlenstoff gezeigt. Sauerstoffe sind rot, Stickstoffe blau und die Wasserstoffbrücken zwischen Lys-P2 und den Resten Asp154, Asp191 und Asn192 gepunktet dargestellt.

Für das Valin-P3 gibt es keine Substratbindungstasche. Die Seitenkette zeigt stattdessen von der Oberfläche des Furins weg in Richtung des Lösungsmittels, wodurch die sehr geringe Substratspezifität an dieser Stelle zu erklären ist.

Die seichte, lösungsmittlexponierte Substratspezifitätstasche S4 befindet sich auf der der S1-Tasche gegenüberliegenden Seite des Eingangsrahmens (Abbildung 33). Arg-P4 zeigt wie das Arg-P1 von dem aktiven Zentrum aus nach Süden⁶. Furin kann zwischen Lysin- und Arginin-P4 unterscheiden, da die abgeknickte Seitenkette des Arginins gut mit mehreren Resten der S4-Tasche Kontakte ausbilden kann. Die Guanodinogruppe wird dabei durch die Carboxylate der Reste Glu236 und Asp264, der Hydroxylgruppe des Phenolrings

⁶ Für eine Beschreibung mit Hilfe der Himmelsrichtungen dreht man die Protease in Standardorientierung, so daß der N-Terminus des Substrats bzw. des Inhibitors links (Westen) und der C-Terminus rechts (Osten) liegt und man direkt auf das aktive Zentrum schaut. Oben und unten sind dem entsprechend Norden und Süden.

des Tyr308 und dem Carbonylsauerstoff von Gly265 koordiniert. Solche ausgeprägten Interaktionen sind bei einer Lysinseitenkette nicht möglich, so daß Arginin bevorzugt wird.

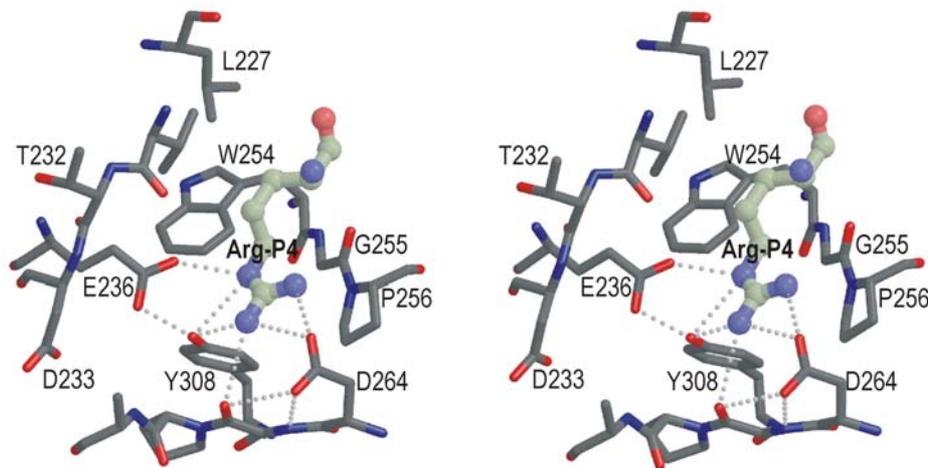


Abbildung 33: Stereoabbildung der Substratspezifitätstasche S4. Das Arg-P1 ist in Ball- und Stäbchen-Darstellung mit hellgrauem Kohlenstoff und die umliegenden Enzymreste in Stäbchen-Darstellung mit dunkelgrauem Kohlenstoff gezeigt. Sauerstoffe sind rot, Stickstoffe blau und die Wasserstoffbrücken zwischen Arg-P4 und den Resten Glu236, Asp264 und Tyr308 gepunktet dargestellt.

5.6.4 Kalziumbindestellen

Furin benötigt genauso wie andere subtilisin-ähnlichen Serinproteasen Kalzium (Fuller *et al.*, 1989a; Siezen *et al.*, 1991). Da es seine maximale proteolytische Aktivität bei einer Kalziumkonzentration von 1 bis 3 mM erreicht (Molloy *et al.*, 1992), wurde während der ganzen Aufreinigung und Kristallisation immer eine Kalziumkonzentration von mindestens 2 mM eingesetzt. An Hand von Sequenzvergleichen wurden für Furin zwei Kalziumbindestellen vorhergesagt (Siezen *et al.*, 1994; Siezen *et al.*, 1991). Die erste Stelle wurde für den Schleifenbereich $C\alpha_2/C\beta_4$ (Val205-Gly212) postuliert und entspricht dem Kalzium Ca430 mit der Schleife von Rest 75 bis 83 des Subtilisins (Bode *et al.*, 1987). Ein zweites Kalziumion wurde für den Schleifenbereich $C\beta_3/C\alpha_2$ (Asp174-Gln188) vorhergesagt. Insgesamt wurden aufgrund der hohen Elektronendichte, der Ladungsverteilung und der Koordinierung durch die umgebenen Aminosäuren innerhalb der Kristallstruktur von Furin drei mögliche Kalziumionen identifiziert, von denen nur eine den postulierten Stellen entsprach.

Die erste Kalziumbindestelle Ca1 (entsprechend dem Kalzium A bzw. Ca430 von Subtilisin) wird durch die Reste Asp115 (N-Terminus), Asp162 ($C\beta_1/C\beta_2$) und der Schleifenregion Ala204-Gly212 ($C\alpha_2/C\beta_4$) gebildet. Hierbei koordinieren die drei Carbonyl-Sauerstoffe der Reste Val205, Val210 und Gly212 so wie die beiden Carboxylat-Sauerstoffe von Asp162 und je eines von Asp115 und Asn208 das Kalziumion in Form

einer fünfseitigen Bipyramide. Die Strukturverfeinerung in der triklinen Kristallform führte zu *B*-Faktoren, die denen der benachbarten Aminosäuren entsprachen, so daß auch für Furin von einer Kalziumbindung ausgegangen werden konnte.

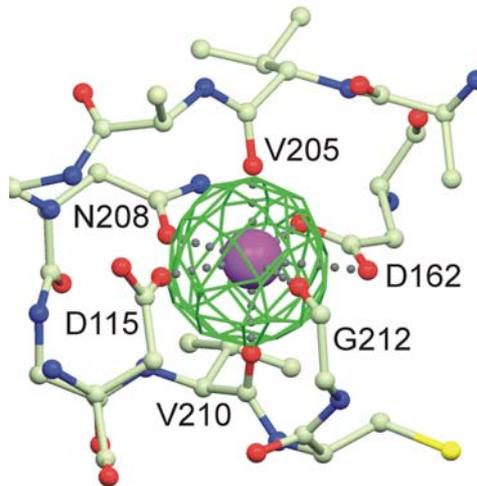


Abbildung 34: Kalziumbindestelle Ca1 mit Kalzium (violetter Ball) und der anomalen Dichtedichte $(F_{hkl, 2,99\text{Å}}^+ - F_{hkl, 2,99\text{Å}}^-) - (F_{hkl, 3,15\text{Å}}^+ - F_{hkl, 3,15\text{Å}}^-)$ (Konturierung auf $3,5\sigma$; vgl. Abbildung 37) als grüner Käfig. Die das Kalzium koordinierenden Reste sind als Ball-und-Stäbchen-Darstellung und die Wasserstoffbrücken als gepunktete Linien abgebildet. Es sind die entsprechenden Sequenznummern der Reste angegeben.

Das zweite, in der Furinstruktur als Kalzium Ca2 angenommene Metallion befindet sich am Boden der S1-Tasche und wird durch die Carboxylat-Sauerstoffe der Reste Asp258 (C β 5/C α 4), Asp301 (C β 6/C β 7) und Glu331 (C β 7/C β 8) sowie drei interne Wassermoleküle koordiniert (Abbildung 35, vgl auch Kapitel 5.6.3). Diese Bindungsstelle ist neu und wurde weder für die bakteriellen Subtilasen beschrieben noch für die Proproteinkonvertasen vorhergesagt (Siezen *et al.*, 1994; Siezen *et al.*, 1991; Siezen und Leunissen, 1997).

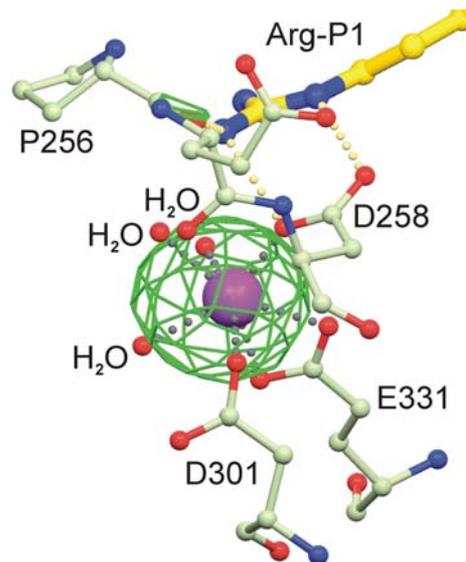


Abbildung 35: Es sind die das Kalzium Ca2 umgebenden Reste, die Wasserstoffbrücken (grau) und die entsprechenden Sequenznummern dargestellt. Beteiligte Wasser sind als kleine rote Bälle gezeigt. Auch hier konnte das Kalzium durch die Differenzdichte $(F_{hkl, 2,99\text{\AA}}^+ - F_{hkl, 2,99\text{\AA}}^-) - (F_{hkl, 3,15\text{\AA}}^+ - F_{hkl, 3,15\text{\AA}}^-)$ (Konturierung auf $3,5\sigma$; vgl. Abbildung 37) identifiziert werden. In der Abbildung ist zudem die räumliche Nachbarschaft zwischen Ca2 und dem Arg-P1 sowie die Koordinierung des Kalziums und des Arg-P1 zu sehen (graue und goldene Punkte).

Das dritte potentielle Kalziumion Ca3 ist homolog dem Kalzium B bzw. Ca401 von Subtilisin Carlsberg (Bode *et al.*, 1987; Gallagher *et al.*, 1995). Bei Subtilisin erfolgt die Koordinierung durch die drei Carbonyl-Sauerstoffe von Ala169, Tyr171 und Val174 sowie zwei Wassermoleküle. In Furin können die Carbonyl-Sauerstoffe der entsprechenden Reste Thr309, Ser311 und Thr314, der Sauerstoff Oy von Thr314 und ein Wassermolekül das Kalziumion koordinieren (Abbildung 36).

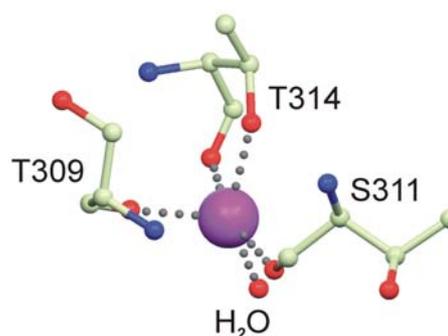


Abbildung 36: Mögliche Kalziumbindestelle Ca3 und die daran beteiligten Reste und Wassermoleküle (kleine rote Bälle). Es konnte allerdings durch die anomale Differenzdichte $(F_{hkl, 2,99\text{\AA}}^+ - F_{hkl, 2,99\text{\AA}}^-) - (F_{hkl, 3,15\text{\AA}}^+ - F_{hkl, 3,15\text{\AA}}^-)$ (Konturierung auf $3,5\sigma$; vgl. Abbildung 37) ausgeschlossen werden, daß in der Kristallstruktur von Furin diese Stelle mit einem Kalzium besetzt ist.

Die Elektronendichtekarte und der aus der Verfeinerung resultierende *B*-Faktor für das an dieser Stelle wahlweise eingebaut und verfeinerte Wassermolekül bzw. Kalziumion führte zu keinen eindeutigen Ergebnissen, ob an dieser Stelle ein Wassermolekül oder ein

Kalziumion vorliegt. Auch konnte die Bindung anderer Kationen wie z. B. Kalium nicht ausgeschlossen werden. Für den homologen Bereich der Kristallstruktur von Kex2 wurde die Bindung eines Kalziums beschrieben (Holyoak *et al.*, 2003). Zur Klärung dieser Frage wurden in einem Röntgendiffraktionsexperiment an dem hexagonalen nativen Kristall zwei Datensätze bei den Wellenlängen 3,15 Å und 2,99 Å gemessen und das anomale Signal untersucht ($\mathbf{F}_{hkl, 3,15\text{Å}}^+ - \mathbf{F}_{hkl, 3,15\text{Å}}^-$ bzw. $\mathbf{F}_{hkl, 2,99\text{Å}}^+ - \mathbf{F}_{hkl, 2,99\text{Å}}^-$; Tabelle 9). Die Auflösung betrug 3,9 Å. Mit der Messung bei der Wellenlänge 3,15 Å war es möglich die Positionen eventuell im Kristall vorhandener Schwefel- und Kaliumatome zu bestimmen. Da gleichzeitig das anomale Signal vom Kalzium sehr gering war, wurde ausgeschlossen, daß es sich bei diesen Positionen um Kalziumatome handelte. Bei der Wellenlänge 2,99 Å war hingegen auch das anomale Signal vom Kalzium sehr stark, so daß es neben den anderen beiden Atomsorten detektiert und die Positionen der Kalziumatome bestimmt werden konnten.

Tabelle 9: Datenstatistik zu den an der K-Absorptionskante des Kalziums gemessenen Datensätze.

Hexagonale Kristalle	Nativ, Kalziumkante	
	<i>image-plate</i> -Detektor	
Raumgruppe	P6 _s	
Zellkonstanten		
a = b (Å)	135,5	
c (Å)	472,0	
α = β (°)	90	
γ (°)	120	
Wellenlänge (Å)	3,15	2,99
Auflösung (Å)	50 – 3,90	50 – 3,90
Zahl der Diffraktionsbilder	119	110
Winkelinkrement (°)	0,5	0,5
Kristall-Detektor-Abstand (mm)	112,39	113,5
Dosis ^a	20000	30000
Zahl der Reflexe		
gemessen	138969	140212
unabhängig (anomal)	84127	82401
Vollständigkeit (%)		
gesamt	95,2	93,3
letzte Auflösungsschale ^c	92,6	95,7
R _{sym} ^b (%)		
gesamt	0,15	0,095
letzte Auflösungsschale ^c	0,22	0,125
<I>/<σ _I >		
gesamt	4,8	7,3
letzte Auflösungsschale ^c	3,0	5,1

^a Digitale Einheitenangabe der Mar345-Meßsoftware eines kartesischen Bildes.

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

^c Letzte Auflösungsschale: 3,9-4,2 Å.

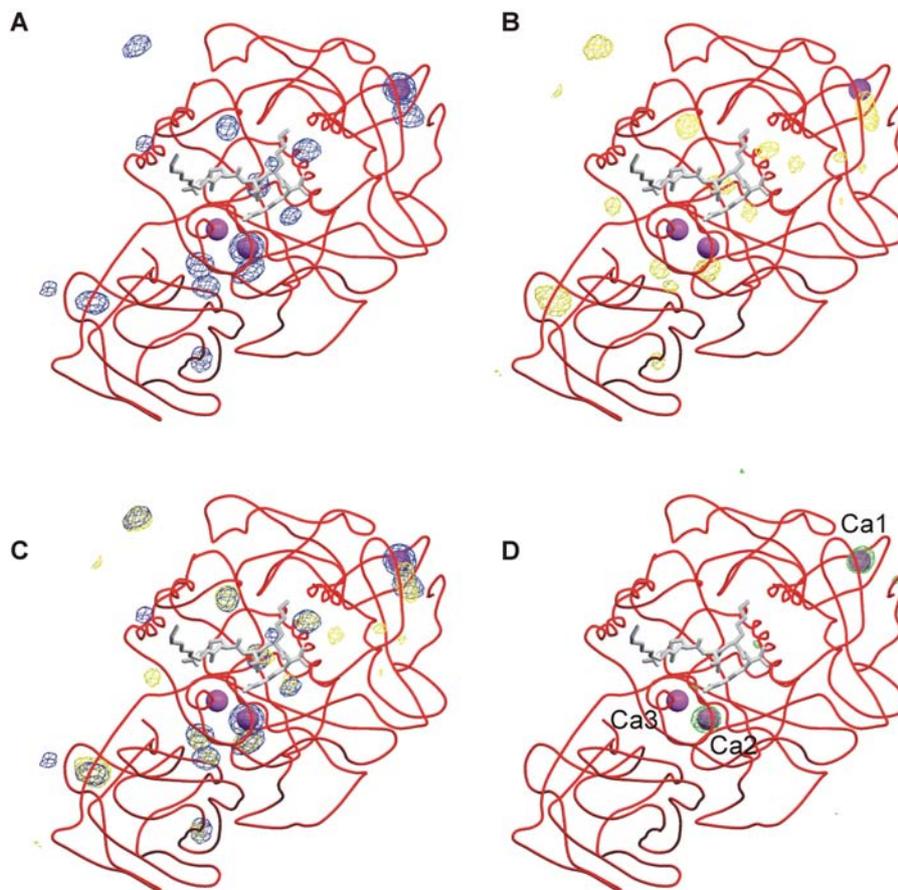


Abbildung 37: Darstellung der Hauptketten von Furin (roter Strang), des Inhibitors (weißes Stäbchenmodell) und der drei potentiellen Kalziumionen (violette Bälle). Die Differenzelektronendichtekarten aus $F_{hkl, 2,99\text{\AA}}^+ - F_{hkl, 2,99\text{\AA}}^-$ (blau; Abb. A und C), $F_{hkl, 3,15\text{\AA}}^+ - F_{hkl, 3,15\text{\AA}}^-$ (gelb; Abb. B und C) und $(F_{hkl, 2,99\text{\AA}}^+ - F_{hkl, 2,99\text{\AA}}^-) - (F_{hkl, 3,15\text{\AA}}^+ - F_{hkl, 3,15\text{\AA}}^-)$ (grün; Abb. D) sind als Käfige mit einer Konturierung auf 5,6, 7,5 bzw. 3,5 σ abgebildet. In Abb. D erkennt man, daß nur die Ionenbindungsstellen Ca1 und Ca2 in der Kristallstruktur von Furin mit Kalzium besetzt sind.

Wie man an der Abbildung 37, A erkennt, zeigen nur die potentiellen Kalziumionen Ca1 und Ca2, nicht aber Ca3 bei der Wellenlänge 2,99 Å ein hohes anomales Signal. Hierdurch ist auszuschließen, daß Furin bei den Aminosäureresten Thr309, Ser311 und Thr314 ein Kalzium gebunden hat. Da bei der Wellenlänge 3,15 Å (Abbildung 37, B) an keiner der drei betrachteten Stellen ein anomales Signal vorliegt, kann auch die Bindung von Kalium ausgeschlossen werden. Leichtere Metalle wie z. B. Lithium, Natrium oder Magnesium können jedoch nicht detektiert werden, da deren anomaler Beitrag bei dieser Wellenlänge zu gering ist. Die weiteren Bereiche der Differenzelektronendichte, die man in den Abbildung 37, A und B sieht, stammen vom Schwefel der Cysteine und den gebundenen Sulfationen. Die anomalen Differenzen aus den Datensätzen bei 2,99 Å und 3,15 Å (Abbildung 37, C, Abbildung 34 und Abbildung 35) verdeutlicht nochmal die Lage der beiden Kalziumionen Ca1 und Ca2.

5.6.5 P-Domäne

Die P-Domäne oder homo B-Domäne beginnt beim Aminosäurerest Pro446 und ist für das Monomer A der triklinen Kristallform bis Leu578 in der Elektronendichtekarte definiert. Die Domäne ist charakteristisch für die Familie der Proproteinkonvertasen und fehlt dem bakteriellen Subtilisin. Von Lipkind *et al.* (Lipkind *et al.*, 1998) wurden aufgrund der Sequenzen der PCs 8 β -Stränge für die P-Domäne, nicht aber deren Reihenfolge richtig vorhergesagt. In der Kristallstruktur sind die β -Stränge so angeordnet, daß sie das *jelly-roll*-Motiv bilden, bei dem die antiparallel verlaufenden β -Stränge P β 1a/b-P β 8-P β 3-P β 6 den antiparallelen β -Strängen P β 2-P β 7-P β 4-P β 5 gegenüberstehen (Abbildung 38). Der β -Strang P β 1 ist in Bezug auf seine Wasserstoffbrückenbindungen zum β -Strang P β 8 in einem kurzen Bereich (Rest 456-458) unterbrochen und wird daher in P β 1a und P β 1b unterteilt. Der Rest Cys450 von P β 1a ist über eine Disulfidbrücke mit Cys474 der Schleife P β 2/P β 3 quervernetzt.

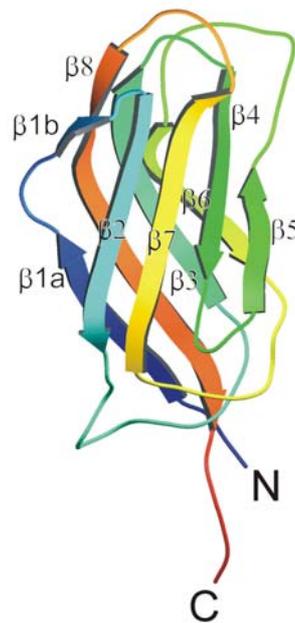


Abbildung 38: Bänderdarstellung der P-Domäne mit ihren beiden antiparallelen viersträngigen β -Faltblättern. Der Verlauf der Kette ist durch Regenbogenfarben (blau: N-Terminus, rot: C-Terminus) hervorgehoben. Der β 1-Strang besitzt in einem kurzen Bereich keine Wasserstoffbrücken zum Nachbarstrang β 8 und wurde daher in β 1a und β 1b unterteilt. Die acht β -Stränge der P-Domäne bilden zusammen das *jelly-roll*-Motiv.

Die Verbindungsfläche zwischen der katalytischen und der P-Domäne besitzt eine Größe von ca. 1400 \AA^2 . Abgesehen von einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen zwei Hauptkettenatomen (Ser334 und Thr536) handelt es sich ausschließlich um Seitenketteninteraktionen. In den Bereichen C β 5/C α 4, C β 6/C β 7, C β 7/C β 8, C α 6, C β 11 bis

C β 12 und P β 2/P β 3, P β 5 bis P β 6/P β 7 und P β 8 kommt es zu Wechselwirkungen zwischen beiden Domänen, wobei seitens der P-Domäne besonders in den Schleifenbereichen P β 2/P β 3, P β 5/P β 6 und P β 6/P β 7 polare Kontakte zur katalytischen Domäne ausgebildet sind. Insgesamt überwiegen mit ca. 60 % die hydrophoben über die polaren Wechselwirkungen (Protein-Protein Interactions Server, <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP>).

Geht man vom aktiven Zentrum aus weiter in Richtung der potentiellen Bindungstaschen S4 und höher, so gelangt man zu einer tiefen Rinne zwischen katalytischer und der P-Domäne. Diese Rinne trennt beide Domänen in dem Bereich deutlich von einander ab und dient möglicherweise der Bindung der Prodomäne vor der autokatalytischen Aktivierung des Profurins.

5.6.6 Zucker

Wie bereits oben erwähnt (Tabelle 6), waren an verschiedenen Monomeren der triklinen Raumgruppe zwei N-glykosidisch verknüpfte Zuckerketten in der Dichte zu erkennen. Der Zucker an der Seitenkette von Asn387 war nur bis zum ersten Zuckerrest, einem N-Acetylglucosamin, definiert. Die an der Seitenkette von Asn440 gebundene Zuckerkette war deutlich besser definiert und ließ bei Monomer A den Einbau eines komplexen Zuckers mit 11 Zuckerresten zu (Abbildung 39). Stabilisiert wurde der Zucker durch ein benachbartes Furinmolekül. Trotz der geringen Auflösung war es möglich, die Art der Verzweigung zu bestimmen. Die Charakterisierung der verschiedenen Zuckerbausteine war nicht eindeutig, so daß zum Teil die Abfolge bekannter N-glykosidisch verknüpfter Zucker verwendet wurde (Dwek, 1996).

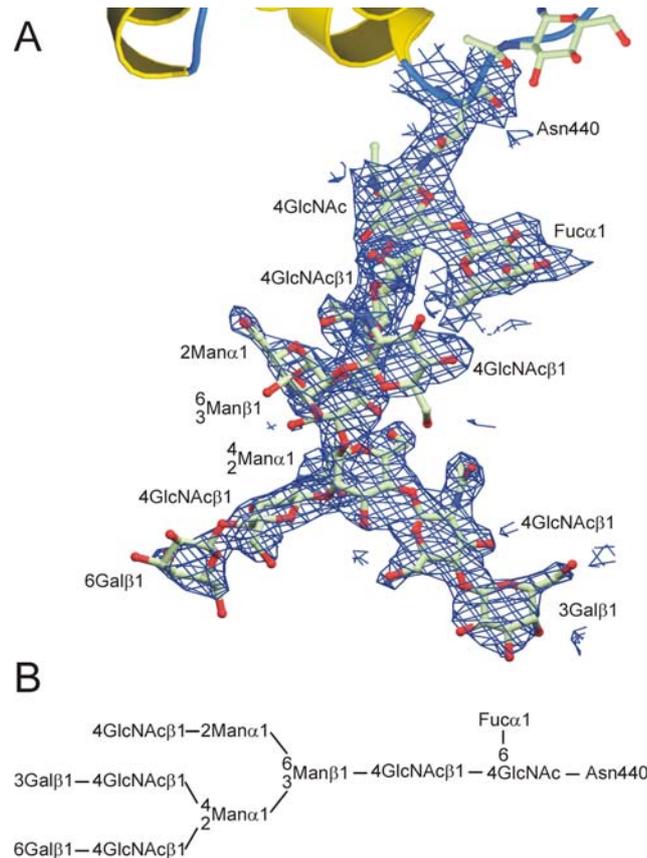


Abbildung 39: Darstellung des am besten definierten Zuckers als (A) Stäbchen (Kohlenstoff grün, Sauerstoff rot) mit der umgebenden endgültigen $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte (blauer Käfig; auf 1σ konturiert) und (B) schematisch. Der abgebildete komplexe Zucker ist über die Seitenkette von Asn440 des Furinmonomers A gebunden und wird über Nachbarmoleküle stabilisiert (nicht dargestellt). Die Beschriftung gibt die Art des Zuckerbausteins, die Konformation und die Nummer des Kohlenstoffs an, über die eine Verknüpfung zu den Nachbarbausteinen erfolgt. GlcNAc = N-Acetylglucosamin, Fuc = Fucose, Man = Mannose, Gal = Galactose.

5.7 Hemmung von Furin

5.7.1 Suche nach neuen Inhibitoren

Von Herrn Dr. Dorian Bevec wurden großzügigerweise einige niedermolekulare Substanzen mit mehrbasischen Seitengruppen zur Verfügung gestellt. Diese Substanzen wurden an Furin auf ihre hemmende Wirkung hin untersucht. Dem aktiven Furin wurden die Substanzen in verschiedene Konzentrationen zugesetzt, die 1 ml-Ansätze für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann nach Zugabe des fluorogenen Substrats pERTKR-amc (Bachem; (Hatsuzawa *et al.*, 1992b)) bei 37 °C die Substratumsetzung durch Zunahme der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 460 nm gemessen. In Abbildung 40, A erkennt man, daß ab einer Inhibitorkonzentration von 11 μM (1 mg Inhibitor pro ml Ansatz) die Substanz A eine hemmende Wirkung auf Furin ausübt. Trägt man die einzelnen Steigungen V_i als relative Aktivität V_i/V_0 mit V_0 als Anfangsgeschwindigkeit ohne Inhibitor gegen die Inhibitorkonzentration auf, erhält man einen IC_{50} -Wert von ca. 16 μM (Abbildung 40, B). Das ist für einen niedermolekularen, kompetitiven Furininhibitor ein sehr guter Wert.

Weitere, chemisch verwandte Substanzen wurden im Labor von Herrn Dr. Jörg Stürzebecher (Klinikum der Freien Universität Jena, Erfurt) in 96-Lochplatten bei einem Ansatzvolumen von 250 μl untersucht. Für einige der Substanzen konnten ähnlich gute oder bessere IC_{50} -Werten für die Hemmung von Furin beobachtet werden (unveröffentlichte Ergebnisse). Mit einer Michaelis-Konstante K_M von 2,4 μM und einer Substratkonzentration $[\text{S}]$ von 12,5 μM konnten über die Gleichung $\text{IC}_{50}/(1+[\text{S}]/K_M)$ für die verschiedenen Inhibitoren die Dissoziationskonstanten, K_i , von wenigen μM errechnet werden.

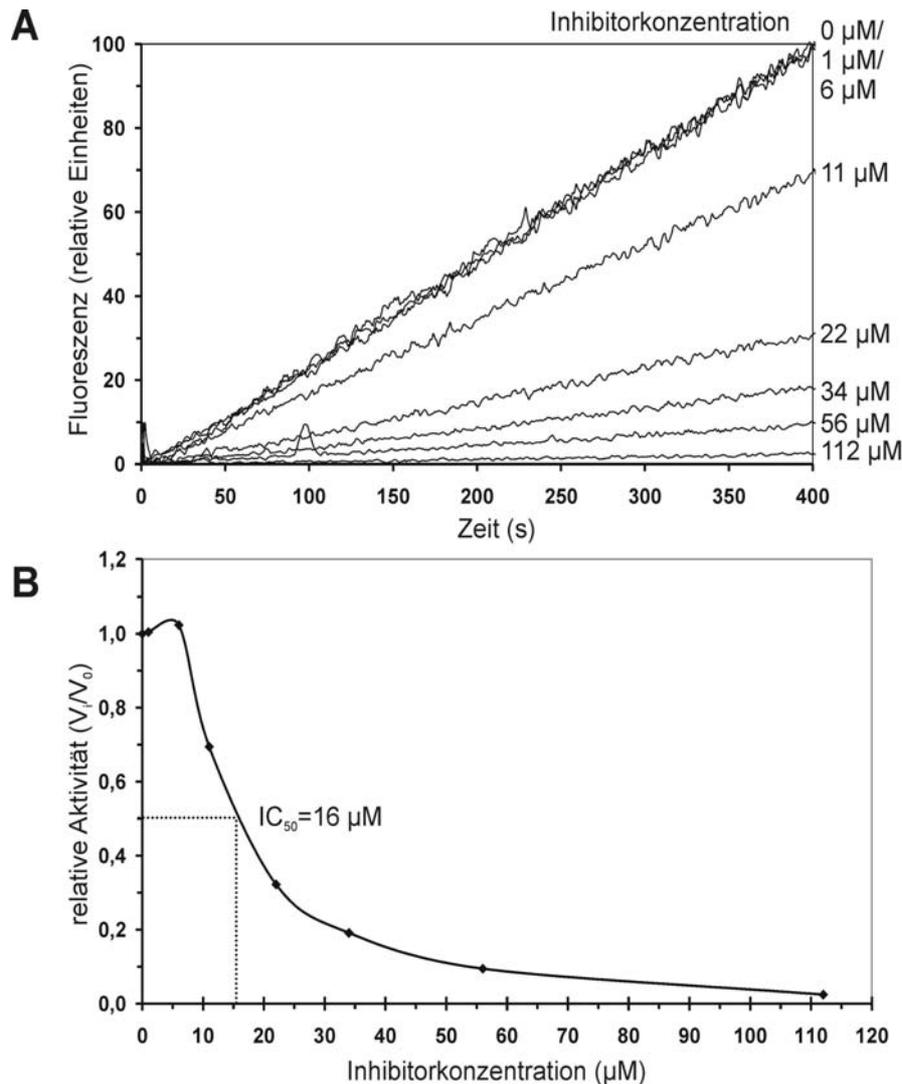


Abbildung 40: Bestimmung des IC_{50} -Wertes der Substanz A. In Abbildung A ist die Umsetzung des fluorogenen Substrats pERTKR-*amc* durch Furin bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (0 bis 112 μM) gezeigt. Erst ab einer Konzentration von 6 μM ist eine Hemmung zu erkennen. In Abbildung B ist die Inhibitorkonzentration gegen die relative Aktivität V_i/V_0 aufgetragen. Bei einer relativen Aktivität von 0,5, also dem IC_{50} -Wert beträgt die Inhibitorkonzentration ca. 16 μM .

In dem Programm Sybl (Tripos, 2000) wurde ein Modell für das strukturbestimmende Fragment der getesteten Substanzen erstellt und mögliche Orientierungen innerhalb des aktiven Zentrums der Furinstruktur am Bildschirm untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß das Fragment mit einer basischen Gruppe in die schmale S1-Tasche paßt und dort über

die umgebenden Reste koordiniert werden kann. Gleichzeitig kann es die S2-Tasche erreichen und weitere Wasserstoffbrücken bilden. Auf Grundlage dieser möglichen Orientierung in Verbindung mit den ermittelten K_i -Werten sowie dem Vergleich mit Kristallstrukturen ähnlicher Substrat-Inhibitor-Komplexe wurden Modifizierungsvorschläge erarbeitet. Gegenwärtig wird von Herrn Dr. Jörg Stürzebecher und Frau Dr. Andrea Schweinitz (Jena) die synthesechemische Umsetzung und die mögliche inhibitorische Wirkung auf Furin untersucht.

5.8 Modelling

Die Proproteinkonvertasen haben im Bereich der katalytischen und der P-Domäne eine hohe Übereinstimmung in ihrer Sequenz. Da sie zudem meist eine überlappende Substratspezifität besitzen, ist zu erwarten, daß auch ihr struktureller Aufbau in diesem Bereich sehr ähnlich ist. Unter dieser Annahme wurden basierend auf den Kristallstrukturen von Furin und Kex2 (Holyoak *et al.*, 2003) die weiteren Mitglieder der Proproteinkonvertasen modelliert. Vergleicht man die Sequenzen der katalytischen und der P-Domäne der verschiedenen PCs mit denen von Furin und Kex2, dann zeigen sich Sequenzidentitäten von 45,7 bis 64,7 % bzw. 36,9 bis 40,7 % (Tabelle 10). Aufgrund der höheren Ähnlichkeit der PCs zu Furin als zu Kex2 wurde überwiegend Furin als Vorlage verwendet. In Abbildung 42 sind die auf Furin basierenden strukturellkonservierten und variablen Bereiche gelb bzw. hellgrün und die auf Kex2 basierenden variablen Bereiche dunkelgrün hinterlegt. Kex2 wurde an keiner Stelle für die Definition strukturellkonservierter Bereiche hergenommen. Aminosäuren der Modelle, für die keine vergleichbare Vorlage vorhanden war, sind kursiv gedruckt. Die Sequenzangaben in der nachfolgenden Beschreibung der Proproteinmodelle beziehen sich normalerweise auf die äquivalente Sequenz in Furin und entsprechen der Numerierung in Abbildung 42.

	Furin	Kex2	PC1	PC2	PC4	PC5	PC7	PACE4
AS gesamt	470	477	484	482	470	485	474	484
AS kat Dom	337	341	347	351	337	349	342	348
AS PDom	133	136	137	131	133	136	132	136
Id gesamt zu Furin	470	185	260	246	303	283	215	279
Id gesamt zu Furin in %	100	39,4	55,3	52,3	64,7	60,2	45,7	59,4
Id kat Dom zu Furin	337	148	207	187	231	219	169	221
Id kat Dom zu Furin in %	100	43,9	61,4	55,5	68,5	65,0	50,1	65,6
Id PDom zu Furin	133	37	53	59	73	64	46	58
Id PDom zu Furin in %	100	27,8	39,8	44,4	54,9	48,1	34,6	43,6
Id gesamt zu Kex2	185	477	191	181	176	184	194	187
Id gesamt zu Kex2 in %	39,4	100	40,0	37,9	36,9	38,6	40,7	39,2
Id kat Dom zu Kex2	148	341	150	148	144	142	156	149
Id kat Dom zu Kex2 in %	43,9	100	44,0	43,4	42,2	41,6	45,7	43,7
Id PDom zu Kex2	37	136	41	33	32	42	38	38
Id PDom zu Kex2 in %	27,8	100	30,1	24,3	23,5	30,9	27,9	27,9

Tabelle 10: Die Tabelle gibt die Anzahl der Aminosäuren (AS) der katalytischen Domäne (kat Dom), der P-Domäne (PDom) sowie beider Domänen zusammen (gesamt) der verschiedenen Proproteinkonvertasen an. Zudem sind die Sequenzidentitäten (Id) der beiden Domänen bezüglich Furin und Kex2 als Anzahl der identischen Reste und in Prozent aufgelistet.

Die Bereiche, in denen Kex2 möglicherweise eine bessere Vorlage als Furin darstellt, sind zum Beispiel die N-Termini von PC2, PC5 und PACE4, die etwas länger als bei Furin sind und eventuell wie Kex2 eine zusätzliche Helix ausbilden. Weitere Bereiche liegen bei PC7 N-terminal von Helix $\text{Ca}1$ und zwischen $\text{P}\beta1a$ und $\text{P}\beta2$ sowie bei PC1 zwischen Helix $\text{Ca}6$ und Strang $\text{C}\beta11$. Generell läßt sich sagen, daß nicht nur der Kernbereich sondern auch die an der Oberfläche liegenden Schleifen eine bemerkenswerte sequentielle und strukturelle Ähnlichkeit besitzen (Abbildung 41). Große Ausnahmen finden sich bei mehreren Modellen am N-Terminus, zwischen der N-terminalen Schleife und der Helix $\text{Ca}1$, in der P-Domäne zwischen den Strängen $\text{P}\beta1a$ und $\text{P}\beta2$, $\text{P}\beta2$ und $\text{P}\beta3$ sowie zwischen $\text{P}\beta7$ und $\text{P}\beta8$. Unterschiede zu Furin, die nur einzelne Proproteinkonvertasen betreffen, sind z. B. die Insertion von zwei Resten bei PC2 zwischen $\text{C}\beta8$ und $\text{C}\beta9$, die Insertion von vier Resten bei PC7 innerhalb der β -Haarnadelschleife $\text{C}\beta9/\text{C}\beta10$, Insertionen von ein und zwei Resten bei PC1 bzw. PC2 zwischen $\text{Ca}6$ und $\text{C}\beta11$ sowie bei PC1 eine Insertion von zwei Resten C-terminal der Helix $\text{Ca}7$.

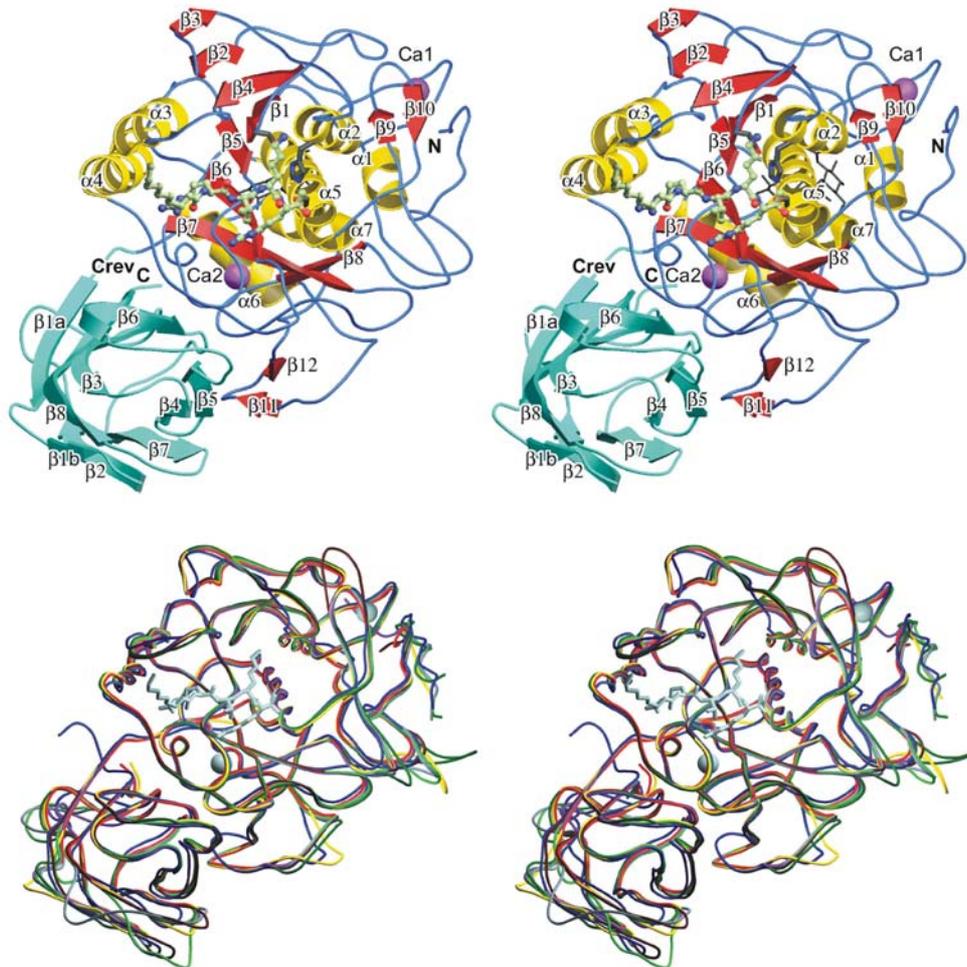


Abbildung 41: Der obere Teil der Abbildung entspricht der Abbildung 26, A mit der Bezeichnung der Stränge und Helices von Furin. Im unteren Teil sind die Hauptketten von Furin (rot), Kex2 (blau) und den modellierten Proproteinkonvertasen PC1 (gold), PC2 (dunkelgrün), PC4 (violett), PC5 (hellgrün), PC7 (braun) und PACE4 (grau) dargestellt. Die Kalziumionen Ca1 und Ca2 sind zusammen mit dem Inhibitor Dec-RVKR-CMK in grau gezeig.

In der katalytischen Domäne aller Proproteinkonvertasen sind die beiden Disulfidbrücken Cys211-Cys360 und Cys303-Cys333 konserviert. Bei PC5 und PACE4 befindet sich sehr wahrscheinlich innerhalb der N-terminal der Helix Ca1 liegenden Schleife eine weitere Disulfidbrücke zwischen den Resten Cys127 und Cys128 entsprechend der Sequenznumerierung von Furin. Diese Disulfidbrücke wurde bereits von Siezen und Leunissen (Siezen und Leunissen, 1997) auf Grundlage der Aminosäuresequenz vorhergesagt. Innerhalb der P-Domäne kommt es außer bei Kex2 und PC7 zu einer Quervernetzung durch die beiden Reste Cys450 und Cys474. Beim Modellieren von PC7 standen die Cysteine 508 und 538 so nahe zusammen, daß sie wahrscheinlich eine Disulfidbrücke ausbilden. Das Modell von PC7 wurde mit dieser Disulfidbrücke verfeinert. Interessanterweise besitzt nur PC7 bei Rest 508 ein Cystein, während bei den anderen PCs ein Serin konserviert ist.

Für den Bau der PC-Modelle wurden die Koordinaten der katalytischen Reste His194, Ser368, Asp153 und Asn295 (außer bei PC2, bei dem das Asparagin durch ein Aspartat ersetzt wurde), die Inhibitorreste P1 bis P4 sowie die beiden Kalziumionen Ca1 und Ca2 von der Furinstruktur übernommen. Bei der Verfeinerung in DISCOVER (Discover, 1994) wurden diese Atome fixiert, so daß ihre Lage nicht verändert wurde. Wie aufgrund der Konservierung der entsprechenden Reste zu erwarten war, zeigen alle sechs Modelle eine nahezu identische Koordinierung der beiden vorgegebenen Kalziumionen Ca1 und Ca2. Selbst für die Kalziumbindestelle Ca3 vom Kex2 liegt eine vergleichbare Konformation bei Furin und den PC-Modellen vor.

Die meisten potentiellen N-glykosidischen Zuckerstellen der PCs unterscheiden sich von den experimentell bestimmten Stellen bei Furin und Kex2 (Tabelle 11). Nur PC1 (Asn387) und PC7 (Asn141) besitzen entsprechende potentielle Zuckerbindestellen wie bei Furin bzw. Kex2. Auch die anderen, basierend auf die Sequenz vorhergesagten Bindestellen liegen weitgehend an der Proteinoberfläche, so daß eine Verknüpfung mit Zuckerresten prinzipiell möglich ist.

Furin								387	440				
Kex2		141						387		461			
PC1			159					387					
PC2						359						494	504
PC4													
PC5					207		363					470	
PC7	133	141		166	207							470	
PACE4					207								

Tabelle 11: N-glykosidische verknüpfte Zucker. Angegeben sind die bei Furin und Kex2 experimentell bestimmten Zucker (fett gedruckt) sowie die potentiellen Glykosylierungsstellen bei den anderen Proproteinkonvertasen. Die Sequenzangaben geben die Position der Asparagine entsprechend der Numerierung bei Furin an.

Von besonderem Interesse für die unterschiedliche Substratspezifität der Proproteinkonvertasen ist die Form des aktiven Zentrums sowie die Ladungsverteilung in dem Bereich. Hierbei zeigen die Proproteinkonvertasen bemerkenswerte Ähnlichkeiten, die in Verbindung mit der Substratspezifität in Kapitel 6.3.4 diskutiert werden.

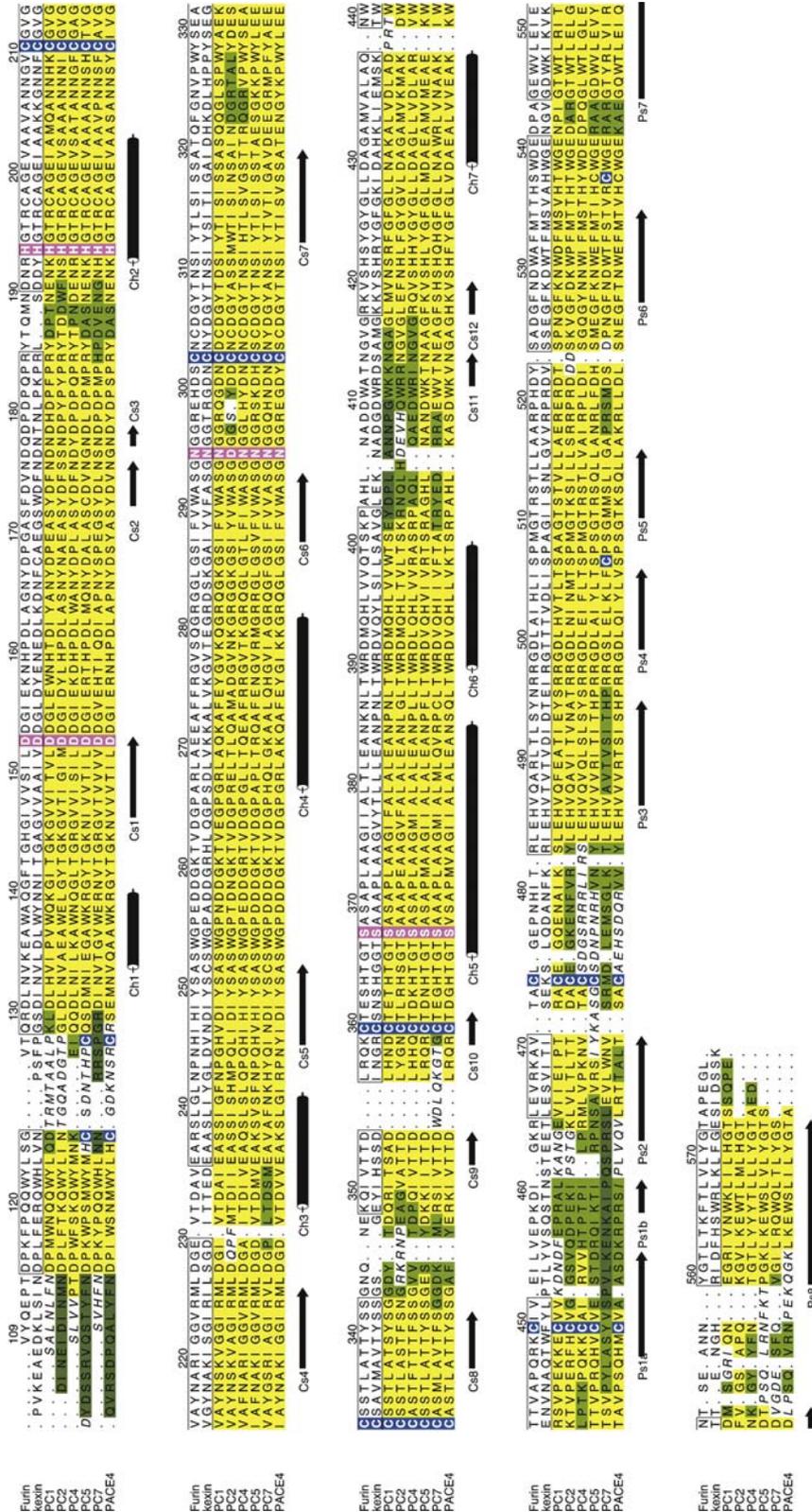


Abbildung 42: Sequenzvergleich der Ektodomäne der Proproteinkonvertasen. Es sind nur die Sequenzbereiche dargestellt, die entweder in den beiden Kristallstrukturen von Furin (PDB-Code: 1P8J) und Kex2 (PDB-Code: 1OT5) definiert waren oder für die eine Struktur modelliert wurde (PC1: sp|P29120|NEC1_HUMAN, PC2: sp|P16519|NEC2_HUMAN, PC4: tr|Q62094|PCK4_MOUSE, PC5: sp|Q2824|PCK5_HUMAN, PC7: sp|Q16549|PCK7_HUMAN, PACE4: sp|P29122|PAC4_HUMAN). Die Sequenznummern beziehen sich auf Furin. Strukturell konservierte Bereiche zwischen Furin und Kex2 sind mit einem Kasten umgeben. Die Sekundärstrukturelemente unter den Sequenzen entsprechen denen von Furin. Die Reste der katalytischen Triade sind rot und (potentielle) Cysteine aus Disulfidbrücken blau hinterlegt. Gelb markierte Bereiche sind auf Furin basierende strukturell konservierte Bereiche (SCRs). Hellgrün und dunkelgrün sind die Sequenzen gekennzeichnet, die als variable Regionen auf der Grundlage von Furin bzw. Kex2 modelliert wurden. Für die kursivgedruckten Sequenzen konnte keine Kristallstruktur als Vorlage verwendet werden. Die Abbildung wurde mit ALSRIPT (Barton 1993) erstellt.

6 Diskussion

Mit der Kristallisation und der Röntgenstrukturanalyse der löslichen Ektodomäne von Furin gelang es erstmals, die Struktur der katalytischen und der P-Domäne einer Propeptidase aufzuklären. Furin gehört zu den kalziumabhängigen subtilisin-ähnlichen Serinproteasen und zeigt innerhalb der katalytischen Domäne Ähnlichkeiten zu den strukturell bekannten Proteasen Subtilisin, Thermitase und Proteinase K (Abbildung 43). Aufgrund der Homologie wurde schon früh versucht, ein Furinmodell, basierend auf Subtilisin und Thermitase, zu erstellen (Siezen *et al.*, 1994). Man konnte zwar an Hand der modellierten Struktur einige Vorhersagen machen, doch erst mit Aufklärung der Kristallstrukturen von Furin und der zeitgleich publizierten Kristallstruktur von Kex2 aus Hefe (PDB-Code: 1OT5; (Holyoak *et al.*, 2003)) war es möglich, die hohe Substratspezifität der Propeptidasen zu erklären.

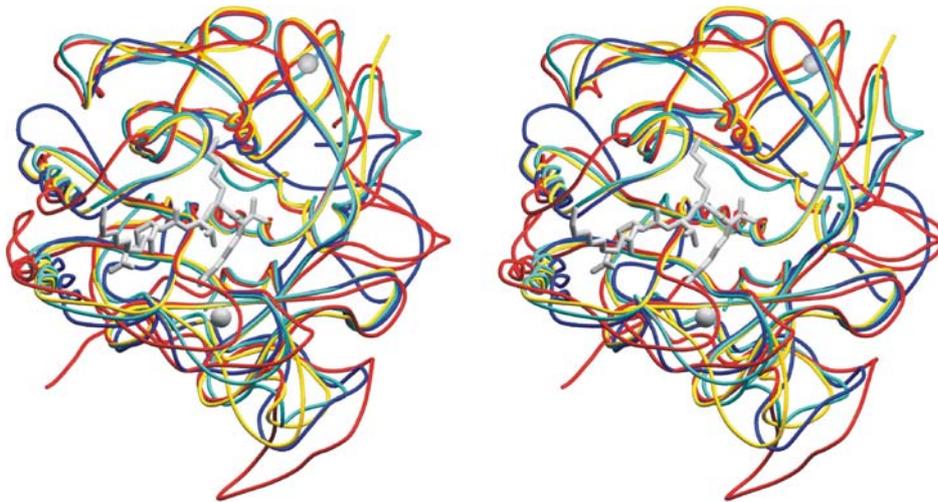


Abbildung 43: Überlagerung der Hauptketten von Furin (rot) mit Subtilisin Carlsberg (gold; PDB-Code: 1CSE), Thermitase (dunkelblau; PDB-Code: 1IC6) und Proteinase K (hellblau; PDB-Code: 1TEC). Der Inhibitor und die Kalziumionen von Furin sind in hellgrau dargestellt.

6.1 Kristallisation und Strukturlösung

Bei der Überlagerung der Hauptketten der katalytischen Domäne des Furins mit verschiedenen Subtilasen erkennt man, daß der grobe Aufbau zwar gleich ist, aber in einigen Bereichen doch deutliche Abweichungen vorhanden sind. Diese Unterschiede, zusammen mit dem Fehlen einer Kristallstruktur für die P-Domäne, machten es unmöglich, den Phasenwinkel der Strukturaktoren mit Hilfe des molekularen Ersatzes zu bestimmen. So konnte bereits innerhalb der ersten Monate nach Reinigung des Proteins dieses in einer triklinen Raumgruppe kristallisiert und ein nativer Datensatz aufgenommen werden, es gelang

aber erst mit einer weiteren, hexagonalen Kristallform, das Phasenproblem zu lösen. Die Zugabe von 1,5-Pentandiol zum Kristallisationsansatz führte bei den Kristallen zur Änderung der Raumgruppe von P1 nach P6₅. In beiden Fällen enthielt die asymmetrische Einheit acht Furinmoleküle, jedoch stieg der Lösungsmittelanteil von 52,4 auf 61,8 % und die Zahl der Kontakte zwischen den Molekülen sank von 44 auf 30. Die wenigen Kontakte erklären auch die hohe Mosaizität der hexagonalen Kristallform. Mit Hilfe des Free-Mounting-Systems (Kiefersauer *et al.*, 2000) konnte eine Kristalltransformation durchgeführt und eine Verringerung der Mosaizität erreicht werden. Während der Transformation wurde die relative Feuchte konstant gehalten und die Temperatur des Hüllstroms nicht verändert, dennoch war eine Größenänderung der Elementarzelle zu beobachten. Vermutlich sorgte die vergleichsweise geringe relative Feuchte von 81 % während der Transformation im Gegensatz zur am Reservoirpuffer ermittelten Startfeuchte von 86 % für eine langsame Austrocknung des Kristalls und damit zur Schrumpfung der Elementarzelle. Die Übersichtung mit Perfluoropolyether veränderte möglicherweise die Kinetik des Feuchtigkeitsaustausches dahingehend, daß der Austrocknungsprozeß nur sehr langsam erfolgte und rechtzeitig durch Kühlen auf 100 K beendet werden konnte. Die Austrocknung des Kristalls war nicht reversibel und konnte durch eine Erhöhung der Umgebungsfeuchte nicht rückgängig gemacht werden. Die Größenänderung bewirkte sehr wahrscheinlich eine Ausbildung von weiteren Kontakten zwischen den Molekülen, die damit zu einer höheren Ordnung bzw. zu einer verringerten Mosaizität im Kristall führten.

Bedingt durch eine große Elementarzelle mit einer langen c-Achse von über 470 Å gestaltete sich die Datenaufnahme bei den hexagonalen Kristallen schwierig. Erst ein großer Kristall-Detektor-Abstand in Verbindung mit dem seitlichen Auslenken des Detektors zur Vergrößerung der effektiven Detektorfläche ermöglichte die Aufzeichnung von Reflexen bis zur maximalen Auflösung von 2,7 Å. Die initiale Phaseninformation wurde über ein MAD-Experiment an einem Ta₆Br₁₂²⁺-Derivat bestimmt und durch Dichtemodifikation auf den kompletten Auflösungsbereich ausgedehnt. Die hohe nicht-kristallographische Symmetrie führte zu einer guten Qualität der Elektronendichtekarte, mit der ein erstes Strukturmodell gebaut werden konnte. Da die Auflösung bei der triklinen Kristallform mit 2,6 Å etwas besser als bei der hexagonalen Form war, wurde mit Hilfe des molekularen Ersatzes das Modell in der triklinen Raumgruppe orientiert und dort weiter verfeinert.

6.2 Konstruktlänge

In der Elektronendichtekarte beider Raumgruppen waren nur 470 (Val109-Leu578) der 604 (Asp108-His711) klonierten Reste der Ektodomäne definiert. Biochemische Untersuchungen bestätigten, daß es sich um ein gekürztes Konstrukt handelt, bei dem der C-Terminus wahrscheinlich zwischen Rest 580 und 600 liegt und nicht wie von der Klonierung her zu erwarten bei His711. Das genau Kettenende konnte nicht bestimmt werden, da das nach einem Verdau mit Ameisesäuren entstandene Fragment (Pro543-Asp669) für eine massenspektrometrische Untersuchung zu groß war. In der SDS-PAGE und der Größenausschlußchromatographie (Cameron *et al.*, 2000) konnte bereits unmittelbar nach der Reinigung eine einheitliche Proteingröße gefunden werden. Später entstehende kleinere Proteingrößen konnten nicht beobachtet werden, so daß eine mögliche proteolytische Spaltung innerhalb der Cysteinreiche-Domäne bereits im Medium erfolgt sein muß. In mehreren Arbeiten wurde von einer löslichen Furinform, der die Transmembrandomäne fehlt, berichtet (Denault *et al.*, 2002; Plaimauer *et al.*, 2001; Vey *et al.*, 1994). Durch Mutationsversuche konnte gezeigt werden, daß bei humanem Furin, exprimiert in HEK-293 Zellen, eine Spaltung C-terminal nach Ser682 erfolgt (Plaimauer *et al.*, 2001). Vergleicht man die davorliegende Sequenz Pro670-Ser682 mit dem vermuteten C-Terminus des in dieser Arbeit verwendeten Furinkonstrukts, so kann man eine gewisse Homologie zum Bereich Pro581-Ser593 erkennen (Abbildung 44). Ob in diesem Bereich eine Spaltung nach Ser593 erfolgt und welche Protease daran beteiligt sein könnte, ist vollkommen unklar. Hier könnten Mutationsversuche Klarheit schaffen.

		581		593	
Maus	GTAPEGLST	PP	ESSGCKTLT	SS	QACVVCE
Mensch	GTAPEGLPV	PP	ESSGCKTLT	SS	QACVVCE
		670		682	
Maus	SCPSHASLD	P	VEQTC	SRQS	SS RESRPQQ
Mensch	SCPSHASLD	P	VEQTC	SRQS	SS RESPPQQ
				↑	

Abbildung 44: Sequenzvergleich zwischen der Spaltstelle nach Ser682 innerhalb der Cysteinreiche-Domäne von humanem Furin (Plaimauer 2001) und dem postulierten C-Terminus bei Ser593 von in CHO-Zellen exprimiertem Furin der Maus. Ähnliche Reste in beiden Bereichen sind fett gedruckt.

6.3 Aktives Zentrum

6.3.1 Vergleich des aktiven Zentrums von Subtilisin und Furin

Die Proproteinkonvertasen bilden innerhalb der Subtilasen eine eigene Gruppe (Siezen und Leunissen, 1997) und unterscheiden sich besonders durch ihre hohe Substratspezifität für dibasische Aminosäuren von den anderen, meist unspezifisch spaltenden Subtilasen. Wie bereits in Abbildung 43 gezeigt wurde, besitzen die katalytischen Domänen von Furin und

Subtilisin grob den gleichen Aufbau, doch bei näherer Betrachtung kann man besonders im Bereich des aktiven Zentrums deutliche Unterschiede erkennen (Abbildung 45). Während Subtilisin Carlsberg mit seinem Inhibitor Eglin c (Bode *et al.*, 1987) ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt ausbildet, sind die Hauptketteninteraktionen zwischen Furin und Inhibitor mit drei Wasserstoffbrücken (Gly255-O/Val-P3-N, Gly255-N/Val-P3-O und Ser253-O/Arg-P1-N) recht schwach. Bei Furin verläuft die Hauptkette im Bereich Leu227-Thr232 viel weiter entfernt vom Substrat als der entsprechende Bereich des Subtilisins, so daß keine weiteren Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können.

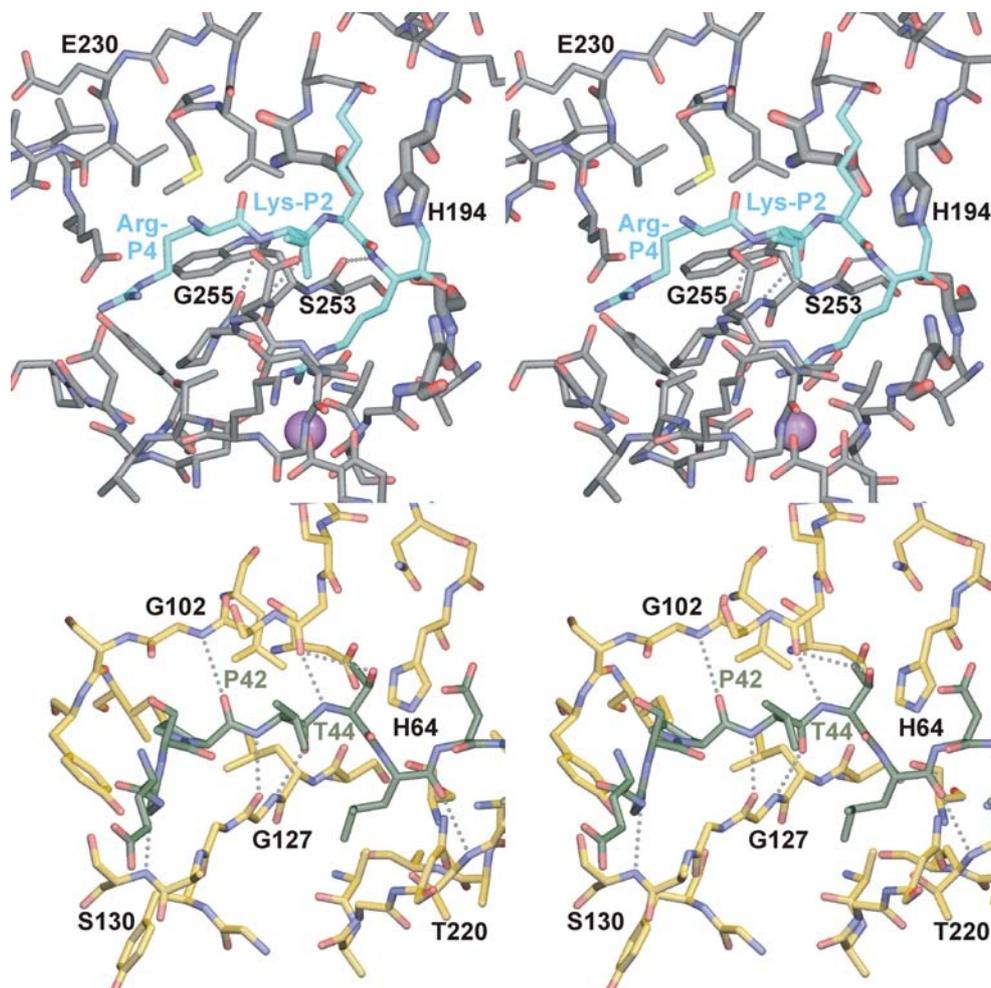


Abbildung 45: Stereoabbildung des aktiven Zentrums von Furin (oben) und Subtilisin Carlsberg (unten; PDB-Code: 1CSE) in Verbindung mit den Inhibitoren Dec-RVKR-CMK (Dekanoylteil nicht abgebildet) bzw. Eglin c. Bei Furin (grau) kann die Hauptkette des Inhibitors (hellblau) nur über drei Wasserstoffbrücken binden und ein zweisträngiges antiparalleles Faltblatt bilden. Da der Bereich Leu96-Ser103 (Furin: Leu 227-Thr232) bei Subtilisin (gold) näher am Substrat (grün) langläuft, kommt es zur Ausbildung eines dreisträngigem antiparallelen β -Faltblatts mit acht Wasserstoffbrücken. Die Wasserstoffbrücken sind als gepunktete Linien und das Kalzium am Boden der S1-Tasche von Furin als violetter Ball dargestellt.

In beiden Fällen wird die S1-Tasche auf einer Seite von dem Eingangsrahmen begrenzt (Furin: Ser253-Asp258, Subtilisin: Ser125-Ser130; vgl. Abbildung 30), doch bei Furin ist sie zu einer engen Tasche geformt, in der nur Arginin geeignete Seitenkettenkontakte ausbilden

kann. Um ein Substratmolekül für eine proteolytische Spaltung richtig zu binden, müssen wahrscheinlich die schwachen Hautketteninteraktionen zum Furin durch Bindung der Seitenketten kompensiert werden. Hierbei kommt besonders dem Arg-P1 besondere Bedeutung zu, so daß Furin wie auch die anderen Propeptidkonvertasen normalerweise nur nach Arginin spalten (Jean *et al.*, 1995; Nakayama, 1997; Rockwell und Fuller, 2002; Rockwell *et al.*, 2002). Es wurde berichtet, daß prinzipiell eine Spaltung nach Lysin möglich ist, dann aber die schlechte Substratbindung durch weitere N-terminal liegende basische Reste kompensiert werden muß (Krysan *et al.*, 1999; Rockwell *et al.*, 1997).

6.3.2 Vergleich der aktiven Zentren von Furin und Kex2

Die beiden einzigen kristallisierten Propeptidkonvertasen Furin und Kex2 zeigen innerhalb der katalytischen und der P-Domäne eine bemerkenswerte Ähnlichkeit und unterscheiden sich im wesentlichen nur in einigen Schleifenbereichen der Oberfläche. Es wurde dennoch nachgewiesen, daß sie verschiedene Substratspezifitäten besitzen. Furin schneidet bevorzugt nach Arg-X-Lys/Arg-Arg, aber auch das Sequenzmotiv Arg-X-X-Arg ist ausreichend. Furin hat somit neben dem essentiellen Arg-P1 eine Vorliebe für Arg-P4 (Duckert *et al.*, 2004; Krysan *et al.*, 1999; Lazure *et al.*, 1998; Rockwell und Fuller, 2002; Rockwell *et al.*, 2002). Weitere Arginine, z. B. an P6, erhöhen die Substratbindung (Krysan *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1992). Bei Kex2 scheint hingegen statt dem Arg-P4 ein Lys-P2 besonders wichtig zu sein (Bevan *et al.*, 1998; Krysan *et al.*, 1999; Rockwell *et al.*, 2002; Rockwell *et al.*, 1997). Da bei der Kristallisation von Furin der tetrapeptidische Inhibitor Dec-Arg-Val-Lys-Arg-CMK verwendet wurde, kann für die Substratbindetaschen S1 bis S4 bzw. für die Reste P1 bis P4 eine genaue Protein-Inhibitor-Interaktion beschrieben werden. In der ersten veröffentlichten Kristallstruktur von Kex2 (PDB-Code: 1OT5; (Holyoak *et al.*, 2003)) war dies nicht möglich, da dort ein tripeptidischer Inhibitor verwendet wurde. Erst mit einer Co-Kristallisation mit dem Inhibitor Ac-Arg-Glu-Lys-boroArg (PDB-Code: 1R64; (Holyoak *et al.*, 2004)) ist ein strukturbasierter Vergleich von S1 bis S4 bzw. P1 bis P4 zwischen Furin und Kex2 möglich (Abbildung 46).

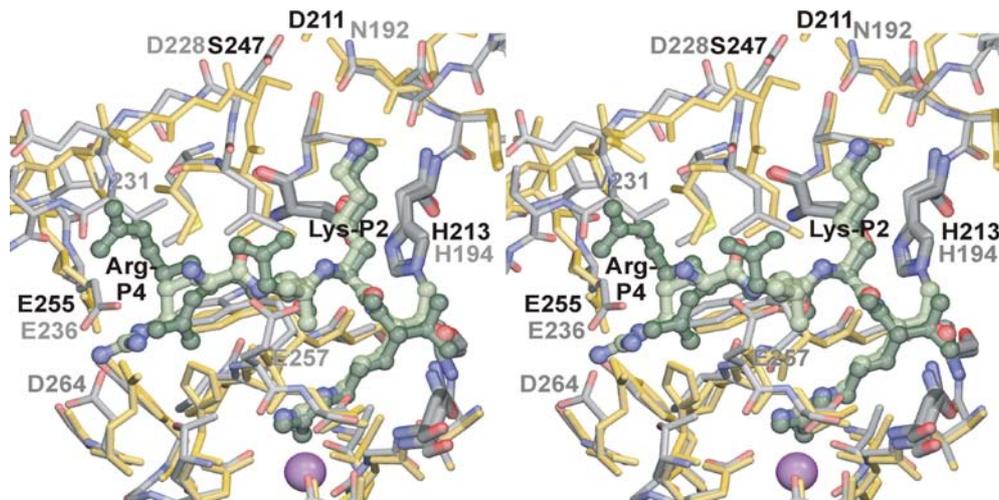


Abbildung 46: Stereoabbildung der Überlagerung des aktiven Zentrums von Furin (PDB-Code: 1P8J) mit dem von Kex2 (PDB-Code: 1R64; (Holyoak *et al.*, 2004)). Die, die Inhibitoren umgebenden Reste von Furin (Kohlenstoff grau, Stickstoff blau, Sauerstoff rot, Schwefel gelb) und Kex2 (gold) sind als Stäbchen und die Inhibitoren in Hellgrün bzw. Dunkelgrün als Ball und Stäbchen dargestellt. Die Bindungen der aktiven Reste His, Asp, Ser und Asn sind bei beiden Enzymen dicker gezeichnet. Bei dem Furininhibitor ist nicht der Dekanoylteil abgebildet. Es ist deutlich eine unterschiedliche Lage des Arg-P4, wie auch Unterschiede in der S2- und S4-Tasche zu erkennen, was zu verschiedenen Substratspezifitäten beider Enzyme führt.

Sowohl Furin als auch Kex2 besitzen eine spezifisch für Arginin geformte S1-Tasche mit einer Kalziumbindestelle Ca²⁺ am Boden der Tasche. Das Arg-P1 und die aktiven Reste His194, Asp153, Ser368 und Asn295 (Kex2: His213, Asp175, Ser385, Asn314) sind strukturell hochkonserviert und weichen nur wenig von einander ab. Das Lys-P2 ist in beiden Strukturen nahezu identisch angeordnet, doch gibt es Unterschiede in der Form der S2-Taschen (Abbildung 47). Das Nε von Lys-P2 bildet zum einen eine Wasserstoffbrücke zum Carboxylatsauerstoff von Asp154 (Kex2: Asp176) und zum anderen zum Carbonylsauerstoff von Asp191 (Kex2: Asp210). Bei Furin existiert zudem eine weitere Bindung zum Carboxamid von Asn192 (Kex2: Asp211), dessen Ausbildung beim Kex2 nicht direkt, sondern nur über ein Wassermolekül (in Abbildung 47 nicht dargestellt) möglich ist. Hingegen kann bei Kex2 die Seitenkette Asp210 über ein Wasser das Lys-Nε koordinieren, was bei Furin nicht gelingt, da die Seitenkette Asp191 vom Lys wegzeigt. Diese strukturellen Unterschiede führen zu einer veränderten Bindungsstärke zum Lys-P2 und basieren weniger auf die Substitution von Asparagin (bei Furin) durch Aspartat (bei Kex2), als vielmehr auf eine Deletion bei Kex2, die äquivalent der Furinreste Thr187 bis Met189 ist (vgl. Abbildung 42). Diese Deletion findet sich nur bei Kex2, nicht aber bei den Proproteinkonvertasen der Säugetiere, so daß wahrscheinlich bei PC1, PC2, PC4, PC5, PC7 und PACE4 die Bedeutung der Präferenz für Lysin an P2 eher dem Furin als dem Kex2 ähnelt.

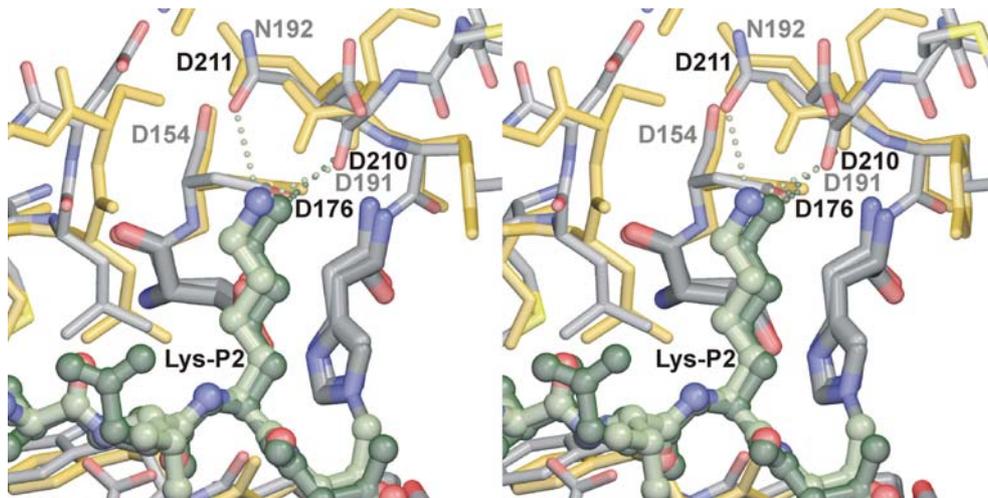


Abbildung 47: Überlagerung der Substratspezifitätstasche S2 von Furin und Kex2. Obwohl in beiden Strukturen das Lys-P2 sehr ähnlich liegt, gibt es strukturelle Unterschiede im Bereich Asp191 und Asn192 (in Kex2: Asp210 und Asp211), die zu einer Änderung in der Bildung von Wasserstoffbrücken führt. Die Farben entsprechen denen aus Abbildung 46.

Da bei S3 keine eigentliche Bindungstasche vorliegt und die an dieser Stelle kristallisierten Inhibitorreste Val-P3 (Furin) und Glu-P3 (Kex2) von der Enzymoberfläche wegzeigen, findet dort keine besondere Substraterkennung statt.

Ganz im Gegensatz zu P1 und P2 zeigt Arg-P4 bei Furin eine völlig andere Konformation als bei Kex2. Während die Arg-Seitenkette in der Furinstruktur in Richtung Süden zeigt und $N\delta$ durch Glu236 bzw. die beiden $N\zeta$ durch Asp264 und Tyr308 koordiniert werden, geht die Seitenkette bei Kex2 nach Norden und bildet nur über die beiden $N\zeta$ Wasserstoffbrücken zu Glu255 und Ile250 (Abbildung 48). Durch die Interaktion sowohl mit dem $N\delta$ als auch mit den terminalen Stickstoffatomen $N\zeta$ und ihrer positiven Ladung kann Furin, nicht aber Kex2 zwischen Lysin und Arginin unterscheiden, was auch durch verschiedene Inhibitorstudien gezeigt werden konnte (Duguay *et al.*, 1997; Jean *et al.*, 1995).

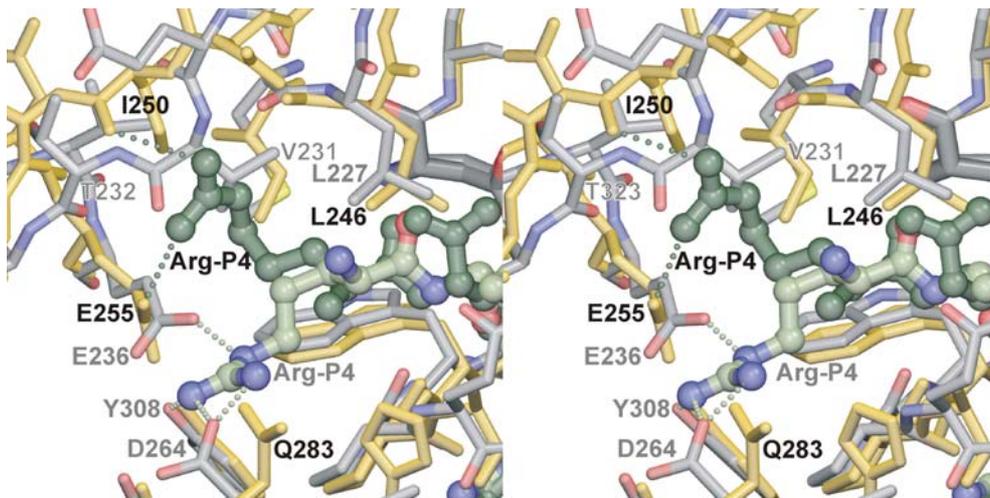


Abbildung 48: Überlagerung der Substratspezifitätstasche S4 von Furin und Kex2. Die Arg-P4-Seitenkette bildet bei Furin Wasserstoffbrücken zu Glu236, Asp265 und Tyr308 und bei Kex2 zu Glu255 und Ile250. Da Furin die beiden $N\zeta$ als auch das $N\delta$ bindet, kann es im Gegensatz zu Kex2 zwischen Arginin und Lysin unterscheiden.

6.3.3 Substratbindetaschen S5, S6, S1' und S2'

Durch Verwendung eines tetrapeptidischen Inhibitors für die Kristallisation von Furin kann nur für die Substratbindetaschen S1 bis S4 bzw. für die Reste P1 bis P4 eine genaue Protein-Inhibitor-Interaktion beschrieben werden. Für S5 und den folgenden Taschen, sowie für die Substratbindung bei S1' und den folgenden Taschen jenseits der Spaltstelle ist dies nicht möglich. An Hand des Subtilisin-Eglin-Substratkomplexes (PDB-Code: 1CSE, (Bode *et al.*, 1987)) und des Subtilisin BPN'-Komplexes (PDB-Code: 1SPB, (Gallagher *et al.*, 1995)) kann ungefähr die Lage von P5, P6, P1' und P2' modelliert werden (Abbildung 49). Bei einem solchen möglichen Modell mit dem Peptid Arg-Arg-Arg-Val-Lys-Arg-▼-Ser-Leu als Substrat verläuft die P5-Seitenkette entlang der Schleife C β 5/C α und wird durch Glu257 koordiniert. Die Seitenkette der Aminosäure an P6 kann entweder mit den an der Oberfläche liegenden Resten Glu230 und Asp233 oder bei einem kleinen P4-Rest mit der S4-Tasche interagieren. Bei P5 und P6 scheint die Bindung nicht über ausgeprägten Taschen wie bei P1, P2 und P4 zu erfolgen, sondern wie bei P3 über negative Oberflächenladungen. Dies erklärt, warum basische Reste in diesem Bereich bevorzugt, aber nicht essentiell erforderlich sind. (Cameron *et al.*, 2000; Krysan *et al.*, 1999; Lazure *et al.*, 1998).

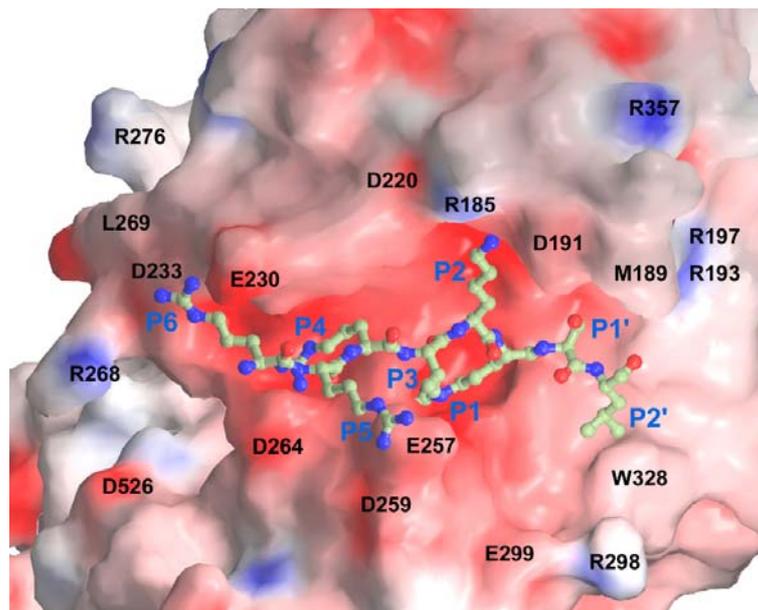


Abbildung 49: Ein Modell für die Substratinteraktion von P5, P6 und P1', P2'. Die Oberfläche stellt das aktive Zentrum von Furin zusammen mit einem Modell für das Substrat Arg-Arg-Arg-Val-Lys-Arg-Val-Ser-Leu dar. Die Reste P1 bis P4 basieren auf den Inhibitor Dec-RVCR-CMK der Furinstruktur und die weiteren Reste auf die experimentellen Inhibitoren Eglin c (Bode 1987) und dem Subtilisin-Prodromänen-Komplex (Gallagher 1995). Die Oberfläche wurde entsprechend der berechneten Potentiale angefärbt (rot: -27 e kT^{-1} , blau: 27 e kT^{-1}).

Der Bereich nach der Schnittstelle scheint nur bedingt notwendig für eine effektive Substratumsetzung zu sein, doch sind in natürlichen Substraten bei P1' die polar/ungeladenen und die negativ geladenen Aminosäuren Ser und Tyr bzw. Asp und Glu, aber auch der hydrophobe Rest Phe häufiger anzutreffen als andere. Die aliphatischen Reste Leu und Val fehlen hingegen genauso wie die basischen Reste Lys und Arg (Duckert *et al.*, 2004; Krysan *et al.*, 1999); so konnte beispielsweise eine Spaltung des Substrats mit einem Lysin an P2' beziehungsweise mit Val-P1'-Ala-P2' nicht beobachtet werden (Lazure *et al.*, 1998). Die positiven Ladungen der S1'-Tasche sind offenbar zur Bindung von polaren, ungeladenen oder negativgeladenen P1'-Seitenketten gut geeignet, während in S2' wahrscheinlich gut mittelgroße hydrophobe Seitenketten binden.

6.3.4 Vergleich des aktiven Zentrums der verschiedenen Propeptidkonvertasen auf Basis der homologen Modelle

Die Substratspezifitäten der Propeptidkonvertasen PC1, PC2, PC4, PC5, PC7 und PACE4 sind oftmals ähnlich der von Furin, so daß teilweise verschiedene Propeptidkonvertasen die gleichen Substrate umsetzen können. Untersucht man die Sequenz der Substrate im Schnittstellenbereich, dann kann man für die einzelnen PCs Unterschiede in der Vorliebe für bestimmte Sequenzen erkennen (Duckert *et al.*, 2004). Vergleicht man nun die aktiven Zentren von Furin und Kex2 mit denen der PC-Modelle, so findet man, daß dieser Bereich bei

den PCs mehr konserviert ist als andere an der Oberfläche liegenden Schleifen. Die nachfolgenden Sequenzangaben beziehen sich auf die äquivalenten Reste in Furin und entsprechen der Nummerierung in Abbildung 42. Auch wenn die Koordinaten der katalytischen Reste His194, Ser368, Asp153 und Asn295 (bzw. Asp295 bei PC2) von Furin verwendet und bei der Modellierung festgehalten wurden, sind z. B. der Verlauf des Eingangsrahmens Ser253-Trp254-Gly255-Pro256, der Beginn der Helix Ca5 mit Ser368 und die beiden Aspartate 153 und 154 vollständig konserviert. In anderen Bereichen des aktiven Zentrums, kann man aber auch deutliche Unterschiede zwischen Furin und den PC-Modellen finden (Tabelle 12, Abbildung 50).

	S6		S5		S4		S3	S2			S1		S1'		S2'	
	233	230	257	259	236	264	257	154	192	191	306	258	193	364	328	298
Furin	D	E	E	D	E	D	E	D	N	D	D	D	R	H	W	R
Kex2	D	A	E	D	E	D	E	D	N	E	D	D	R	H	W	L
PC1	D	D	D	D	E	D	D	D	N	E	D	D	K	H	W	R
PC2	D	D	D	D	E	D	D	D	N	E	D	D	K	H	W	R
PC4	D	I	N	D	E	E	N	D	N	E	D	D	K	H	W	R
PC5	D	P	T	N	E	D	T	D	N	F	D	D	S	H	L	(S)
PC7	D	P	D	D	E	D	D	D	N	G	D	D	H	H	F	Q
PACE4	T	D	A	D	E	Q	A	D	D	D	D	D	Y	H	P	T

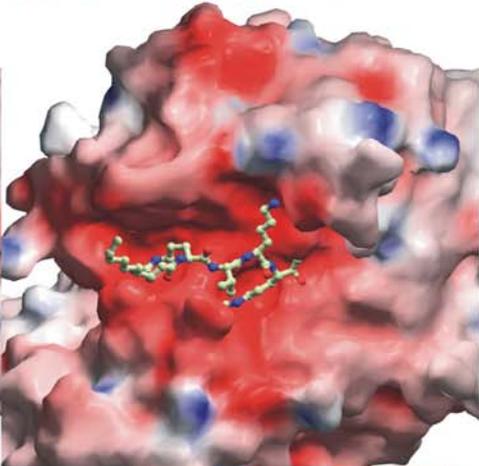
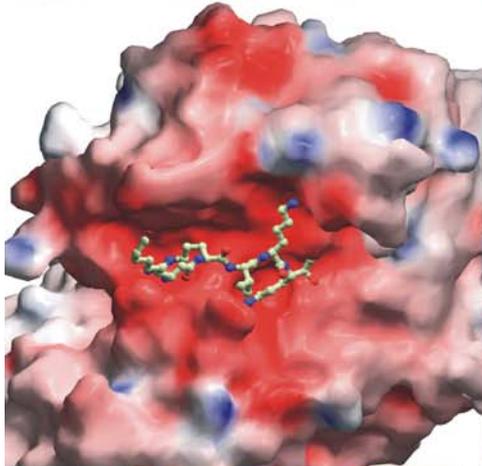
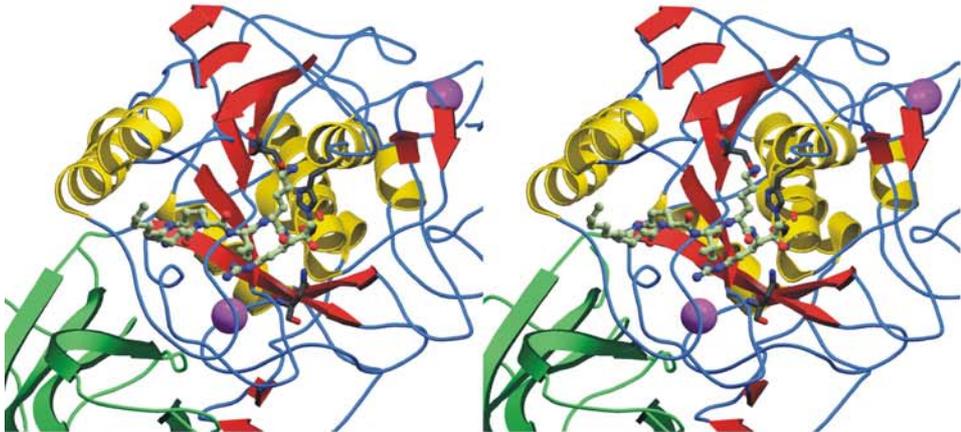
Tabelle 12: Ausgewählte Aminosäuren der einzelnen Substratbindetaschen, die an der Substratbindung beteiligt sind. Die Sequenznummern entsprechen der Furinsequenz.

Bei PC2 ist das bereits erwähnte Asn295 des Oxyanionlochs durch ein Asparagin ersetzt und im unteren Bereich der S2'-Tasche ist das Trp328 bei PC2 und PC7 gegen ein Leu bzw. Phe ausgetauscht. Weitere Unterschiede gibt es im Bereich der S2-Tasche, wo das Asp191, das nicht direkt an der Substratbindung beteiligt ist, bei PC1, PC4, PC5 und PACE4 durch Glu, bei PC7 durch Gly und bei PC2 durch Phe ersetzt ist. Bei PC2 sorgt dieser Austausch für eine Abschirmung des Lys-P2 vom Lösungsmittel. In der recht unspezifischen S3-Tasche werden mögliche basische P3-Reste bei PC5, PC7 und PACE4 nicht wie bei Furin durch Asp257 sondern durch Glu koordiniert, während bei PC1 und PC2 ein Asn bzw. ein Thr vorliegen. Bei PC2 sorgt eine Insertion von einem Rest in der Schleife C β 4/C α 3 zwischen Rest 230 und 231 dafür, daß die Schleife im oberen Bereich der S4-Tasche weiter raussteht als bei den anderen PCs. Ansonsten ist bei PC1 das Asp264 der S4-Tasche durch ein Glu ersetzt und ähnelt möglicherweise in seiner Konformation mehr dem Gln vom Kex2 als dem Asp von Furin. Innerhalb der S5-Tasche ist der Rest Asp259 außer bei PC2 konserviert, doch findet man statt Glu257 bei PC5, PC7 und PACE4 ein Asp sowie bei PC1 und PC2 ein Asn

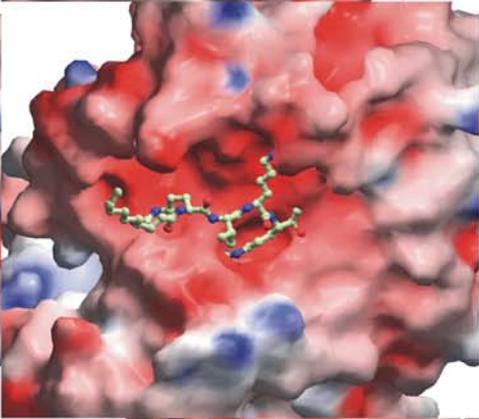
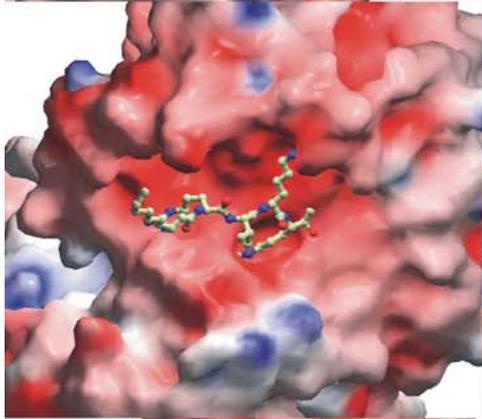
bzw. Thr. Die S6-Tasche unterscheidet sich bei Rest Glu230, wo bei Kex2, PC5 und PACE4 ein Asp und bei PC1, PC2, PC4 und PC7 die ungeladenen Reste Pro, Ile oder Ala vorhanden sind.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei allen Proproteinkonvertasen ein stark negativgeladenes aktives Zentrum vorliegt. Hierbei besitzt Furin die meisten sauren Reste gefolgt von PC4, PC5 und PACE4, wobei PC1, PC7 und Kex2 wiederum weniger saure Reste haben. Am wenigsten negative Ladungen innerhalb des aktiven Zentrums hat PC2. Generell ist das aktive Zentrum der Proproteinkonvertasen der Säugetiere dem des Furins ähnlicher als dem von Kex2. Das entspricht auch den Übereinstimmungen bzw. Unterschieden, wie sie in den anderen Bereichen der katalytischen Domäne sowie der P-Domäne gefunden werden konnten (vgl. Abbildung 42).

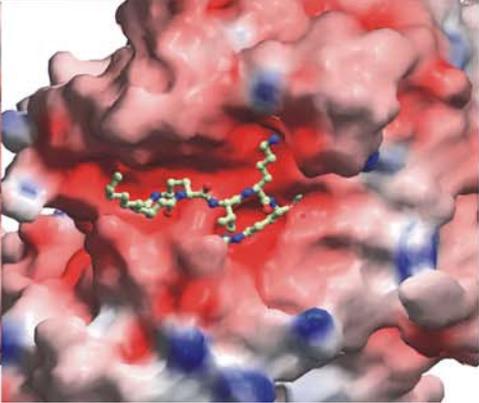
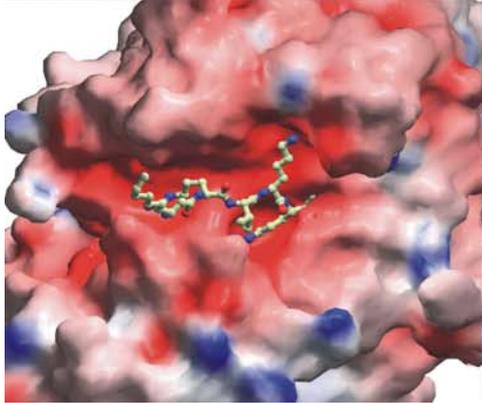
Abbildung 50 (die nächsten beiden Seiten): Es sind die Oberflächen der aktiven Zentren der verschiedenen Proproteinkonvertasen zusammen mit dem Inhibitor Dec-RVKR-CMK in stereo dargestellt. Die Oberflächen wurden entsprechend der berechneten Potentiale angefärbt (rot: -20 e kT^{-1} , blau: 20 e kT^{-1}). Zur besseren Orientierung ist Furin auch in der Bänder-Darstellung gezeigt (vgl. Abbildung 26).



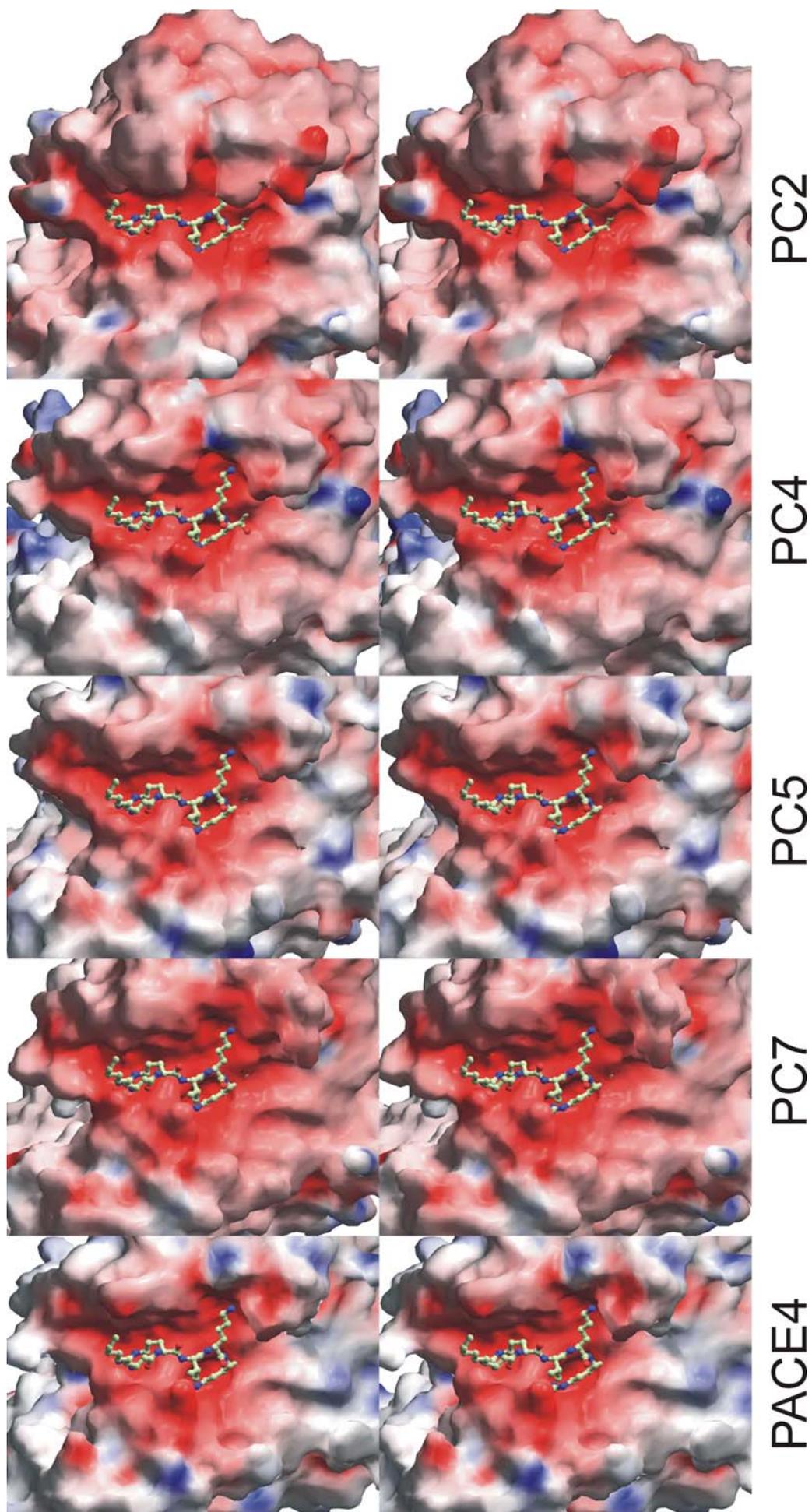
Furin



Kex2



PC1



6.4 Kalziumbindestelle

Bisher waren von den Kristallstrukturen der Subtilasen Subtilisin Carlsberg (PDB-Code: 1CSE; (Bode *et al.*, 1987)), Proteinase K (PDB-Code: 1IC6; Betzel 2001) und Thermitase (PDB-Code: 1TEC; Gros 1989) vier Kalziumbindestellen bekannt (Abbildung 51, Tabelle 13). Die Kalziumbindestelle Ca1 konnte außer bei der Thermitase in allen Strukturen gefunden werden und wurde für Subtilisin als eine starke Bindestelle beschrieben, die im Wildtyp-Subtilisin wichtig für die Aktivität und Stabilität ist (Alexander *et al.*, 2001a; Alexander *et al.*, 2001b; Pantoliano *et al.*, 1988). Durch Mutationen konnte allerdings gezeigt werden, daß ein Entfernen der Schleife 75 bis 83 zu nur geringen strukturellen Änderungen führt, bei der die volle Aktivität erhalten bleibt (Gallagher *et al.*, 1995; Strausberg *et al.*, 1995), wenngleich sich die Faltungsgeschwindigkeit und die Stabilität des Proteins ändert. Welchen Einfluß Kalzium Ca1 im Falle von Furin hat und ob man diese Bindestelle wie bei Subtilisin entfernen kann, müßte an Hand von Mutationsexperimenten geklärt werden.

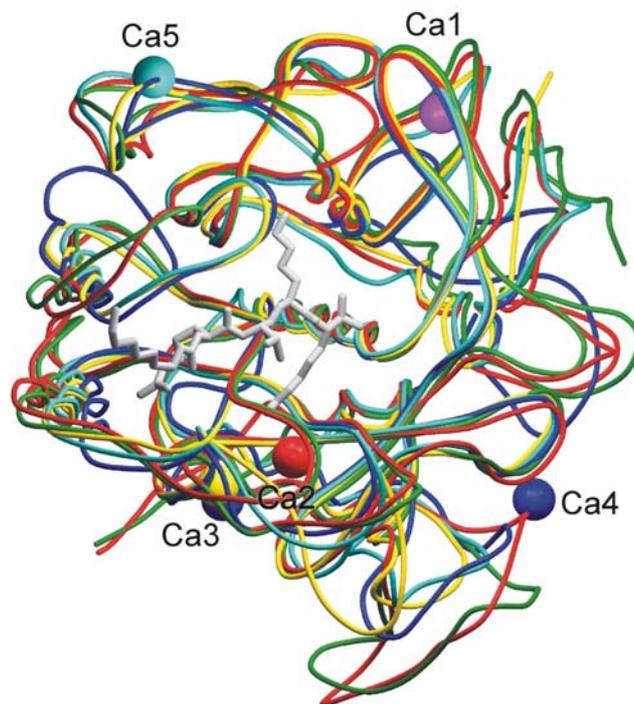


Abbildung 51: Überlagerung der Hauptketten von Furin (rot), Kex2 (grün), Subtilisin Carlsberg (gold), Thermitase (dunkelblau) und Proteinase K (hellblau). Die gebundenen Kalziumionen sind als Bälle dargestellt. Kalzium Ca1 (violett) konnte in allen außer der Thermitase und Kalzium Ca3 in Thermitase (dunkelblau), Subtilisin und Kex2 (gold) gefunden werden. Das Kalzium Ca2 (rot) ist nur bei den Proproteinkonvertasen Furin und Kex2 zu finden, wohingegen Ca4 (dunkelblau) nur bei Thermitase und Ca5 (hellblau) nur bei Proteinase K anzutreffen sind.

	Ca1	Ca2	Ca3	Ca4	Ca5
Furin	+	+	-	-	-
Kex2	+	+	+	-	-
Subtilisin	+	-	+	-	-
Proteinase K	+	-	-	-	+
Thermitase	-	-	+	+	-

Tabelle 13: Die bekannten Kalziumbindestellen der Subtilasen und deren Vorkommen in den einzelnen Enzymen.

Aufgrund von Kinetikstudien fand man heraus, daß Furin zwei Kalziumionen gebunden hat und daß es neben der ersten postulierten Bindestelle Ca1 eine weitere schwache Stelle geben muß. Eigentlich wurde diese für den Bereich Asp174-Gln188, vergleichbar der Bindungsstelle für Ca5 der Thermitase, erwartet (Siezen *et al.*, 1994), doch überraschenderweise fand sich stattdessen das Kalzium Ca2 am Boden der S1-Tasche. Da in der Kristallstruktur von Kex2 (Holyoak *et al.*, 2003) die Stelle auch mit einem Kalziumion besetzt ist, handelt es sich wahrscheinlich um eine Bindungsstelle, die nur in den Proprotein-konvertasen vorhanden ist. Vergleicht man die Kristallstrukturen von Furin und Subtilisin, so stellt man fest, daß Kalzium Ca2 in räumlicher Nähe zum Kalzium Ca401 liegt (Bode *et al.*, 1987). Der ganze Bereich zeichnet sich durch große strukturelle Unterschiede aus (Abbildung 52). Besonders stark weicht die Hauptkette des Furins in den Bereichen Pro256 bis Pro264 (Subtilisin: 128 bis 130) und Gly297 bis Tyr308 (Subtilisin: 157 bis 168) von der des Subtilisins ab. Während der Bereich 256-264 bei Furin deutlich länger als bei Subtilisin ist und sowohl einen Teil der S1-Tasche als auch die Ca2-Bindestelle bildet, ist der Bereich 297-308 (Subtilisin: 157-168) gleich lang. Bei Furin wird durch den zweiten Bereich zum einen die von der S1-Tasche wegweisende Seite des Kalziumions koordiniert und zum anderen Bindungen zur P-Domäne ausgebildet. Wäre bei Furin eine Schleife ähnlich der Schleife 157-168 von Subtilisin vorhanden, würde diese mit der P-Domäne kollidieren.

Die Funktion der Kalziumbindestelle Ca2 könnte darin liegen, daß hierüber das stark negativgeladene aktive Zentrum und besonders die S1-Tasche stabilisiert werden. Dadurch, daß auf der einen Seite des Kalziums das Asp258 auch zu Arg-P1 bindet und auf der anderen Seite das Asp301 in direkter Verbindung zum Arg519 der P-Domäne steht, kann ein Teil der Ladung auf die P-Domäne übertragen werden (vgl. Kapitel 6.5).

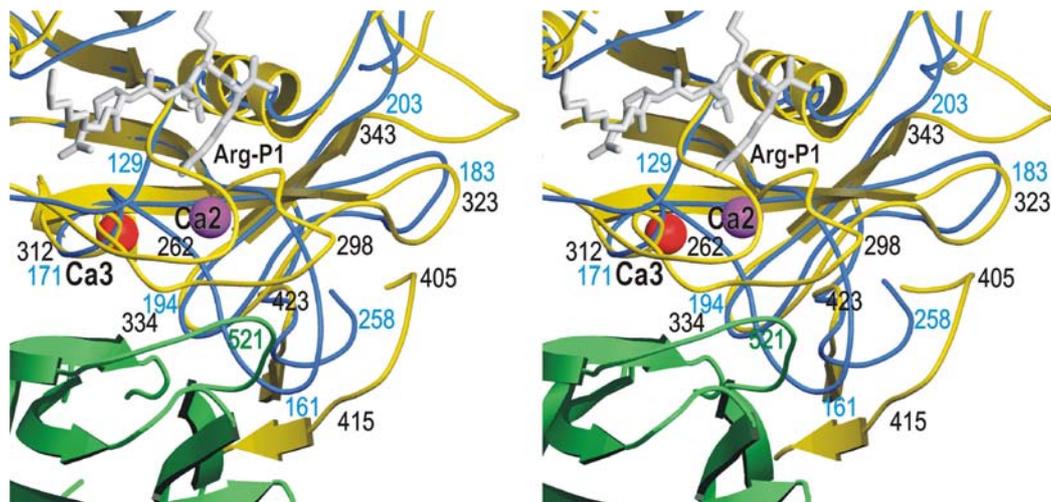


Abbildung 52: Überlagerung von Furin und Subtilisin im Bereich von Ca2 und Ca3. Die katalytische und die P-Domäne von Furin sind mit ihren Sekundärstrukturelementen in gelb bzw. grün und der Inhibitor in hellgrau dargestellt. Die Hauptkette von Subtilisin ist in blau gezeigt. Der violette Ball symbolisiert das von Furin gebundene Kalziumion Ca2 und der rote Ball das von Subtilisin gebundene Kalziumionen Ca3. Die blauen Zahlen entsprechen den Sequenznummern von Subtilisin und die schwarzen denen von Furin.

Die dritte Kalziumbindestelle Ca3 ist sowohl in Subtilisin als auch in Thermitase vorhanden, wobei beide in ihrer Position leicht voneinander abweichen. Auch für Kex2 wurde Ca3 beschrieben. In der Furinstruktur konnte allerdings zunächst nicht alleine aufgrund der Koordination und der Elektronendichtekarte entschieden werden, ob es sich an der Stelle um Kalzium, Wasser oder ein anderes Ion handelt. Erst die Röntgendiffraktionsmessungen an der K-Absorptionskante des Kalziums schloß eine Besetzung mit Kalzium und Kalium aus. Ob diese Stelle jedoch wie bei der Mutante von Subtilisin BPN' z. B. mit Natrium besetzt ist, konnte nicht bestimmt werden. So wurde über Versuche mit dem mutierten Subtilisin BPN' dieser Bereich als schwache Kalziumbindestelle beschrieben, die bei fehlendem Kalzium im Kristallisationspuffer auch durch Natrium besetzt werden kann (Gallagher *et al.*, 1995). Erhöht man die Kalziumkonzentration auf einen Bereich von 0,1 bis 100 mM, führt dies zu einem thermisch stabileren Subtilisin (Alexander *et al.*, 2001a; Pantoliano *et al.*, 1988). Da Furin und Kex2 im Bereich von Ca2 und Ca3 eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zeigen, überrascht es, daß in dem einen Fall die Kalziumbindestelle Ca3 nicht besetzt und im anderen Fall besetzt sein soll. Ob die Ursache für diesen Unterschied eine zu geringe Kalziumkonzentration im Kristallisationsansatz von Furin oder eine falsch bestimmte Besetzung bei Kex2 ist, läßt sich nur durch weitere Kristallisationsversuche bzw. durch Messungen der Kex2-Kristalle an der Kalziumabsorptionskante bestimmen.

6.5 Interaktionen zwischen der katalytischen und der P-Domäne

Von Fibronectin ist ein sogenanntes RGD-Zellbindemotiv bekannt, das an der Proteinoberfläche liegt und an den Fibronectinrezeptor bindet (Ruoslahti, 1988). Da ein solches Sequenzmotiv in den Proproteinkonvertasen der Säugetiere konserviert ist (Abbildung 53), und durch Mutationen gezeigt werden konnte, daß es wichtig für die richtige Herstellung von aktiver PC1 ist (Lusson *et al.*, 1997), hatte man für die Sequenz Arg498-Gly-Asp von Furin auch ein solches Zellbindemotiv postuliert.

	261	301	331	498	522	527
Furin	DDGKTV	HDS C	SEA C	RRGDL	RPHDY.	SADGF
kexin	DDGRHL	GDN C	SEGC	IRGTT	RPRDV.	SSEGF
PC1	DDGKTV	GDN C	AEK C	RRGDL	RERDT.	SPNGF
PC2	DNGKTV	YDD C	DE S	RRGDL	RPRDD	DSKVG
PC4	DDGRTV	YDN C	SEAC	RRGDL	RPLDI.	SGQGY
PC5	DDGKTV	KDH C	LEE C	RRGDL	RLF	DH.SMEGF
PC7	DDGKTV	NDN C	AEE C	RRGSL	RSMDS.	DPNGF
PACE4	DDGKTV	GDY C	LEE C	RRGDL	RLLDL.	SNEGF

Abbildung 53: Sequenzvergleich der Proproteinkonvertasen im Bereich des RGD-Motivs. Das RGD-Motiv ist gelb und die Cysteine der Disulfidbrücke zwischen Cys303 und Cys333 blau hinterlegt. Die Sequenznummern entsprechen denen von Furin.

Wie bei der Beschreibung der Kalziumbindestellen Ca₂ und Ca₃ herausgestellt, zeigen Furin und Subtilisin in diesem Bereich deutliche Unterschiede. Die entsprechenden Reste sind innerhalb der Proproteinkonvertasen hoch konserviert und führen zu ausgeprägten Interaktionen zwischen dem aktiven Zentrum und der P-Domäne. Hierbei kommt es durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Stabilisierung der stark negativ geladenen S1-Tasche. Die Aminosäure Asp258 ist ein Bindeglied zwischen Arg-P1 und dem Kalziumion Ca₂, das wiederum auf der anderen Seite durch Asp301 und Glu331 koordiniert wird. Die Schleifenbereiche C β 6/C β 7 und C β 7/C β 8 der beiden letztgenannten Reste sind über eine bei den Proproteinkonvertasen konservierte Disulfidbrücke (Cys303-Cys333) verbunden, was möglicherweise der Kalziumbindestelle eine zusätzliche Stabilität verleiht. Das Asp301 bildet mit der Seitenkette des Arg519 zwei Wasserstoffbrücken. Arg519 steht seinerseits über Asp522 in Verbindung mit Arg498, welches zu dem oben erwähnten postulierten RGD-Zellbindemotiv gehört (Lusson *et al.*, 1997). In Abbildung 54 erkennt man deutlich, daß dieser Sequenzbereich weder an der Oberfläche des gesamten Proteins, noch an der der P-Domäne liegt. Sofern es während der Proteinfaltung und -reifung nicht zu grundlegenden strukturellen Veränderungen kommt, bei denen die RGD-Sequenz für andere Proteine zugänglich wird, kann eine Zellbindefunktion ausgeschlossen werden. Das Arg498 vermag nicht nur mit Arg519, sondern auch mit den Carbonyl-Sauerstoffen von Lys261 und dem konservierten Gly527 Wasserstoffbrücken zu bilden. Mit der zentralen Rolle des Arg498 bei der Bindung zwischen der katalytischen und der P-Domäne kann auch möglicherweise erklärt

werden, daß in PC1 durchgeführte Mutationen im Bereich R-R498-GDL entweder zu erhöhtem Abbau von PC1 oder zu einer geringeren Aktivität führten (Lusson *et al.*, 1997).

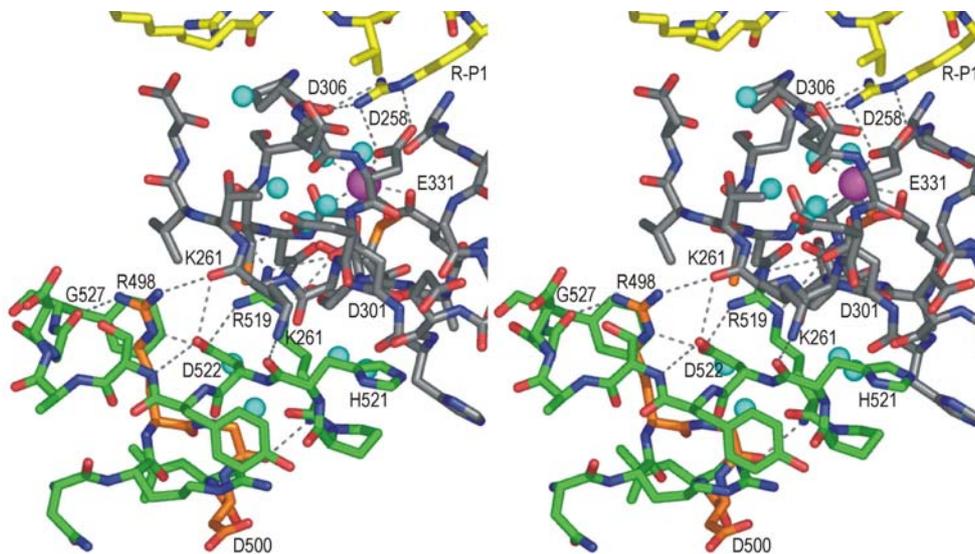


Abbildung 54: Die Stabilisierung des aktiven Zentrums erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen mit der P-Domäne. Das Asp258 von der katalytischen Domäne (graue Kohlenstoffatome) bindet sowohl das Arg-P1 (gelbe Kohlenstoffatome) als auch das Kalzium Ca² (violetter Ball). Das Kalzium wird auf der gegenüberliegenden Seite unter anderem durch Asp301 koordiniert, das wiederum über Arg519 und Asp522 in Verbindung zum konservierten Arg498 steht. Die Abbildung wurde mit Pymol (DeLano, 2002) erstellt.

Eine weitere wichtige Kontaktstelle zwischen der katalytischen und P-Domäne findet man im Bereich des Übergangs von der einen zur anderen Domäne (Abbildung 55, blaue Pfeile). Die bei den Proproteinkonvertasen der Säugetiere konservierten basischen Seitenketten von Arg391 und His395 interagieren mit den Carboxylat-Sauerstoffen von Glu485.

Auch wenn die katalytische Domäne und die P-Domäne von der Faltung her zwei eigenständige Domänen darstellen, so besitzen die zueinander benachbarten Domänen vielfältige Interaktionen, was auch der Grund dafür sein kann, daß bisher die katalytische Domäne nicht alleine exprimiert werden konnte (Creemers *et al.*, 1993; Hatsuzawa *et al.*, 1992a). Vergleicht man die Oberflächenladungsverteilung der katalytischen Domänen von Furin und Subtilisin im Bereich der Verbindungsfläche, dann sind besonders zwischen Furin und Subtilisin deutliche Unterschiede zu erkennen. Während bei Furin im wesentlichen nur die zwei obengenannten Bereiche (Abbildung 55, schwarze und blaue Pfeile) negative bzw. positive Ladungen aufweisen und der Rest überwiegend hydrophob ist, sind bei Subtilisin die geladenen Reste über den gesamten äquivalenten Bereich verteilt (Abbildung 56). Eine Funktion der P-Domäne könnte daher die Abschirmung der hydrophoben Oberflächenreste von dem umgebenden Lösungsmittel sein.

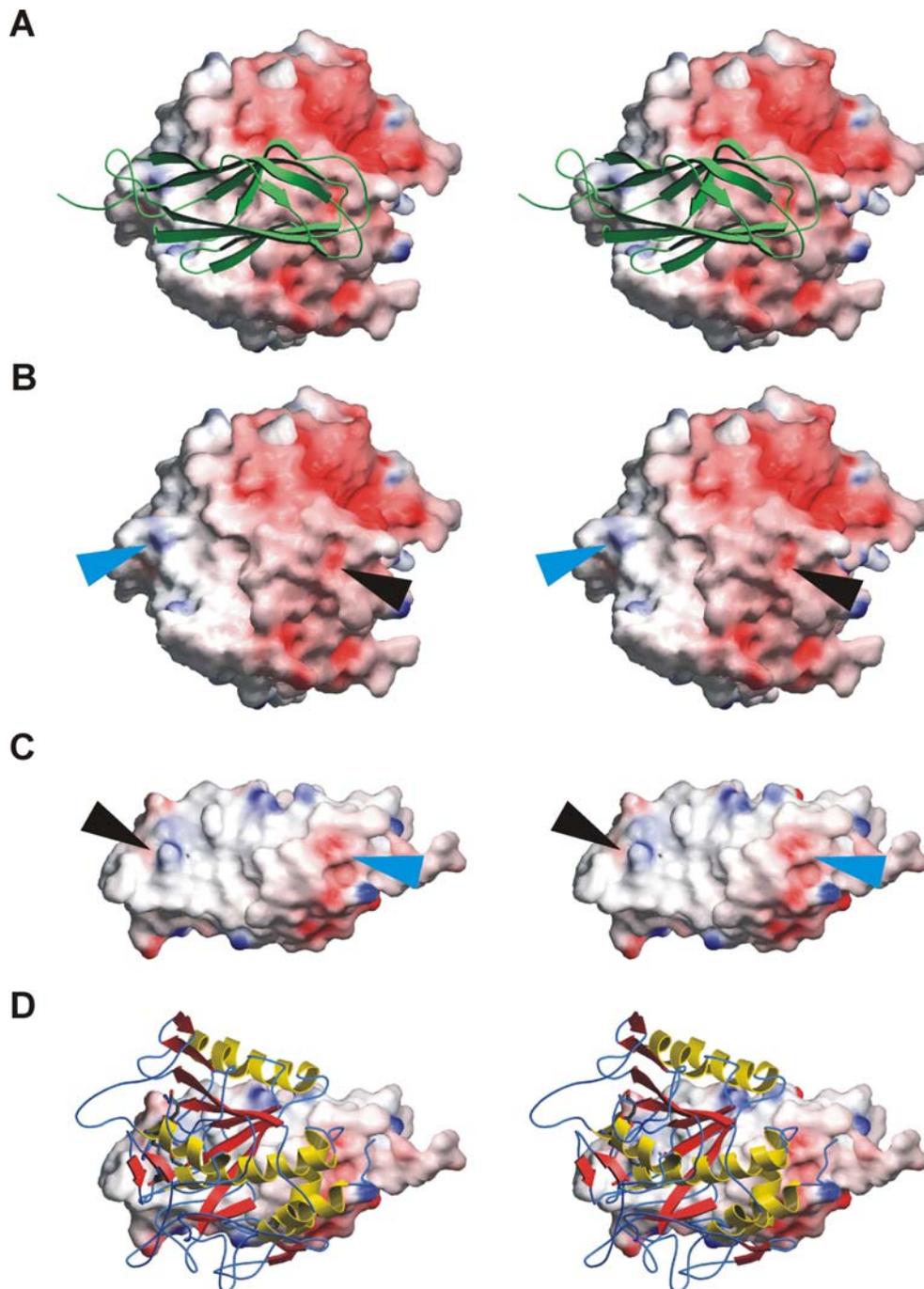


Abbildung 55: Oberfläche der katalytischen und der P-Domäne von Furin. Blick auf die Oberflächen der katalytischen Domäne (A, B) und der P-Domäne (C, D) im Bereich der Verbindungsfläche zwischen beiden Domänen. Zwischen den ersten und den letzten beiden Abbildungen wurde eine vertikale Drehung um 180° durchgeführt. Die Oberflächen wurden entsprechend der berechneten Potentiale eingefärbt (rot: -20 kT/e, blau: 20 kT/e). In A und D ist zusätzlich die P-Domäne bzw. die katalytische Domäne als Bänder dargestellt. Die schwarzen und blauen Pfeile geben die Bereiche um das RGD-Motiv bzw. am Übergang von der katalytischen zu P-Domäne an, bei denen Wassstoffbrückenbindungen zwischen beiden Domänen ausgebildet werden.

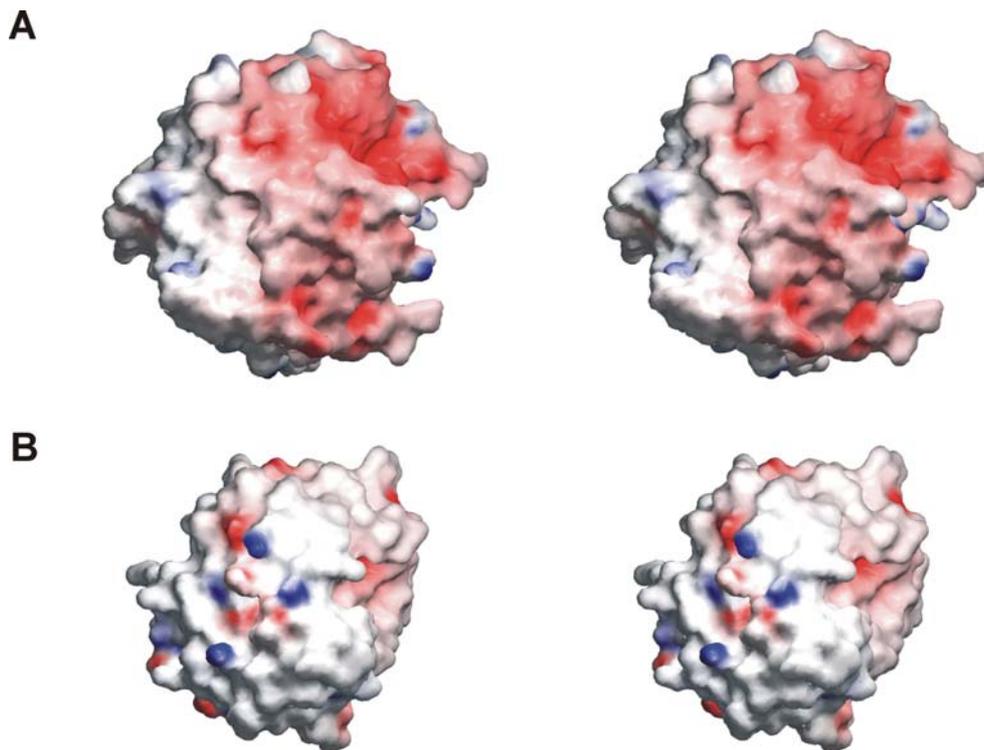


Abbildung 56: Oberflächenvergleich zwischen der katalytischen Domäne von Furin (A) und Subtilisin Carlsberg (B). Es entspricht die Abbildung A der Abbildung 55, B. Das Subtilisin wurde gemäß dem Furin ausgerichtet. Die Oberflächen wurden entsprechend der berechneten Potentiale eingefärbt (rot: -20 kT/e , blau: 20 kT/e).

6.6 Ausblicke

Mit der hier beschriebenen Kristallstruktur von Furin gelang es, die Ektodomäne des wichtigsten Vertreters der Gruppe der Proproteinkonvertase aufzuklären und basierend darauf, die nächsten Verwandten dazu zu modellieren. Man erhält dadurch einen Einblick in den Aufbau und die Substratspezifität der Proproteinkonvertasen. Da diesen Endoproteasen eine sehr wichtige Rolle im Sekretionsweg zukommt, stellen sie einen wichtigen Ansatzpunkt für zukünftige Medikamente dar. Gelingt es, die verschiedenen Proproteinkonvertasen wirkungsvoll und kompetitiv zu hemmen, so könnte man eventuell mit den entsprechenden Inhibitoren viele verschiedene Krankheiten bekämpfen. Insbesondere auf dem Hintergrund der essentiellen Funktion von Furin bei der Prozessierung von viralen Glykoproteinen und bakteriellen Toxinen wäre es durch kurzzeitige Hemmung von Furin möglich, gegen Krankheiten wie HIV, Ebola und Milzbrand vorzugehen, ohne dabei schwerste Nebenwirkungen hervorzurufen. Die in dieser Arbeit untersuchten niedermolekularen Inhibitoren stellen eine gute Basis für die Entwicklung neuer Inhibitoren dar und übertreffen in ihrer Wirkung bereits jetzt die bekannten Furininhibitoren. In Kombination mit der Kristallstruktur müssen nun die bestehenden Verbindungen optimiert und auf ihre Wirkung hin untersucht werden. Von

großem Interesse wäre es, wenn man auch von den anderen Proproteinkonvertasen die Kristallstrukturen lösen und die Bindung von kompetitiven Inhibitoren an Hand einer Co-Kristallisation mit Furin zeigen könnte.

7 Kristallstruktur der nicht-kollagenen Domäne NC1 von Kollagen IV aus menschlicher Plazenta

7.1 Einleitung

Basalmembranen werden in der frühen Entwicklungsphase von Säugetieren gebildet und bestehen aus einem Netzwerk dünner Schichten. Aufgrund der mikroskopischen Unterscheidbarkeit wird z. B. die Basalmembran der Haut in die Schichten Lamina lucida, Lamina densa, Verankerungsfibrillen und Verankerungsplaques unterteilt (Abbildung 57). Die Basalmembranen liegen benachbart zu verschiedenen Zelltypen, wo sie die Morphogenese steuern und eine geordnete Gewebestruktur aufrechterhalten. Kollagen IV macht den größten kollagenen Bestandteil davon aus. Es liefert sowohl mechanische Stabilität durch sein Netzwerk als auch Verankerungsmöglichkeiten für Rezeptoren (Hudson *et al.*, 1993; Kühn, 1995). Aufgebaut ist Kollagen IV aus den sogenannten Protomeren, die aus heterotrimeren α -Ketten bestehen, von denen es insgesamt sechs Isoformen gibt ($\alpha 1(\text{IV})$ - $\alpha 6(\text{IV})$). Die häufigste Kollagen IV-Form, die in allen untersuchten Basalmembranen gefunden wurde, wird aus zwei $\alpha 1(\text{IV})$ - und einer $\alpha 2(\text{IV})$ -Kette gebildet (Hudson *et al.*, 1993; Kühn, 1995; Timpl, 1989). Ein Protomer besteht aus einer 400 nm langen kollagenen Triplehelix (ca. 1400 Aminosäuren) mit dem für Kollagene typischen kollagenen Sequenzmotiv Gly-X-Y, einer kurzen N-terminalen nicht-kollagenen 7S-Domäne (ca. 150 Aminosäuren) und einer C-terminalen globulären NC1-Domäne (*non-collagenous domain*, ca. 230 Aminosäuren) (Fessler und Fessler, 1982; Oberbäumer *et al.*, 1982). Die in die extrazelluläre Matrix abgegebenen Protomere formen über ihre 7S-Domäne Tetramere und über die NC1-Domäne Dimere (Abbildung 58). Die Protomere sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Gewebestruktur, wobei besonders die NC1-Domäne wichtig für die Zusammenlagerung der richtigen α -Ketten (Hudson *et al.*, 1993) und die Dimerisierung von Kollagen IV-Protomeren ist (Boutaud *et al.*, 2000; Dölz *et al.*, 1988).

Die weniger häufigen Isoformen können in die $\alpha 1$ -ähnlichen Ketten $\alpha 3(\text{IV})$ und $\alpha 5(\text{IV})$ sowie die $\alpha 2$ -ähnlichen Ketten $\alpha 4(\text{IV})$ und $\alpha 6(\text{IV})$ unterteilt werden. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei alveolaren und renalen Basalmembranen (Gunwar *et al.*, 1998; Hudson *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1994). Es sind mehrere schwere erbliche Krankheiten bekannt, die mit Kollagen IV in Verbindung gebracht werden. So führen Mutationen in der NC1-Domäne oder Autoantikörper gegen diese zu den Syndromen Alport (Hudson *et al.*, 1993) bzw. Goodpasture (Borza *et al.*, 2000; Netzer *et al.*, 1998). Es konnten auch Effekte auf die Angiogenese und das Tumorwachstum nachgewiesen werden (Petitclerc *et al.*, 2000).

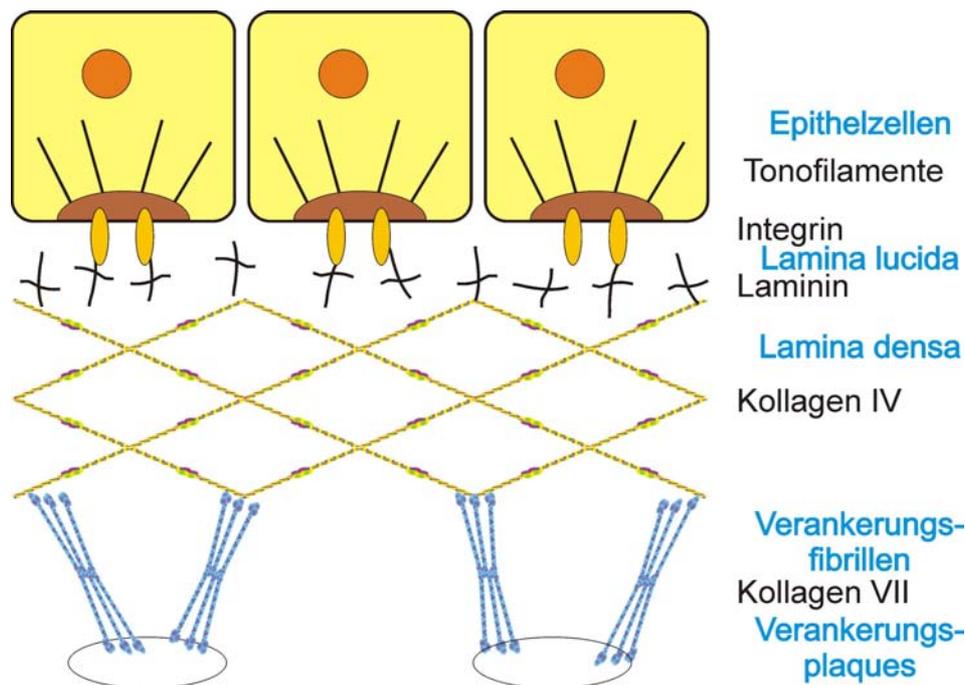


Abbildung 57: Schematische Darstellung einer Basalmembran der Haut. Mikroskopisch sind Epithelzellen, Lamina lucida, Lamina densa, Verankerungsfibrillen und Verankerungsplaques zu unterscheiden (von apikal zu basal). Das Kollagen IV bildet ein dreidimensionales Netzwerk in der Lamina densa und verbindet die Lamina lucida mit den Verankerungsfibrillen.

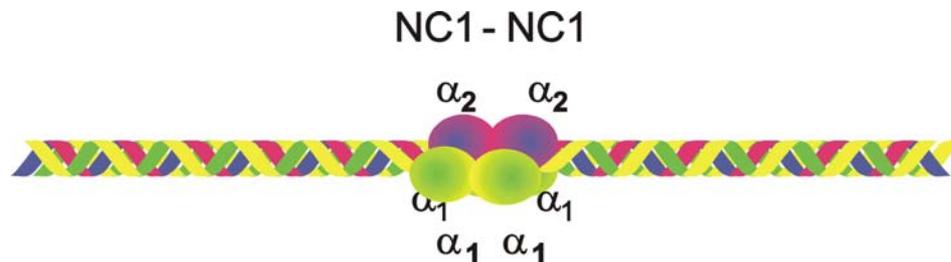


Abbildung 58: Schematische Darstellung der C-terminalen Dimerisierung zweier Kollagen IV-Hexamere. Es stehen sich von den heterotrimeren Protomeren jeweils die Ketten α_1 bzw. α_2 gegenüber.

Die NC1-Aminosäuresequenzen von 28 Kollagen IV-Isoformen von Säugetieren und Wirbellosen haben eine bemerkenswert hohe Ähnlichkeit, was auf eine hochkonservierte Funktion schließen lässt (Netzer *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1994). Jeder der α -Ketten zeigt zwei homologe Untereinheiten, die in sich über drei Disulfidbrücken quervernetzt sind (Siebold *et al.*, 1988). Hexamere NC1-Domänen mit einer Größe von ungefähr 170 kDa können nach einem Kollagenaseverdau aus Geweben isoliert werden (Gunwar *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 1984). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen sie eine kompakte ovale Form von $60 \times 110 \text{ \AA}$ (Dölz *et al.*, 1988; Timpl, 1989). Setzt man die Hexamere sauren oder denaturierenden Bedingungen aus, so dissoziieren sie in eine Mischung aus Monomeren und stabilen Dimeren von α -Kettenfragmenten (Boutaud *et al.*, 2000; Ries *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1988; Weber *et al.*, 1984). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, daß die starken

Interaktionen zwischen zwei α -Ketten durch eine Disulfidbrückenumordnung (*disulfide reshuffling*) während der Netzwerkbildung der Basalmembran entstehen (Siebold *et al.*, 1988) oder daß es zu einer Untereinheitenverschiebung der α -Ketten über den Verbindungsbereich hinweg kommt (Netzer *et al.*, 1998).

Nachdem schon früher Kristallisationsversuch mit dem aus menschlicher Plazenta gereinigtem NC1-Hexamer unternommen wurden, aber aufgrund nicht-isomorpher Kristalle das Phasenproblem nicht gelöst werden konnte (Stubbs *et al.*, 1990; Timpl *et al.*, 1985), gelang es nun erstmals mit der *Multiwavelength Anomalous Dispersion* (MAD) eine Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1,9 Å zu erstellen. Mit Hilfe der Kristallstruktur konnte endlich die Frage nach der Form der Verbindungsfläche zwischen zwei α -Ketten eines Dimers geklärt werden. Dabei stellte sich heraus, daß es sehr wahrscheinlich zur Ausbildung einer bisher unbekanntenen kovalenten Methionin-Lysin-Seitenkettenverknüpfung kommt.

7.2 Material und Methoden

7.2.1 Reinigung, Kristallisation und Datenaufnahme

Die NC1-Hexamere wurden von Herrn Albert Ries aus menschlicher Plazenta nach bereits beschriebenem Protokoll gereinigt (Ries *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1988). Das Protein lag in 20 mM NH_4HCO_3 vor und wurde für die Kristallisation auf 10 mg/ml konzentriert. 1,5 μl davon wurden mit 1,5 μl Präzipitantspuffer (0,1 M Mes/NaOH, 3,2-3,6 M Natriumazetat, pH 7,1-7,5) gemischt, in die CrysChem-Kristallisationsplatte (Charles Supper Company) gegeben und gegen ein Reservoir mit 500 μl Präzipitantspuffer nach der Dampfdruckmethode äquilibriert. Es entstanden unregelmäßige, 0,4 mm große Kristalle mit der Raumgruppe R3 (Abbildung 59). Die Zellkonstanten waren $a = b = 234,59 \text{ \AA}$, $c = 99,49 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ und $\gamma = 120^\circ$. Für die Kryokristallographie mußte kein besonderer Puffer gesucht werden, sondern die Kristalle konnten mit einem *cryo-loop* direkt von der Mutterlauge in flüssigen Stickstoff überführt werden. Die nachfolgenden Arbeiten von den Röntgendiffraktionsmessungen am Synchrotron bis zum automatischen Modellbau mit ARP-WARP erfolgten unter besonderer Mithilfe von Dr. Gleb P. Bourenkov und Dr. Manuel E. Than. Die Röntgendiffraktionsexperimente wurden an der Wiggler Beamline BW6 in Hamburg (Blume *et al.*, 2001) mit einem 165 mm-MarCCD-Detektor (MAR research, Hamburg) bei 100 K (Abbildung 60, Tabelle 14) durchgeführt und die Daten wurden mit den Programmen MOSFLM (Leslie, 1991) und SCALA (CCP4, 1994) bzw. DENZO und SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) prozessiert.

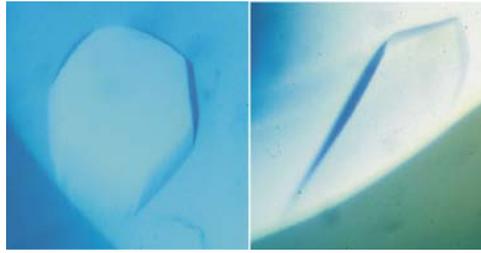


Abbildung 59: Die Kristalle von Kollagen IV-NC1 waren unregelmäßig geformt und hatten die Raumgruppe R3. Die Zellkonstanten waren $a=b=234,59 \text{ \AA}$, $c=99,49 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$ und $\gamma=120^\circ$.

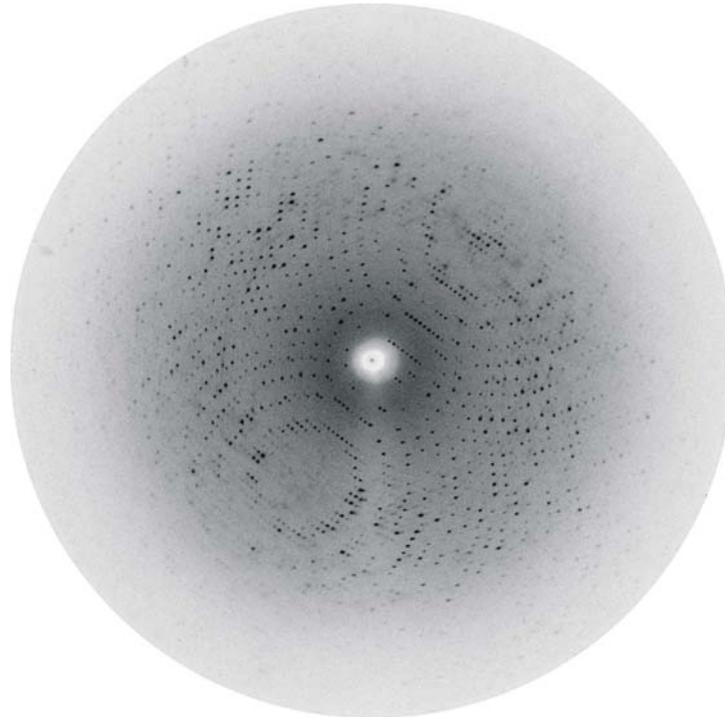


Abbildung 60: Diffraktionsbild von Kollagen IV-NC1. Das Bild wurde mit einem Drehanodengenerator an dem Kristall, der für den nativen Datensatz (Nativ1) verwendet wurde, aufgenommen. Der Kristall wurde auf 100 K gekühlt und zeigte eine Auflösung von 2,3 Å bzw. von 2,0 Å am Synchrotron.

Initiale Phaseninformation konnte durch ein MAD-Experiment an einem Kristall, der für einen Tag mit 8 mM $K_2[OsCl_6]$ behandelt wurde, gewonnen werden. Aufgrund einer starken R32-Pseudo-Symmetrie gestaltete sich die Interpretation der Patterson-Karte schwierig, doch mit der Selbstrotationsfunktion (POLARRFN (CCP4, 1994)) konnte die nicht-kristallographische Achse, die um vier Grad verkippt senkrecht auf der c-Achse steht, orientiert werden. Mit der Patterson-Superpositionstechnik (SHELXS (Sheldrick, 1997)) war es schließlich möglich, die Positionen der Osmiumatome zu bestimmen und mit MLPHARE (CCP4, 1994) zu verfeinern. Um die Phaseninformation zu verbessern, wurde ein weiterer Kristall für 30 s in 1 M Natriumbromid eingelegt und anschließend ein MAD-Experiment an der Absorptionskante von Bromid durchgeführt (Abbildung 61, Tabelle 14). Mit Hilfe der Osmiumlagen gelang es, in der anomalen Differenzfourierkarte der NaBr-Kristallderivate die

25 stärksten Bromidlagen zu lokalisieren (Abbildung 62) und anschließend sowohl die Phaseninformation zu berechnen als auch eine Elektronendichtekarte zu erstellen.

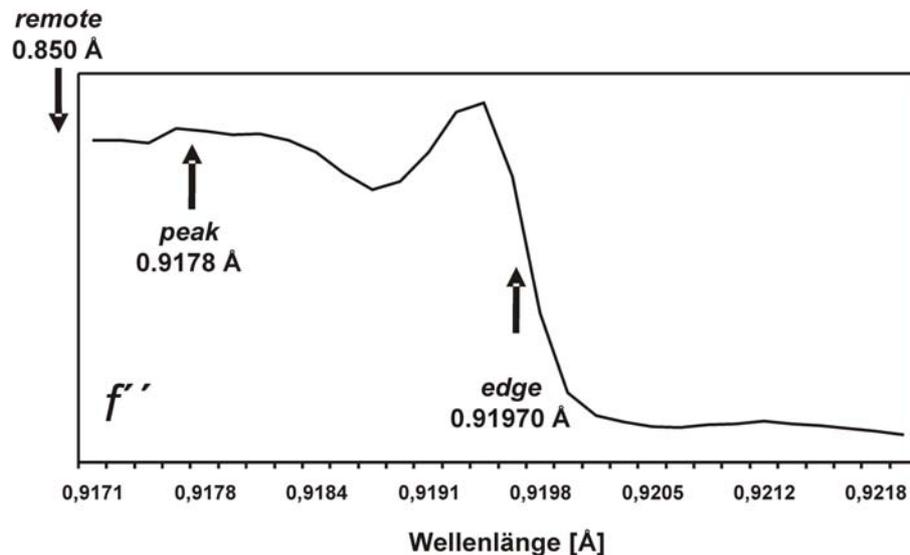


Abbildung 61: Fluoreszenzmessung zur Bestimmung der K-Absorptionskante von Brom. Die durch Anregung mit Röntgenlicht gemessene Fluoreszenz des mit NaBr-behandelten Kristalls ist proportional zum anomalen Streuteil f'' des Broms. Bei dem durchgeführten MAD-Experiment wurden Datensätze bei den Wellenlängen 0,9178 Å (*peak*), 0,91970 Å (*edge*) und 0,850 Å (*remote*) aufgenommen.

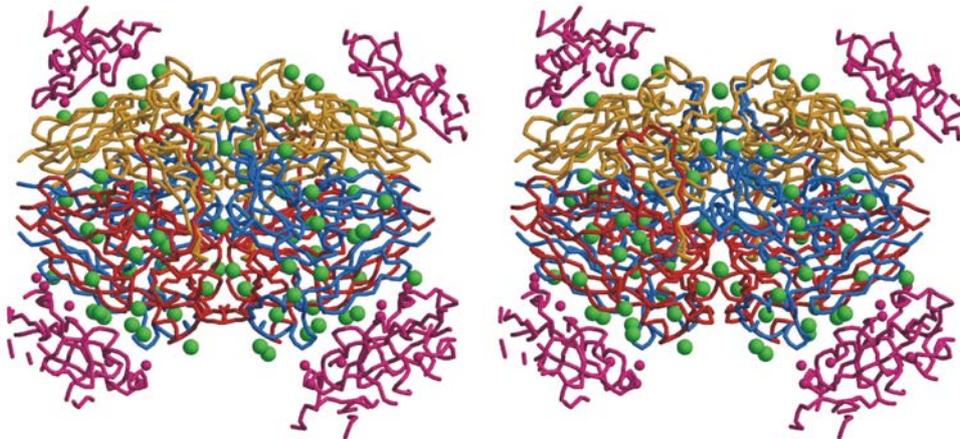


Abbildung 62: Stereosicht auf die Bromidbindungsstellen eines NC1-Hexamers. Es sind alle Bromide (grüne Bälle) angegeben, die nach einer Kristallbehandlung für 30 s mit 1 M NaBr gefunden werden konnten. Die $\alpha 1$ -1-, $\alpha 1$ -2- und $\alpha 2$ -Ketten sind in rot, blau bzw. gold dargestellt. Die Kristallpackungskontakte sind durch die Symmetrieverwandten in violett dargestellt.

7.2.2 Modellbau und Verfeinerung

Mit den Strukturfaktoramplituden der drei Datensätze des NaBr-Derivats (NaBr1-3; Tabelle 14) und der ermittelten Phaseninformation wurde eine Elektronendichtekarte berechnet, in der die Lösungsmittelbereiche (*solvent flattening/histogram matching*) mit DM (CCP4, 1994) unter der Annahme eines Lösungsmittelanteils von 65 % geglättet wurden. Es ergab sich dabei eine *figure of merit* (FOM) von 0,66 bei einer Auflösung von 2,3 Å. Durch

zweifache nicht-kristallographische (NCS) Mittelung und der Verwendung eines nativen Datensatzes (Nativ1) konnte die Auflösung weiter verbessert und die Phaseninformation auf 2,0 Å erweitert werden. Mehrere Zyklen des automatischen Modellbaus mit ARP-WARP (Perrakis *et al.*, 1999) und einer NCS-Mittelung in DM (CCP4, 1994) führte zu 23 Kettenfragmenten, die die Hauptkettenatome von 1250 Resten umfaßten. Nach einem Sequenzvergleich mit ARP-WARP konnten die Fragmente unter Hinzunahme der lokalen Symmetrie (LSQKAB, (CCP4, 1994)) zu vier nahezu kompletten α 1- und zwei unvollständigen α 2-Ketten zusammengefügt werden. Die resultierende Elektronendichtekarte mit kombinierten experimentellen und in ARP-WARP berechneten Phasen war sehr gut. Das Modell wurde in mehren Zyklen manueller Durchsicht, Modellbau und Verfeinerung in MAIN (Turk, 1992) bzw. CNS (Brünger *et al.*, 1998) vervollständigt. Die Verfeinerungszyklen bestanden aus Lage- und *B*-Faktor-Verfeinerungsschritten, bei denen die Standardwerte von Engh und Huber (Engh und Huber, 1991) wie auch *bulk solvent*-Korrekturen und anisotrope *B*-Faktorskalierung verwendet wurden. Zwischen den Resten beider Trimere aus $[\alpha$ 1(IV)]₂[α 2(IV)]₁ wurde bis auf wenige Ausnahmen eine hohe Kraft zur Einhaltung einer nicht-kristallographischen Symmetrie eingesetzt.

Trotz intensivem aber unzureichendem Waschen des zur Messung des ersten „nativen“ Datensatzes (Nativ1) verwendeten *cryo-loops* konnten gebundene Bromidionen in der Kristallstruktur identifiziert werden, daher wurde für die endgültige Verfeinerung ein neuer nativer Datensatz (Nativ2) mit dem gleichen Testbereich wie bei Nativ1 für die Berechnung des freien R-Faktors verwendet. Die Qualität des Strukturmodells wurde mit PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und SFCHECK (CCP4, 1994) überprüft.

Tabelle 14: Datenstatistik

Datensatz	Wellenlänge (Å)	Auflösung (Å)	Anzahl der Reflexe ^a	Vollständigkeit ^b (%)		R-merge (%) ^b
				gesamt	anomal	
			gesamt / unabhängig			
Nativ1	1,05	2,01	249220 / 132884	97,3 (97,1)	-	5,1 (38)
NaBr1 (peak)	0,91780	2,30	340768 / 178767	99,0 (99,5)	96,7 (97,3)	6,5 (40)
NaBr2 (edge)	0,91970	2,47	276358 / 144687	98,8 (99,3)	96,7 (97,1)	4,4 (17)
NaBr3 (remote)	0,850	2,49	271310 / 141435	98,2 (99,7)	96,1 (97,7)	5,3 (26)
Nativ2	1,05	1,90	441349 / 155867	96,9(97,6)	-	5,8 (30)

^a Für die MAD und die nativen Datensätze wurden die Friedelpaare als unabhängig Reflexe gezählt.

^b Die Werte in Klammern beziehen sich auf die letzte Auflösungsstufe mit einer 0,1 Å-Weite.

7.2.3 Bromidbindung

Um die Stärke der Bromidbindung der zufällig im ersten „nativen“ Datensatz (Nativ1) gefundenen Bromide zu bestimmen, wurden von Herrn Dr. Gleb P. Bourenkov weitere Kristalle unterschiedlich lange und mit verschiedenen NaBr-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurden an ihnen komplette anomale Datensätze bei einer Wellenlänge von 0,90 Å gemessen. Bei dem endgültigen Strukturmodell des NC1-Hexamers wurden alle Wasser und Ionen entfernt und mit *simulated annealing*-, Positions- und *B*-Faktorverfeinerungsschritten (Brünger *et al.*, 1998) gegen die neuen Strukturfaktoramplituden verfeinert. Anomale Differenzfourierkarten wurden unter Verwendung der Modellphasen (SFALL, (CCP4, 1994)) berechnet und mit FFT (CCP4, 1994) und PEAKMAX (CCP4, 1994) analysiert.

7.2.4 Strukturelle Analyse der Seitenkettenverknüpfung zwischen Methionin und Lysin

Während der kristallographischen Modellverfeinerung zeigte sich, daß sich eine Methionin- und ein Lysin-Seitenkette von gegen überliegenden α -Ketten sehr nahe kamen und möglicherweise einen Kontakt ausbilden. Um die Natur der sechs Met93-Lys211-Kontakte zu untersuchen, wurde die umgebende Region modelliert und gegen eine *composite simulated annealing omit*-Elektronendichtekarte (Brünger 1998) verfeinert. Bei dieser Art von Dichtekarte wird der Einfluß der vom Modell ausgehenden Phaseninformation auf die Elektronendichtekarte dadurch minimiert, daß ein begrenzter Modellbereich nicht gleichzeitig Phaseninformation zur Berechnung der Elektronenkarte an der entsprechenden Stelle

beisteuert. Unter der Annahme verschiedener Verknüpfungsformen wurde entweder eine offene oder eine verknüpfte Form bzw. eine Mischung im Verhältnis 1:1 aus beiden verfeinert.

Zur biochemischen Charakterisierung der Verknüpfung wurden von Herrn Dr. Karlheinz Mann die nicht modifizierten oder reduzierten und carboxymethylierten Monomere und Dimere von NC1 gemäß ihrer Größe über TSK SW_{XL} 2000-Säulen (Toso-Haas, Stuttgart) in 4 M Guanidinium enthaltenden Puffer aufgetrennt. Die getrennten Proteine wurden gegen 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat dialysiert, mit Trypsin verdaut und die entstandenen Peptide wiederum nach ihrer Größe über eine Superdex Peptid-Säule (HR10/30) (Amersham Pharmacia Biotech) getrennt. Die querverknüpften Peptide wurden wiederum mit Chymotrypsin und Endoproteinase Asp-N verdaut, die entstehenden Fragmente größenmäßig aufgetrennt und deren Aminosäuresequenz bestimmt.

7.3 Ergebnisse

7.3.1 Strukturbestimmung

Die Kristallisation der NC1-Hexamere von Kollagen IV aus menschlicher Plazenta in einer neuen Kristallform führten zusammen mit der Verwendung von Osmium(IV)- und Natriumbromid-Derivaten für die Phasierung mit MAD zu einer ausgesprochen guten Elektronendichtekarte. Es konnten ca. 90 % der Aminosäuren automatisch gebaut und bei einer Auflösung von 1,9 Å bis zu einem R-Faktor bzw. freien R-Faktor von 18,2 und 20,2 % verfeinert werden (Tabelle 15). In der Elektronendichtekarte des ersten NaBr-behandelten Kristalls konnten 73 Bromidbindungsstellen pro NC1-Hexamer mit PEAKMAX (CCP4, 1994) gefunden werden (Abbildung 62). Diese Vielzahl an anomalen Streuern erklärt auch, warum zunächst die Phaseninformation des Osmium(IV)-Derivats nötig war, um die 25 stärksten Bromidionen zu lokalisieren. Nachfolgend wurden dann diese Bromidlagen zur Berechnung experimenteller Phasen herangezogen.

Tabelle 15: Verfeinerungsstatistik der Kristallstruktur von Kollagen IV-NC1.

Auflösung		19,95 – 1,90
Anzahl der Reflexe:	gesamt	148362
	Testbereich	7569
Vollständigkeit (%) ^a	gesamt	92,3 (95,3)
	Testbereich	5,1 (5,2)
R-Faktor (%) ^a		18,2 (27,7)
freie R-Faktor (%) ^a		20,2 (29,9)
Proteinatome (Nicht-Wasserstoffe)		10514
Lösungsmittelatom (Nicht-Wasserstoffe)		1114
Acetatatome (Nicht-Wasserstoffe)		36
Standardabweichung von der Standardbindungslänge (Å)		0,009
Durchschnittlicher <i>B</i> -Faktor (Å ²) ^b		32,63 (34,9)
Standardabweichung zwischen gebundenen <i>B</i> -Faktoren (Å ²)		2,370

^a Die Werte in Klammern geben die letzte Auflösungsschale an (1.90 – 2.02 Å).

^b Wilson-Plot *B*-Faktor in Klammern.

7.3.2 Strukturübersicht

In der asymmetrischen Einheit der trigonalen Kristalle findet sich ein NC1-Hexamer bestehend aus vier $\alpha 1(\text{IV})$ - und zwei $\alpha 2(\text{IV})$ -Kettenfragmenten. Das ganze Hexamer besitzt eine ellipsoide Form von 95 Å in die lange und 70 Å in die kurze Richtung (Abbildung 63). Die beiden Kappen sind aus zwei trimeren NC1-Enden zweier dimerisierender Kollagen IV-Protomere aufgebaut. Im folgenden werden die Kappen als Trimer A und Trimer B bezeichnet. Zwischen beiden befindet sich eine große ebene Verbindungsfläche. Jedes dieser Trimere wird aus den drei segmentiellangeordneten und um 120° zueinander versetzten α -Ketten A/B $\alpha 1$ -1, A/B $\alpha 1$ -2 und A/B $\alpha 2$ gebildet (Abbildung 64, B). Die Ketten umgeben dabei einen zentralen, stark negativgeladenen Tunnel (Abbildung 64, A). Das NC1-Hexamer zeigt eine nahezu perfekte zweizählige Symmetrieachse (Abbildung 63) und senkrecht dazu, entlang dem zentralen Tunnel eine pseudo-dreizählige Rotationsachse (Abbildung 64, B). Die dreizählige Achse dreht die chemisch identischen, aber strukturell nur ähnlichen $\alpha 1$ -1- und $\alpha 1$ -2-Ketten wie auch die chemisch unterschiedliche $\alpha 2$ -Kette eines jeden Trimers aufeinander.

Mit Ausnahme von zwei bis drei N-terminalen Aminosäuren sind die kompletten Ketten gut in der Elektronendichtekarte definiert. Die Sequenznumerierung entspricht der für die NC1-Domäne festgelegten Numerierung von Siebold *et al.* (Siebold *et al.*, 1988) und beginnt mit dem ersten Rest nach dem letzten kollagenen Gly-X-Y-Motiv. Die kristallographisch unterschiedlichen $\alpha 1$ -1- und $\alpha 1$ -2-Ketten zeigen eine nahezu identische Topologie, die auch mit der der $\alpha 2$ -Kette weitgehend übereinstimmt. Die topologisch optimale Überlagerung der

$\alpha 1$ - mit der $\alpha 2$ -Kette führt zu einem Sequenzvergleich, bei dem es zu einer Deletion von zwei Aminosäuren (Reste 91 und 92) und einer Insertion eines Restes (Gly177A) in der $\alpha 2$ -Kette kommt (Abbildung 65).

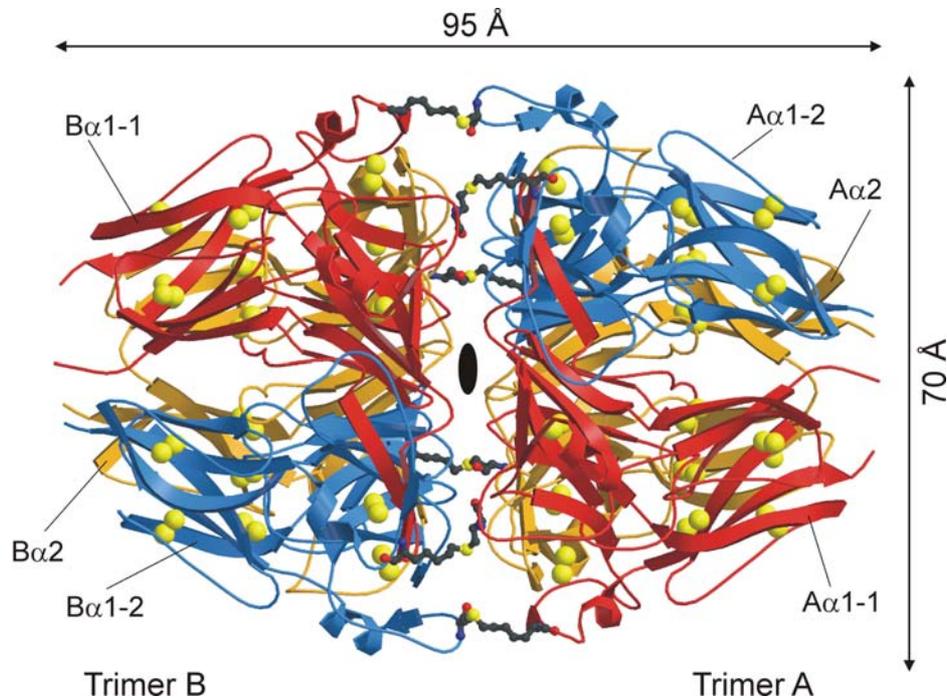


Abbildung 63: Schleifendarstellung des NC1-Hexamers mit Blick entlang der pseudo-zweizähligen Achse. Die zwei $\alpha 1(IV)$ - und die eine $\alpha 2(IV)$ -Kette eines jeden Trimers sind in rot ($\alpha 1-1$), blau ($\alpha 1-2$) und gold ($\alpha 2$) abgebildet. Die Disulfidbrücken innerhalb der α -Ketten sind durch ihre Schwefelatome (gelbe Bälle) und die kovalenten Verknüpfungen zwischen Met93 und Lys211 als Ball-und-Stäbchen dargestellt.

pseudo-sechszählige Rotationsachse machen (Abbildung 64, B). Jede der Untereinheiten besteht aus neun β -Strängen (I β 1 bis I β 9 und II β 1 bis II β 9; Abbildung 67), einer helikalen Schleife (I α 1 und II α 1) und den verbindenden Bereichen. Drei der β -Stränge (I β 1, I β 9, I β 2 bzw. II β 1, II β 9, II β 2) formen ein kleines antiparalleles β -Faltblatt, das sowohl den N-terminalen als auch den C-terminalen Bereich beinhaltet und in Nähe des Pols liegt. Vier weitere β -Stränge der Untereinheit (I β 4, I β 3, I β 7 und I β 8 bzw. II β 4, II β 3, II β 7 und II β 8) bilden ein unvollständiges β -Faltblatt, das durch eine fingerartige Haarnadelschleife der β -Stränge II β 5-II β 6 (bzw. I β 5-I β 6) der benachbarten und um 60° versetzten Untereinheit vervollständigt wird. Es entsteht ein sechssträngiges antiparalleles β -Faltblatt. Die beiden eigenen β -Stränge I β 5-I β 6 (bzw. II β 5-II β 6) vervollständigen ihrerseits als Haarnadelschleife die nächste benachbarte Untereinheit, so daß jede Untereinheit an der Bildung von je einem β -Faltblatt beider Nachbarn beteiligt ist. Innerhalb einer jeden Untereinheit finden sich zwei Disulfidbrücken, wohingegen Disulfidbrücken weder zwischen Untereinheiten noch zwischen verschiedenen α -Ketten des gleichen oder des gegenüberliegenden Trimers existieren. Es kann damit die postulierte Verknüpfung (Siebold *et al.*, 1988) zwischen Ketten ausgeschlossen werden.

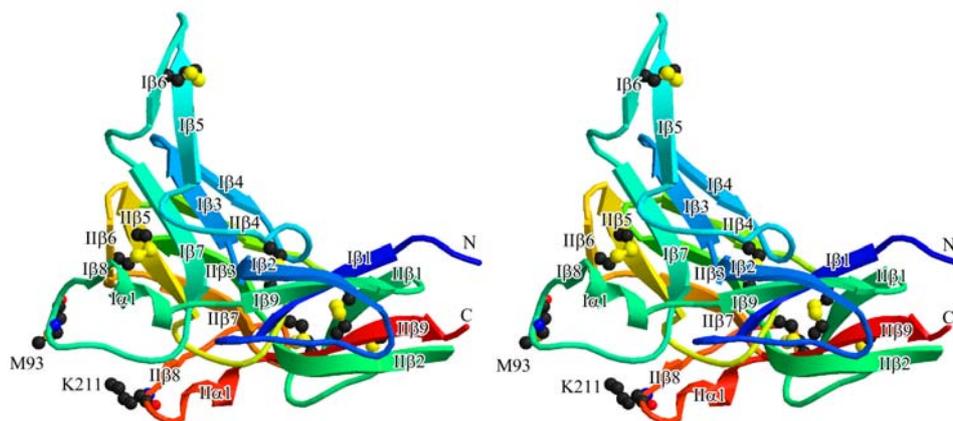


Abbildung 66: Bänder-Darstellung der A α 1-1 Kette. Die Farbgebung entspricht der Reihenfolge der Sequenz (blau: N-Terminus, rot: C-Terminus). Die Reste Met93 und Lys211 der kovalenten Verknüpfung sind besonders herausgehoben.

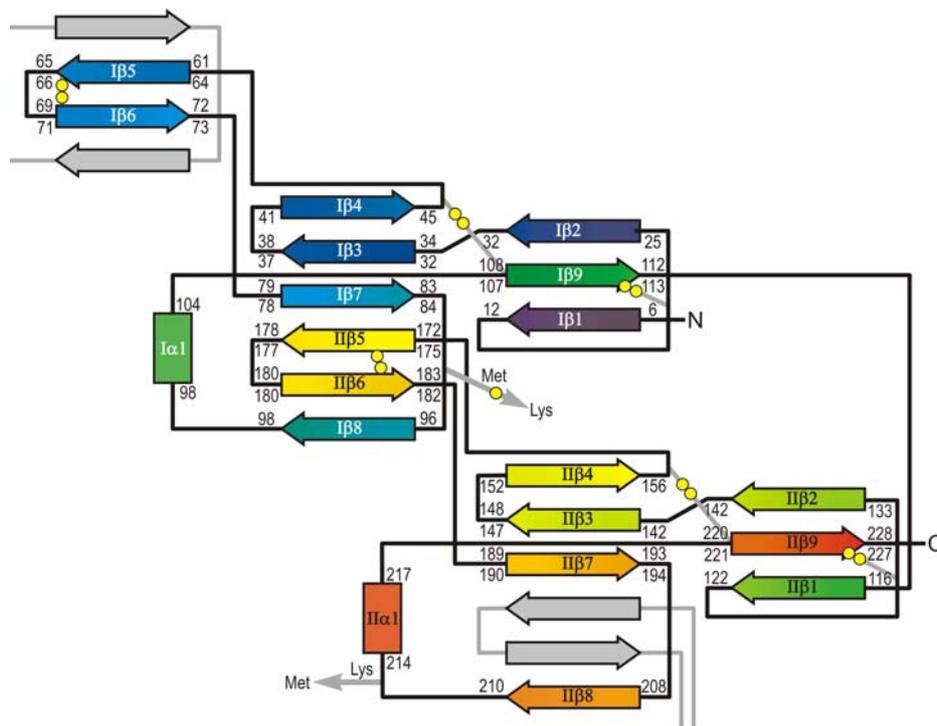


Abbildung 67: Topologiediagramm des NC1-Bereichs einer $\alpha 1$ -1-Kette von Kollagen IV. Die Farben entsprechen denen in Abbildung 66 bzw. die Sequenznummern den Angaben aus dem Sequenzvergleich in Abbildung 65. Disulfidbrücken und der Schwefel des Methionins aus der kovalenten Verknüpfung sind als gelbe Kreise gezeigt. Die β -Stränge der Nachbarketten, mit denen ein β -Faltblatt ausgebildet wird sind grau dargestellt.

7.3.3 Kovalente Seitenkettenverknüpfung zwischen Methionin und Lysin

Interessanterweise bilden die Ketten $\alpha 1$ -1, $\alpha 1$ -2 und $\alpha 2$ über die Schleifen II β 8/II α 1 und β 7/I β 8 sehr engen Kontakt zu den entsprechenden Schleifen der Ketten $\alpha 1$ -2, $\alpha 1$ -1 und $\alpha 2$ des gegenüberliegenden Trimers (Abbildung 67). Während der kristallographischen Verfeinerung wurden die Seitenketten von Lys211 und Met93 der sich gegenüberstehenden Ketten unterhalb normaler van der Waals-Abstände zusammengedrückt. Trotz dieser Nähe war immer noch eine positive Differenz in der $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte zwischen Met93-S δ und Lys211-C ϵ /N ζ zu erkennen, welche nicht alleine durch eine nicht-kovalente Bindung erklärt werden konnte. Eine *simulated annealing omit*-Elektronendichtekarte (Brünger *et al.*, 1998) zeigte eine durchgehende Elektronendichte zwischen beiden Seitenketten (Abbildung 68, A). Basierend auf diese durchgehende Elektronendichte, wurden verschiedene Modelle für eine mögliche Verknüpfung erstellt, verfeinert und eine neue Elektronendichtekarte berechnet. Die strukturell und chemisch plausibelsten Modelle waren die kovalentverknüpften Thioether Met93-S δ -C ϵ -Lys211 (kurze Form) und Met93-S δ -C ϵ -C ϵ -Lys211 (lange Form), entweder alleine (Abbildung 68, B und C) oder als Mischung zu ungefähr gleichen Teilen aus nicht-kovalent verbundenen Seitenketten (offene Form) und kurzer bzw. langer Form (Abbildung 68, D und E). Die Modelle, die sowohl die offene als auch eine verbundene Form enthielten,

ergaben eine deutlich bessere Interpretation der Elektronendichtekarte, als die, die entweder nur die kovalente oder nur die offene Form hatten. Die beste Übereinstimmung zwischen $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte und Modell entstand bei der Kombination aus offener und kurzer Form (Abbildung 68, C), während bei der langen Form in Kombination mit der offenen Form einige Atome sehr nahe zusammengedrückt wurden und teilweise aus der Elektronendichtekarte standen (Abbildung 68, B). Letztendlich konnte allerdings bei einer Auflösung von 1,9 Å nicht entschieden werden, welche Art von Verknüpfung vorliegt.

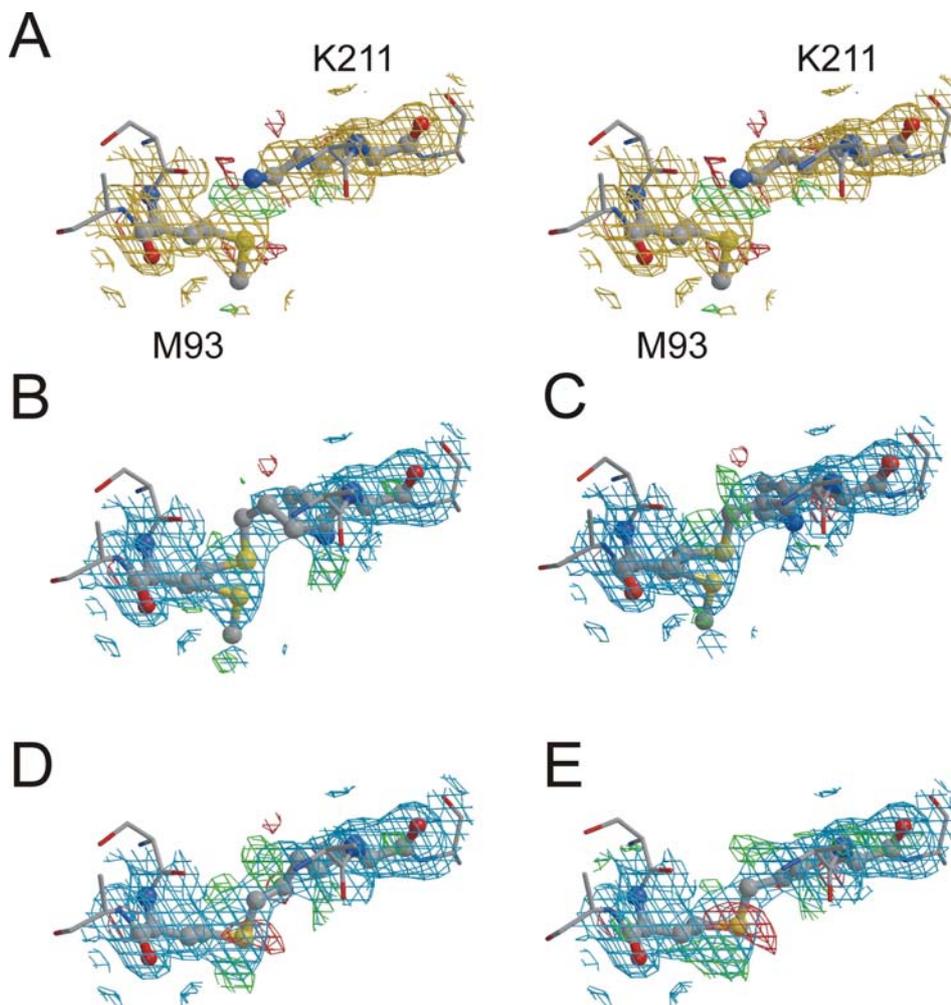


Abbildung 68: Verschiedene verfeinerte Modelle der neuen kovalenten Verknüpfung zwischen Met93 (Ba1-1) und Lys211 (Aa2). Abb. A: Stereoabbildung der offenen Form mit der *simulated annealing omit*-Elektronendichtekarte (gold, auf 1σ konturiert) und der $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ Differenzelektronendichtekarte (grün und rot, konturiert auf $2,5\sigma$ bzw. $-2,5\sigma$). Abb. B-E: Gleicher Bereich, jedoch mit den modellierten Verknüpfungsformen und der jeweils berechneten $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte (blau, konturiert auf 1σ). Abb. B und D: Modellierter Thioether zwischen Met93-S δ -C ϵ -C ϵ -Lys211 (lange Form) alleine (D) und als Mischung zu gleichen Teil mit der offenen Form (B). Abb. C und E: Modellierter Thioether zwischen Met93-S δ -C ϵ -Lys211 (kurze Form) alleine (E) und in Kombination mit der offenen Form (C).

Um diese vorgeschlagenen Verknüpfungen biochemisch zu bestätigen, wurden von Herrn Dr. Karlheinz Mann Experimente durchgeführt, bei denen die Monomere und Dimere der NC1-Kettenfragmente mit bzw. ohne vorheriger Reduktion und Alkylierung mit Trypsin verdaut wurden. Die entstehenden Fragmente wurden der Größe nach aufgetrennt, wobei sich bei der Aminosäureanalyse zeigte, daß der Anteil nach Modifizierung der Cysteine nur unwesentlich von 70 auf 60 % abnahm. Die Größentrennung der reduzierten und alkylierten Monomere bzw. Dimere nach deren tryptischen Verdau führte bei der Aminosäuresequenzanalyse nur bei den Dimeren zur Identifizierung des erwarteten verknüpften Peptids ($\alpha 1$: Asn77-Arg107/Lys204-Arg216; $\alpha 2$: Ser80-Arg107/Tyr189-Arg216; Abbildung 69). In den Monomeren konnte ein solches Peptid nicht gefunden werden. Trypsin konnte nicht nach dem modifizierten Lysin211 spalten. Die späteren Elutionsspitzen enthielten beinahe alle anderen Peptide, die aufgrund der Sequenz zu erwarten waren. Diese Peptide waren zwischen Dimeren und Monomeren identisch.

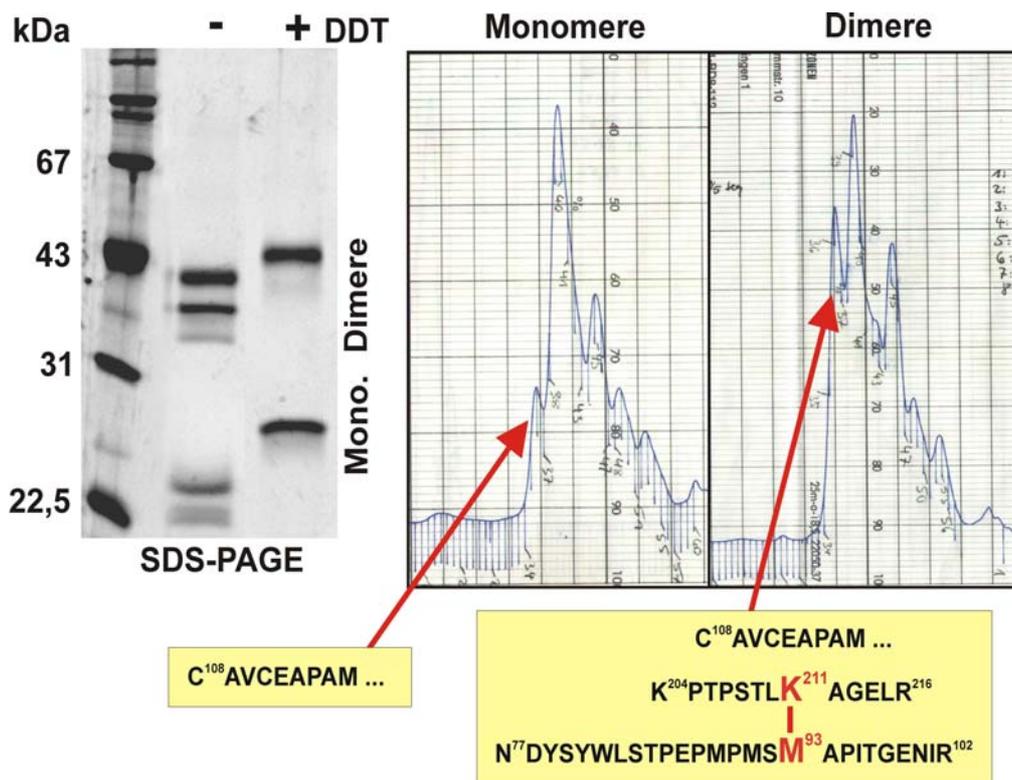


Abbildung 69: Linke Seite: SDS-Gelelektrophorese unter nicht-reduzierenden (-) und unter reduzierenden (+) Bedingungen, bei der die NC1-Monomere und Dimere der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten aufgetrennt werden. Selbst unter denaturierenden Bedingungen sind die Dimere stabil. Rechte Seite: Reduzierte Monomere und Dimere wurden nach tryptischen Verdau aufgetrennt. Bei der Analyse über den Edman-Abbau fand man in den markierten Fraktionen die angegebenen Peptide. Nur bei den Dimeren waren die über Met93 und Lys211 verknüpften Peptide anzutreffen.

Die Analyse der Verknüpfung mittels Edmanabbau machte einen weiteren Verdau mit Chymotrypsin und Endoproteinase Asp-N notwendig um kürzerer Fragmente zu erhalten. Die

Sequenzanalyse ergab, daß sich der größte Teil des Met93 wie ein unmodifiziertes Methionin und der des Lys211 wie ein Hydroxylysin verhielt. Hieraus läßt sich folgern, daß die Seitenverknüpfung unter den sauren und basischen Bedingungen des Edmanabbaus gespalten wird.

7.3.4 Bromidbindung

Bei der Verfeinerung des ersten „nativen“ Datensatz (Nativ1) konnten vier mögliche Bromid- oder Chloridionen nahe der Hexamerverbindungsfläche gefunden werden, die auf eine Verunreinigung mit NaBr über den *cryo-loop* zurückgeführt wurden. Zur Untersuchung der Bindungsaffinität dieser Stellen wurden von Herrn Dr. Gleb P. Bourenkov weitere Datensätze an Kristallen gemessen, die mit einer unterschiedlichen NaBr-Konzentration bzw. einer unterschiedlichen Einwirkungszeit behandelt wurden (Tabelle 16). Während bei einer NaBr-Konzentration von 1 M 73 Bromidionen gebunden waren, so waren es bei 10 mM 12 und sogar bei 1 mM noch 4. Die Positionen der vier Bromidionen waren identisch zu denen des „nativen“ Datensatzes Nativ1.

Tabelle 16: Bestimmung der NaBr-Bindung an NC1-Hexamer bei verschiedenen NaBr-Konzentrationen.

NaBr [mM]	Einwirkungszeit	Gesamtzahl der gebundenen Bromide ^a	Bromide > 10 σ
1000 ^b	30 s	73	34
10	über Nacht	12	10
10	30 s	12	8
1	30 s	4	4
0 (Nativ1) ^c	-	4 ^c	- ^c
0 (Nativ2) ^d	-	0 ^d	- ^d

- a Alle Lagen in der anomalen Differenzfourierkarte, die in allen neun symmetrieverwandten einer Elementarzelle vorhanden waren und mit ihrem Betrag über den der stärksten negativen Lage waren (-5 bis -6 σ).
- b Datensatz, der für die Phasierung mit NaBr verwendet wurde.
- c Diese Lagen wurden an dem als ersten „nativen“ Datensatz (ohne anomale Daten) aufgrund starker Unterschiede in der Elektronendichte und der *B*-Faktoren der umgebenen Reste bestimmt.
- d Es konnten weder durch eine Röntgenfluoreszenzmessung noch im endgültigen Datensatz (ohne anomale Daten) möglichen Bromidionen gefunden werden.

Diese starken Bromidionen wurden von den Aminosäuren Ala74 bis Asp78 (zwischen den β -Strängen I β 6 und I β 7 der Untereinheit I) der Ketten A α 1-1, B α 1-1, A α 2 und B α 2 umgeben und überwiegend von den Hauptkettenstickstoffen der Reste Arg76 und Asp78 koordiniert (z. B. mit einem Abstand für B α 2 von 3,4 Å). Vervollständigt wird die Koordinierung durch zwei Wassermoleküle und die Seitenkette von Arg179 des gegenüberliegenden Trimers. Für das Bromidion innerhalb von B α 2 (Abbildung 70) ergeben sich zu den zwei Wassermolekülen die Abstände 3,1 Å und 3,2 Å sowie 3,6 Å zu dem Arg179-N η von der A α 1-2-Kette. Für die

anderen drei Bromidlagen zeigen sich vergleichbare Werte. Somit formen die das Bromid koordinierten Atome eine verzerrte fünfseitige Pyramide mit dem Bromid an ihrer Spitze. Die Rückseite des Bromids zeigt hingegen keine starke Koordinierung. Basierend auf der Position der Stickstoff- und Sauerstoffatome entstehen offenbar über N-H \cdots Br (Arg76, Asp78, Arg179) und O-H \cdots Br (Wasser) koordinative Bindungen.

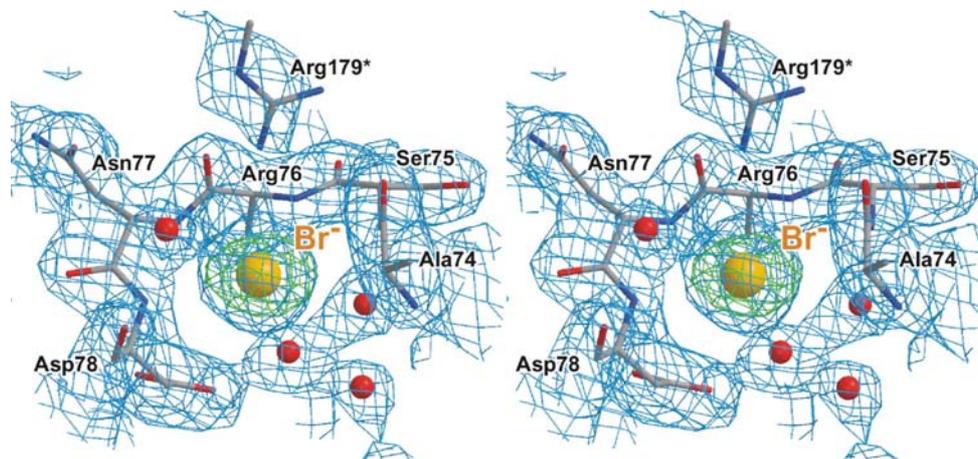


Abbildung 70: Stereodarstellung der verfeinerten Bromidbindungsstelle der Kette Ba2 nach einer Behandlung des Kristalls für 30 s mit 1 mM NaBr. Die das Bromid bindenden Reste sind als Stäbchenmodell, Wasser als rote Bälle und das Bromidion als gelber Ball zusammen mit der $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte (blau, auf 1σ konturiert) und der anomalen Differenzfourierdichtekarte (grün, auf 7σ konturiert) abgebildet. Arg179 ist der einzige Rest, der zur Kette A α 1-2 gehört und wurde deshalb mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Ein Vergleich der vier stärksten Bindungsstellen (Schleife Ala74-Asp78 der Ketten A α 1-1, B α 1-1, A α 2 und B α 2) des endgültigen nativen Datensatzes (Nativ2; ohne gebundenes Bromid) und der entsprechenden Region in A α 1-2 und B α 1-2 zeigen bemerkenswerte Unterschiede in der Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Bei den vier stärksten Lagen bildet das Arg179-N η , das von dem gegenüberliegenden Trimer kommt (B α 1-1, A α 1-1, B α 1-2, A α 1-2) eine Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff von Arg76. An den anderen beiden Stellen (Schleife Ala74-Asp78 der Ketten A α 1-2 and B α 1-2) finden sich Wasserstoffbrücken zwischen Arg179-N ϵ und Ala74-O, Arg179-N η und Gly178-O (die gleiche Kette wie die Schleife) wie auch zwischen Arg179-N η und Pro205-O (A α 2 bzw. B α 2). Das bedeutet, daß die chemisch identischen α 1-Ketten selbst im nativen NC1-Kristall ohne jegliche Bromidbindung strukturelle Unterschiede zeigen.

7.4 Diskussion

Für ein funktionelles Kollagen IV-Netzwerk ist die richtige Dimerisierung der heterotrimeren nicht-kollagenen Domäne NC1 und somit der Bildung eines hexameren Komplexes aus α -Ketten zweier Protomere sehr wichtig. Bisher konnte in allen untersuchten

Basalmembranen ein Gebilde aus vier $\alpha 1$ - und zwei $\alpha 2$ -Ketten identifiziert werden. Weitere Isoformen wurden in den Basalmembranen der glatten Muskulatur ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ und $\alpha 6$; Borza *et al.*, 2001) und der Glomerular ($\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$; Boutaud *et al.*, 2000; Hudson *et al.*, 1993) gefunden.

Durch Anwendung der MAD-Technik in Verbindung mit NaBr-behandelten Kristallen konnten erstmals die Nicht-Isomorphieprobleme, die eine Strukturlösung mit einer anderen Kristallform vor über 15 Jahren verhinderte (Stubbs *et al.*, 1990; Timpl *et al.*, 1985), überwunden werden. Damit war es möglich, die Kristallstruktur des hexameren NC1-Komplexes aus menschlicher Plazenta mit einer Auflösung von 1,9 Å zu lösen. Wenig später gelang es auch einer weiteren Arbeitsgruppe, die Struktur des NC1-Hexamers (in dem Fall das NC1-Hexamer aus der Augenlinsenkapsel vom Rind) aufzuklären (Sundaramoorthy *et al.*, 2002).

Die NC1-Hexamere entsprechen in ihrer Größe und Form den Partikeln, wie sie in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gefunden werden konnten (Dölz *et al.*, 1988; Timpl *et al.*, 1985). Sie bestehen aus zwei trimeren Kappen, die über eine ebene Fläche gegeneinander stehen. Jedes der Trimere besitzt zwei $\alpha 1$ - und ein $\alpha 2$ -Kettenfragment. Die α -Ketten wiederum können in zwei strukturell- und sequentiell-ähnliche Untereinheiten unterteilt werden, so daß eine pseudo-sechszählige Symmetrieachse in den trimeren Kappen entsteht. Die Trimere stabilisieren sich über intensive Strangaustauschinteraktionen zwischen einer fingerähnlichen Haarnadelschleife und einem unvollständigen viersträngigen β -Faltblatt der benachbarten Untereinheit, wodurch es in jeder Untereinheit zur Bildung eines zusammengesetzten sechssträngigen β -Faltblatts kommt. Die Faltblätter der sechs Untereinheiten sind radiär in einem Winkel von 60° um einen zentralen Tunnel angeordnet und formen so einen sechsflügeligen Propeller (Abbildung 71). Im Gegensatz zu einem typischen β -Propeller, wo eine einzige Kette die viersträngigen β -Faltblätter aller Blätter bildet und eine Strangreihenfolge von 1-2-3-4 innerhalb eines β -Faltblattes hat (Fülöp und Jones, 1999; Oubrie *et al.*, 1999), wird beim NC1-Trimer der sechsflügelige Propeller aus drei Ketten aufgebaut. Zudem hat jedes der sechs sechssträngigen β -Faltblätter eine Strangreihenfolge von 4-3-7-5'-6'-8 (die Numerierung entspricht der in Abbildung 67). In einigen der typischen β -Propellerdomänen kommt es zum Ringschluß, der dadurch erreicht wird, daß ein antiparalleles β -Faltblatt aus den beiden Termini der Domäne gebildet wird. Eine solche Anordnung, bei der es bei einem Faltblatt zum Ringschluß kommt, wird als molekularer *Velcro* bezeichnet (Fülöp und Jones, 1999; Oubrie *et al.*, 1999). Das NC1-Trimer

stellt somit einen besonderen *Velcro*-Propeller dar, bei dem durch die fingerähnlichen Haarnadelschleifen und den unvollständigen β -Faltblättern viel stärker ausgeprägte Interaktionen zwischen den einzelnen Flügeln des Propellers entstehen, was dem Trimer wahrscheinlich enorme mechanische Stabilität gibt.

Im Gegensatz zur engen Verzahnung der Ketten innerhalb eines Trimers interagieren die Trimere zweier Protomere über eine große, relativ ebene Verbindungsfläche. Hierbei kommt es nicht zu der vorgeschlagenen Domänenverschiebung (Netzer *et al.*, 1998), sondern zu überwiegend polaren und elektrostatischen Interaktionen. Besonders auffällig ist die Ansammlung vieler negativgeladener Aminosäuren im Bereich des zentralen Tunnels, die durch lösliche Kationen kompensiert werden muß, damit es nicht zum Auseinanderfall des Hexamers kommt.

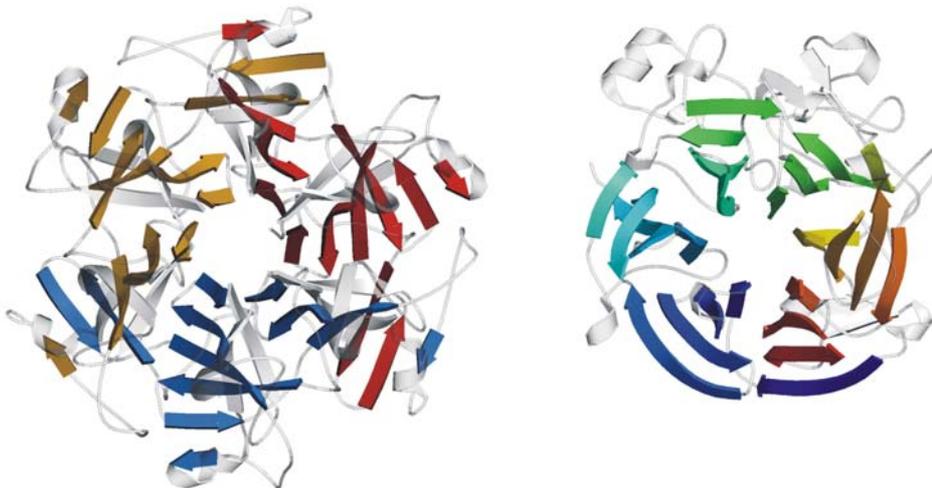


Abbildung 71: Vergleich des untypischen Propellers von NC1 (links) mit einem typischen *Velcro*-Propeller (rechts), wie man ihn bei der Glucosedehydrogenase findet (Oubrie *et al.*, 1999). Während der NC1-Propeller eine 4-3-7-5'-6'-8-Topologie hat und aus drei Ketten besteht, liegt bei einem typischen *Velcro*-Propeller eine W-Topologie vor. Außerdem bilden der erste und letzte Strang ein gemeinsames Blatt.

7.4.1 Methionin-Lysin-Seitenkettenverknüpfung

Nicht nur unter nicht-reduzierenden sondern auch unter reduzierenden Bindungen können gereinigte und dissoziierte NC1-Hexamere in Monomere und Dimere von α -Ketten getrennt werden (Abbildung 69, (Ries *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1988; Weber *et al.*, 1984)). Lange Zeit war es nicht klar, wie die NC1-Domänen es schaffen, solch stabile Dimere zu bilden. Von Siebold *et al.* (Siebold *et al.*, 1988) wurde vorgeschlagen, daß zwei α -Ketten der sich gegenüberstehenden Trimere miteinander über Disulfidbrücken verknüpft sind. Der Anteil an α -Kettendimeren variiert zwischen den Basalmembranen verschiedener Gewebe. Es konnte an den Basalmembranen vom Rind gezeigt werden, daß in Glomerula und Plazenta mehr

α -Kettendimere als in der Augenlinsenkapsel vorhanden sind (Langeveld *et al.*, 1988). Durch Aufklärung der NC1-Hexamer-Kristallstrukturen aus der menschlichen Plazenta und aus der Augenlinse vom Rind (Sundaramoorthy *et al.*, 2002) war es möglich, Disulfidbrücken zwischen zwei NC1-Trimeren auszuschließen. Die NC1-Kristallstruktur aus der menschlichen Plazenta zeigte hingegen eine ganz andere, neue Seitenkettenverknüpfung zwischen zwei α -Ketten. Während der kristallographischen Verfeinerung wurden die Seitenketten von Met93 und Lys211 zweier sich gegenüberstehender α -Ketten soweit unterhalb normaler van der Waals-Abstände zusammengeführt, daß die verbleibende Elektronendichte nicht durch eine nicht-kovalente Bindung erklärt werden konnte. Die genauere Untersuchung der Elektronendichtekarte zwischen Met93-S δ und Lys211-N ζ gab Anlaß zur Vermutung, daß es sich hier um eine neuartige Seitenkettenverknüpfung handeln könnte (Abbildung 68).

Tatsächlich sind für andere Kollagene kovalente Verknüpfungen zwischen Seitenketten der Reste Lysin und Hydroxylysin beschrieben worden (Henkel, 1996; van der Rest und Mayne, 1988; Wu und Eyre, 1995; Yamauchi *et al.*, 1986), die durch Lysylhydroxylasen und Oxidasen über Aldehyd-Intermediate erzeugt werden (Hanson und Eyre, 1996). Solche posttranslationalen Modifikationen variieren mit dem Gewebetyp und sind normalerweise auf die nicht-kollagenen Domänen der Kollagene beschränkt. Nichtsdestotrotz wurde bisher von keiner Verknüpfung berichtet, bei der eine Methioninseitenkette beteiligt ist. Die Trennung der Peptide von proteolytischverdauten $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten und die nachfolgende Sequenzierung über den Edmanabbau zeigte deutlich, daß Dimere nicht aber Monomere das erwartete kovalent verknüpfte Peptid enthielten (Abbildung 69). Es konnte damit die kovalente Met93-Lys211-Verknüpfung bestätigt werden, die allerdings unter den rauen Bedingungen des Edmanabbaus gespalten wurde. Die sich ergebenden Reste deuteten auf ein unmodifiziertes Methionin und ein Hydroxylysin hin.

Leider konnten weder die biochemischen Ergebnisse noch die Elektronendichtekarte mit einer Auflösung von 1,9 Å die genaue Chemie und Konformation der Verknüpfung aufklären. Aus diesem Grund wurden mehrere Thioether-Verknüpfungen modelliert und gegen die Elektronendichtekarte verfeinert. Die Modelle basierten auf der Beobachtung, daß das Met93-S δ -Atom bei 2 bis 5 σ in der $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte sichtbar ist. Zudem wurde entweder N ζ vom Lysin als Abgangsgruppe angenommen oder es wurde davon ausgegangen, daß eine andere mögliche Reaktion zwischen Methionin (oder einem Derivat davon) und einem Lysin- oder Hydroxylysinaldehyd als Produkt der Lysyloxidaseaktivität erfolgt.

Unter den kovalenten Verknüpfungsmodellen besitzt die kurze Form (Met93-S δ -C ϵ -Lys211; Abbildung 68, E) besonders bei den Seitenkettenatomen die entspannteste Konformation und paßt gleichzeitig besser in die beobachtete Dichte als eine längere Form (Abbildung 68, D). Aber es hat sich auch herausgestellt, daß weder die offene Form noch eine der verknüpften Modelle alleine die resultierende Elektronendichtekarte erklären konnten. Entsprechend der Beobachtung von Monomeren und Dimeren in der Gelelektrophorese wurden Mischungen aus offenen und verknüpften Formen im Verhältnis 1:1 untersucht, die zu einer deutlich besseren Elektronendichtekarte führten. Aufgrund einer Auflösung von 1,9 Å war es jedoch nicht möglich, eine genaue Verfeinerung der Positionen, der *B*-Faktoren und der Besetzungszahlen durchzuführen noch die leichten Atome (N, C, O) an Hand ihres Streuverhaltens zu unterscheiden. Es deutet alles auf eine kovalente Verknüpfung in Verbindung mit einer unverbundenen Form zwischen Met93 und Lys211 hin, doch die Form, wie z. B. mögliche Verzweigungen durch Hydroxylysin, läßt sich mit unseren Daten nicht endgültig bestimmen.

In Übereinstimmung mit der gewebespezifischen Verteilung von Dimeren (Langeveld *et al.*, 1988) wurde einerseits in der Kristallstruktur der NC1-Domäne der Augenlinsenkapsel (Sundaramoorthy *et al.*, 2002) keine solche Verknüpfung gefunden, andererseits wird sie für $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$ -Hexamere der menschlichen Glomerularbasalmembran auf der Grundlage von Immunopräzipitationsversuchen vermutet (Borza *et al.*, 2002). Es scheint daher, daß die kovalente Verknüpfung nicht für alle Gewebetypen essentiell ist. Offenbar ist der sechsflügelige Propeller mit seinen zusammengesetzten β -Faltblättern und der großen Protomer-Protomer-Verbindungsfläche für die Stabilität der Hexamere ausreichend. Demgegenüber ist die Verknüpfung nicht auf die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten beschränkt, sondern möglicherweise mehr von der besonderen Funktion der verschiedenen Basalmembranen abhängig. Ob bei dem Verknüpfungsprozeß ein Enzym beteiligt ist und ob es dabei zur Ausbildung eines Aldehyd-Intermediats kommt, ähnlich wie bei der Verknüpfung von zwei Lysinen oder Hydroxylysinen, (Hanson und Eyre, 1996) ist ungewiß. Sollte jedoch ein Enzym involviert sein, dann wäre denkbar, daß die Verknüpfung abhängig der Enzymverteilung ist und möglicherweise auch mit der Gewebereifung korreliert.

7.4.2 Bromidbindung

Die zufällige Kontamination des ersten „nativen“ Datensatzes (Nativ1) durch sehr geringe Natriumbromidmengen führte zu der Entdeckung von vier möglichen Bromidbindungsstellen in der Schleife Ala74-Asp78 der Ketten A α 1-1, B α 1-1, A α 2 und B α 2 (aber nicht A α 1-2 und

B α 1-2). Die kristallographischen Untersuchungen mehrerer mit verschiedenen NaBr-Konzentrationen behandelter Kristalle (Tabelle 16) zeigten, daß diese Stellen selbst bei einer Konzentration von 1 mM NaBr eine hohe Besetzungszahl hatten. Bei höheren Konzentrationen banden Bromidionen auch an anderen Stellen des NC1-Hexamers. Der endgültige native Datensatz (Nativ2), der für die Struktur verwendet wurde, hatte keine Kontamination mit NaBr und besaß auch keine gebundenen Bromide. Die Beobachtung, daß auf der einen Seite Bromidionen sehr stark gebunden werden und auf der anderen Seite im wirklichen nativen Datensatz fehlten, schließt nicht notwendigerweise eine physiologische Rolle der vier Bindungsstellen für die Ionenbindung aus. Denkbar wäre zum Beispiel, daß unter physiologischen Bedingungen die Stellen besetzt waren, aber während der Reinigung der Hexamere ausgewaschen wurden. Eine andere Möglichkeit wäre, daß eine Besetzung und Bedeutung der Ionenbindungsstellen nur während der Zusammenlagerung des Hexamers vorliegt, aber die physiologische Rolle im reifen Hexamer verloren geht. Letztendlich bleibt jedoch eine mögliche physiologische Bedeutung unklar.

Interessanterweise unterscheiden sich die vier starken Bindungsstellen in einigen Wasserstoffbrücken selbst dann von den entsprechenden Regionen der α 1-2- und β 1-2-Ketten, wenn gar keine Bromidionen gebunden sind. Ähnliche prinzipielle Unterschiede sind auch bei den vergleichbaren sechs Bindungsstellen innerhalb NC1-Kristallstruktur aus der Augenslinsenkapself vom Rind zu beobachten, wo alle sechs Stellen mit Bromiden besetzt sind (Sundaramoorthy *et al.*, 2002). Diese Daten deuten daraufhin, daß es kleine strukturelle Unterschiede zwischen den hochkonservierten und sogar zwischen chemisch identischen α 1- und α 2-Ketten gibt. In einigen Aspekten scheinen die beiden α 1-Ketten unterschiedlicher zu sein, als die chemisch unterschiedlichen Ketten α 1-1 und α 2-Ketten zueinander. Die starken Bromidbindungsgebiete liegen benachbart den kurzen helix-ähnlichen Schleifen (Glu197-Lys204) der α 1-Ketten, die in den entsprechenden Bereichen der α 2-Ketten fehlen. Stattdessen bildet der Bereich Phe57-Thr59 der α 2-Kette mit der benachbarten Kette α 1-2 ein kurzes paralleles Faltblatt. Aufgrund dieser Interaktionen wurde dem Bereich eine Rolle bei der Bestimmung der Kettenstöchiometrie der α -Ketten eines NC1-Hexamers zugesprochen (Sundaramoorthy *et al.*, 2002). Die Region zwischen den Resten 197 und 204 ist bei den verschiedenen NC1-Isoformen nicht konserviert und zeigt große strukturelle Unterschiede zwischen den Kristallstrukturen aus der Augenslinsenkapself vom Rind und der aus der menschlichen Plazenta, obwohl der grobe Aufbau sehr ähnlich ist. Betrachtet man die ansonsten hohen strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den α 1- und α 2-Ketten und sehr

wahrscheinlich auch bei den Ketten $\alpha 3$ bis $\alpha 6$, so sorgen möglicherweise gerade diese kleinen Unterschiede für die richtige Auswahl der Ketten beim Zusammenbau der unterschiedlichen NC1-Hexamere. Eine klare Antwort auf die Frage der Kettenselektionierung könnten weitere Experimente wie zum Beispiel die Strukturaufklärung von $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 5$ - $\alpha 6$ (IV)- und $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$ (IV)-Hexameren, Mutationsanalysen und Dissoziations-/Reassoziations-Untersuchungen geben.

8 Abkürzungen und kristallographische Begriffe

$2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$	Elektronendichtekarte
APS	Ammoniumpersulfat
AU	asymmetrische Einheit
B	$=8\pi^2 u^2$; Debye-Waller-Faktor
BW6	Wiggler Beamline BW6 des Deutschen Elektronen Synchrotrons
C	C-Seiten-zentrierter Braivais-Gittertyp
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CVFF	<i>consistent valence forcefield</i>
$C\alpha$	α -Helix der katalytischen Domäne
d_{hkl}^*	reziproker Netzebenenabstand d_{hkl}^*
Dec-RVKR-CMK	Dekanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chloromethylketon
d_{hkl}	Abstand der Netzebenen hkl
ER	Endoplasmatische Retikulum
ERGIC	ER-Golgi-intermediäre Kompartiment
F^-	$\left \mathbf{F}_{hkl}^- \right $
$f''(\lambda)$	anomaler Term
f	$f_{\text{iso}}(\theta)$
F	flächenzentrierter Braivais-Gittertyp
F_{obs}	Strukturfaktoramplituden, die aus den gemessenen Intensitäten resultieren
F_{calc}	Strukturfaktoramplituden, die aus den Koordinaten einer Proteinstruktur berechnet wurden
$f(\theta)$	Atomformfaktor
F^+	$\left \mathbf{F}_{hkl}^+ \right $
$f_{\text{ano}}(\theta, \lambda)$	anomaler Atomformfaktor
F_{hkl}	Strukturfaktor
$f_{\text{iso}}(\theta)$	isotrope Streuamplitude
$F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$	Differenzelektronendichtekarte
FOM	<i>figure of merit</i> ; Charakterisierung der Qualität der experimentell ermittelten Proteinphase als Kosinus des mittleren Phasenfehlers
<i>fur</i>	<i>c-fes/fps upstream region</i>
H	als Index: Beitrag des anomalen Streuers
HEK-293	<i>human embryonic kidney 293</i>
hkl	Netzebenschar bzw. Miller'sche Indizes
I	innenzentrierter Braivais-Gittertyp
I_{hkl}	Intensität
KEX2	<i>killer expression defective</i>
K_i	Dissoziationskonstante eines Inhibitors
L	Lorentz-Faktor
LPC	<i>lymphoma chromosomal rearrangement</i>
MAD	<i>Multiwavelength Anomalous Dispersion</i>
M_r	Molekulargewicht
NC1	nicht-kollagene Domäne 1 (<i>non-collagenous domain NC1</i>)
NCS	nicht-kristallographische Symmetrie (<i>non crystallographic symmetry</i>)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
P	primitiver Braivais-Gittertyp; als Index: Beitrag des Proteins
$P(u, v, w)$	Pattersonfunktion

PACE	<i>paired basic amino acid residue cleaving enzyme</i>
PCs	Proproteinkonvertasen (<i>proprotein convertases</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pERTKR-amc	fluorogenes Substrat
PH	als Index: Beitrag des Proteins zusammen mit dem, des anomalen Streuers
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P β	β -Faltblatt der P-Domäne
R	rhomboedrisch zentrierter Braavis-Gittertyp
R-Faktor	Beschreibung der Qualität einer verfeinerten Kristallstruktur, $R = \frac{\sum_{hkl} \ F_{obs} - k F_{calc} \ }{\sum_{hkl} F_{obs} }$
R _{free}	freier R-Faktor, wie R-Faktor nur berechnet aus einem festgelegten Testbereich von Reflexen (z. B. 5 % der gemessenen Reflexe). Die Reflexe des Testbereichs werden nicht für die Verfeinerung verwendet.
RIP	strahlenschadeninduzierte Phasierung (<i>radiation damage-induced phasing</i>)
R _{merge}	R-Faktor für den Vergleich von vereinigten Datensätzen
R _{sym}	= $\sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i} - \langle I \rangle_{hkl} / \sum_{hkl} \sum_i \langle I \rangle_{hkl}$ mit $\langle I \rangle_{hkl}$ für die durchschnittliche Intensität der <i>i</i> Beobachtungen eines gegebenen Reflexes. R _{sym} beschreibt die Qualität eines Datensatzes als Funktion der Übereinstimmung symmetrieverwandter Reflexe.
SCR	strukturkonservierter Bereich (<i>structurally conserved region</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIR	<i>single isomorphous replacement</i>
SPC	<i>subtilisin-like proprotein convertases</i>
SS1, SS2, SS3	Datensätze, gemessen an den triklinen Kristallen zur RIP-Phasierung
TGN	Transgolginetzwerk
<i>u</i>	mittlere Auslenkungsamplitude
V	Volumen
VR	variabler Bereich (<i>variable region</i>)
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\alpha 1(IV)$, $\alpha 2(IV)$	$\alpha 1$ - bzw. $\alpha 2$ -Kette von Kollagen IV
α_1 -PDX	α_1 -antitrypsin Portland
γ_{hor} , γ_{ver}	horizontaler und vertikaler Röntgenstrahldivergenzwinkel
$\Delta f'(\lambda)$	dispersiver Term
ΔF_{ano}	anomale Differenz
$\Delta \lambda / \lambda$	spektrale Bandbreite
$\Delta \varphi$	Winkelinkrement
ζ^2	reziproke Koordinaten
η	Mosaizität. Fehlordnung im Kristall, die dazu führt, daß ein Reflex über einen bestimmten Winkelbereich hin beobachtet werden kann.
θ_{hkl}	Einfalls- bzw. Ausfallswinkel
λ	Wellenlänge
$\rho(x, y, z)$	Elektronendichteverteilung
Φ_{hkl}	= $2\pi (hx + ky + lz)$, Phasenverschiebung bezüglich der Netzebene <i>hkl</i>
φ_R	Reflexionsbereich
Å	10 ⁻¹⁰ Meter

9 Literatur

- Alexander, P.A., Ruan, B. and Bryan, P.N. (2001a) Cation-dependent stability of subtilisin. *Biochemistry*, **40**, 10634-10639.
- Alexander, P.A., Ruan, B., Strausberg, S.L. and Bryan, P.N. (2001b) Stabilizing mutations and calcium-dependent stability of subtilisin. *Biochemistry*, **40**, 10640-10644.
- Anderson, E.D., Vanslyke, J.K., Thulin, C.D., Jean, F. and Thomas, G. (1997) Activation of the Furin Endoprotease Is a Multiple-Step Process - Requirements For Acidification and Internal Propeptide Cleavage. *EMBO Journal*, **16**, 1508-1518.
- Angliker, H., Wikstrom, P., Shaw, E., Brenner, C. and Fuller, R.S. (1993) The synthesis of inhibitors for processing proteinases and their action on the Kex2 proteinase of yeast. *Biochem J*, **293**, 75-81.
- Ayoubi, T.A., Creemers, J.W., Roebroek, A.J. and Van de Ven, W.J. (1994) Expression of the dibasic proprotein processing enzyme furin is directed by multiple promoters. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 9298-303.
- Barton, G.J. (1993) ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. *Protein Engineering*, **6**, 37-40.
- Bellamy, H.D., Snell, E.H., Lovelace, J., Pokross, M. and Borgstahl, G.E. (2000) The high-mosaicity illusion: revealing the true physical characteristics of macromolecular crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56**, 986-95.
- Bellamy, H.D., Snell, E.H., Lovelace, J., Pokross, M. and Borgstahl, G.E. (2004) The high-mosaicity illusion: revealing the true physical characteristics of macromolecular crystals. Erratum. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**, 619.
- Bevan, A., Brenner, C. and Fuller, R.S. (1998) Quantitative Assessment of Enzyme Specificity in Vivo - P-2 Recognition By Kex2 Protease Defined in a Genetic System. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 10384-10389.
- Blow, D.M. and Crick, F.H.C. (1959) The Treatment of Errors in the Isomorphous Replacement Method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **12**, 794-802.
- Blume, H., Bosecke, P., Bourenkov, G.P., Kosciuszka, D. and Bartunik, H.D. (2001) The protein crystallography beamline BW6 at DORIS - automatic operation and high-throughput data collection. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section A Accelerators Spectrometers Detectors & Associated Equipment*, **467**, 1358-1362.
- Bode, W., Papamokos, E. and Musil, D. (1987) The high-resolution X-ray crystal structure of the complex formed between subtilisin Carlsberg and eglin c, an elastase inhibitor from the leech *Hirudo medicinalis*. Structural analysis, subtilisin structure and interface geometry. *European Journal of Biochemistry*, **166**, 673-92.
- Borza, D.B., Bondar, O., Ninomiya, Y., Sado, Y., Naito, I., Todd, P. and Hudson, B.G. (2001) The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the alpha 1, alpha 2, alpha 5, and alpha 6 chains in smooth muscle basement membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 28532-40.
- Borza, D.B., Bondar, O., Todd, P., Sundaramoorthy, M., Sado, Y., Ninomiya, Y. and Hudson, B.G. (2002) Quaternary organization of the goodpasture autoantigen, the alpha 3(IV) collagen chain. Sequestration of two cryptic autoepitopes by intrapromoter interactions with the alpha4 and alpha5 NC1 domains. *J Biol Chem*, **277**, 40075-83.
- Borza, D.B., Netzer, K.O., Leinonen, A., Todd, P., Cervera, J., Saus, J. and Hudson, B.G. (2000) The goodpasture autoantigen. Identification of multiple cryptic epitopes on the NC1 domain of the alpha3(IV) collagen chain. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 6030-7.

- Boutaud, A., Borza, D.B., Bondar, O., Gunwar, S., Netzer, K.O., Singh, N., Ninomiya, Y., Sado, Y., Noelken, M.E. and Hudson, B.G. (2000) Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J Biol Chem*, **275**, 30716-24.
- Brünger, A.T. (1992) The Free R Value: a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures. *Nature*, **355**, 462-474.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grossekunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998) Crystallography and NMR system- a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica*, 906-921.
- Bruzzaniti, A., Goodge, K., Jay, P., Taviaux, S.A., Lam, M.H.C., Berta, P., Martin, T.J., Moseley, J.M. and Gillespie, M.T. (1996) PC8, a New Member of the Convertase Family. *Biochemical Journal*, **314**, 727-731.
- Buth, G., Kölln, I. and Bartunik, H.D. (1996) *Rev Sci Instrum*, **67**, 3369.
- Cameron, A., Appel, J., Houghten, R.A. and Lindberg, I. (2000) Polyarginines are potent furin inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 36741-36749.
- CCP4. (1994) Collaborative Computational Project: The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr D*, Vol. 50, pp. 760-763.
- Chan, S.J., Oliva, A.A., Jr., LaMendola, J., Grens, A., Bode, H. and Steiner, D.F. (1992) Conservation of the prohormone convertase gene family in metazoa: analysis of cDNAs encoding a PC3-like protein from hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **89**, 6678-82.
- Chretien, M. and Li, C.H. (1967) Isolation, purification, and characterization of gamma-lipotropic hormone from sheep pituitary glands. *Canadian Journal of Biochemistry.*, **45**, 1163-1174.
- Constam, D.B., Calfon, M. and Robertson, J.J. (1996) Spc4, Spc6, and the Novel Protease Spc7 Are Coexpressed With Bone Morphogenetic Proteins At Distinct Sites During Embryogenesis. *Journal of Cell Biology*, **134**, 181-191.
- Creemers, J.W., Vey, M., Schafer, W., Ayoubi, T.A., Roebroek, A.J., Klenk, H.D., Garten, W. and Van de Ven, W.J. (1995) Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry.*, **270**, 2695-2702.
- Creemers, J.W.M., Siezen, R.J., Roebroek, A.J.M., Ayoubi, T.A.Y., Huylebroeck, D. and Van de Ven, W.J.M. (1993) Modulation of Furin-mediated Proprotein Processing Activity by Site-directed Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 21826-21834.
- Dauber-Osguthorpe, P., Roberts, V.A., Osguthorpe, D.J., Wolff, J., Genest, M. and Hagler, A.T. (1988) Structure and Energetics of Ligand Binding to Proteins Escherichia-Coli Dihydrofolate Reductase-Trimethoprim a Drug-Receptor System. *Proteins: Structure, Function, & Genetics*, **4**, 31-47.
- Davidson, H.W., Rhodes, C.J. and Hutton, J.C. (1988) Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic beta cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature.*, **333**, 93-6.
- DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- Denault, J.B., Bissonnette, L., Longpre, J.M., Charest, G., Lavigne, P. and Leduc, R. (2002) Ectodomain shedding of furin: kinetics and role of the cysteine-rich region. *FEBS Letters*, **527**, 309-314.
- Discover. (1994) Molecular simulations Inc., San Diego, CA.
- Dölz, R., Engel, J. and Kühn, K. (1988) Folding of collagen IV. *European Journal of Biochemistry.*, **178**, 357-66.

- Duckert, P., Brunak, S. and Blom, N. (2004) Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Engineering, Design and Selection*, **17**, 107-112.
- Duguay, S.J., Milewski, W.M., Young, B.D., Nakayama, K. and Steiner, D.F. (1997) Processing of Wild-type and Mutant Proinsulin-like Growth Factor-IA by Subtilisin-related Proprotein Convertases. *J. Biol. Chem.*, **272**, 6663-6670.
- Dwek, R.A. (1996) Glycobiology - Toward Understanding the Function of Sugars. *Chemical Reviews*, **96**, 683-720.
- Engh, R. and Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallography A*, **47**.
- Esnouf, R.M. (1999) Further additions to MolScript version 1.4, including reading and contouring of electron-density maps. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **55**, 938-940.
- Fessler, L.I. and Fessler, J.H. (1982) Identification of the carboxyl peptides of mouse procollagen IV and its implications for the assembly and structure of basement membrane procollagen. *Journal of Biological Chemistry*, **257**, 9804-10.
- Fuller, R.S., Brake, A. and Thorner, J. (1989a) Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 1434-8.
- Fuller, R.S., Brake, A.J. and Thorner, J. (1989b) Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science*, **246**, 482-486.
- Fuller, R.S., Sterne, R.E. and Thorner, J. (1988) Enzymes required for yeast prohormone processing. *Annu Rev Physiol*, **50**, 345-62.
- Fülöp, V. and Jones, D.T. (1999) Beta propellers: structural rigidity and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, **9**, 715-21.
- Gallagher, T., Gilliland, G., Wang, L. and Bryan, P. (1995) The prosegment-subtilisin bpn complex - crystal structure of a specific foldase. *Structure*, **3**, 907-914.
- Garman, E. and Murray, J.W. (2003) Heavy-atom derivatization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59**, 1903-13.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. and Bairoch, A. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3784-8.
- Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, **182**, 319-26.
- Gunwar, S., Ballester, F., Noelken, M.E., Sado, Y., Ninomiya, Y. and Hudson, B.G. (1998) Glomerular basement membrane. Identification of a novel disulfide-cross-linked network of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of Alport syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 8767-75.
- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D. and Garten, W. (1992) Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature*, **360**, 358-61.
- Hanson, D.A. and Eyre, D.R. (1996) Molecular site specificity of pyridinoline and pyrrole cross-links in type I collagen of human bone. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 26508-16.
- Hatsuzawa, K., Hosaka, M., Nakagawa, T., Nagase, M., Shoda, A., Murakami, K. and Nakayama, K. (1990) Structure and expression of mouse furin, a yeast Kex2-related protease. Lack of processing of coexpressed prorenin in GH4C1 cells. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 22075-8.

- Hatsuzawa, K., Murakami, K. and Nakayama, K. (1992a) Molecular and enzymatic properties of furin, a Kex2-like endoprotease involved in precursor cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg sites. *J Biochem (Tokyo)*, **111**, 296-301.
- Hatsuzawa, K., Nagahama, M., Takahashi, S., Takada, K., Murakami, K. and Nakayama, K. (1992b) Purification and characterization of furin, a Kex2-like processing endoprotease, produced in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, **267**, 16094-9.
- Helliwell, J.R., Ealick, S., Doing, P., Irving, T. and Szebenyi, M. (1993) Towards the measurement of ideal data for macromolecular crystallography using synchrotron sources. *Acta Crystallographica Section D*, **49**, 120-128.
- Henkel, W. (1996) Cross-link analysis of the C-telopeptide domain from type III collagen. *Biochem J*, **318**, 497-503.
- Holyoak, T., Kettner, C.A., Petsko, G.A., Fuller, R.S. and Ringe, D. (2004) Structural basis for differences in substrate selectivity in Kex2 and furin protein convertases. *Biochemistry*, **43**, 2412-21.
- Holyoak, T., Wilson, M.A., Fenn, T.D., Kettner, C.A., Petsko, G.A., Fuller, R.S. and Ringe, D. (2003) 2.4 angstrom resolution crystal structure of the prototypical hormone-processing protease Kex2 in complex with an Ala-Lys-Arg boronic acid inhibitor. *Biochemistry*, **42**, 6709-6718.
- Homology. (2000) Molecular simulations Inc., San Diego, CA.
- Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W.S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K. and Nakayama, K. (1991) Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 12127-30.
- Hudson, B.G., Reeders, S.T. and Tryggvason, K. (1993) Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 26033-6.
- Ikehara, Y., Oda, K. and Kato, K. (1976) Conversion of proalbumin into serum albumin in the secretory vesicles of rat liver. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **72**, 319-26.
- Insight II. (2000) Molecular simulations Inc., San Diego, CA.
- Jean, F., Boudreault, A., Basak, A., Seidah, N.G. and Lazure, C. (1995) Fluorescent Peptidyl Substrates As an Aid in Studying the Substrate Specificity of Human Prohormone Convertase Pcl and Human Furin and Designing a Potent Irreversible Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 19225-19231.
- Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G.P., Xiang, Y., Reason, A.J. and Thomas, G. (1998) Alpha(1)-Antitrypsin Portland, a Bioengineered Serpin Highly Selective For Furin - Application As an Antipathogenic Agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 7293-7298.
- Jones, B.G., Thomas, L., Molloy, S.S., Thulin, C.D., Fry, M.D., Walsh, K.A. and Thomas, G. (1995) Intracellular Trafficking of Furin Is Modulated By the Phosphorylation State of a Casein Kinase II Site in Its Cytoplasmic Tail. *EMBO Journal*, **14**, 5869-5883.
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R. and Thorner, J. (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell*, **37**, 1075-1089.
- Kendrew, J.C., Bodo, G., Dintzis, H.M., Parrish, R.G., Wyckoff, H. and Phillips, D.C. (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*, **181**, 662-6.

- Kiefer, M.C., Tucker, J.E., Joh, R., Landsberg, K.E., Saltman, D. and Barr, P.J. (1991) Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA & Cell Biology*, **10**, 757-69.
- Kiefersauer, R., Than, M.E., Dobbek, H., Gremer, L., Melero, M., Strobl, S., Dias, J.M., Soulimane, T. and Huber, R. (2000) A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes. *Journal of Applied Crystallography*, **33**, 1223-1230.
- Knäblein, J., Neufeind, T., Schneider, F., Bergner, A., Messerschmidt, A., Löwe, J., Steipe, B. and Huber, R. (1997) Ta6Br122+, a tool for phase determination of large biological assemblies by X-ray crystallography1. *Journal of Molecular Biology*, **270**, 1-7.
- Kraulis, P.J. (1991) MOLSCRIPT: A Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography*, **24**, 946-950.
- Krysan, D.J., Rockwell, N.C. and Fuller, R.S. (1999) Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 23229-34.
- Kühn, K. (1995) Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biology*, **14**, 439-45.
- Kunz, R.W. (1991) *Molecular Modelling für Anwender, Anwendung von Kraftfeld- und MO-Methoden in der organischen Chemie*. B. G. Teubner, Stuttgart.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Langeveld, J.P., Wieslander, J., Timoneda, J., McKinney, P., Butkowski, R.J., Wisdom, B.J., Jr. and Hudson, B.G. (1988) Structural heterogeneity of the noncollagenous domain of basement membrane collagen. *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 10481-8.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. and Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*, **26**, 283-291.
- Lazure, C., Gauthier, D., Jean, F., Boudreault, A., Seidah, N.G., Bennett, H.P.J. and Hendy, G.N. (1998) In Vitro Cleavage of Internally Quenched Fluorogenic Human Parathyroid Hormone and Parathyroid-related Peptide Substrates by Furin. Generation of a Potent Inhibitor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8572-8580.
- Leduc, R., Molloy, S.S., Thorne, B.A. and Thomas, G. (1992) Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 14304-8.
- Leslie, A.G.W. (1991) MOSFLM (SERC Laboratory, Darebury, Warrington, U.K.).
- Lipkind, G.M., Zhou, A. and Steiner, D.F. (1998) A Model For the Structure of the P Domains in the Subtilisin-Like Prohormone Convertases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 7310-7315.
- Lu, G.G. (2000) TOP: a new method for protein structure comparisons and similarity searches. *Journal of Applied Crystallography*, **33**, 176-183.
- Lusson, J., Benjannet, S., Hamelin, J., Savaria, D., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1997) The integrity of the rrgdl sequence of the proprotein convertase pc1 is critical for its zymogen and c-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochemical Journal*, **326**, 737-744.
- Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1993) cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 6691-5.
- Meerabux, J., Yaspo, M.L., Roebroek, A.J., Van de Ven, W.J., Lister, T.A. and Young, B.D. (1996) A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at a chromosome translocation breakpoint in lymphomas. *Cancer Research*, **56**, 448-51.

- Merritt, E.A. and Bacon, D.J. (1997) Raster3D Photorealistic Molecular Graphics. *Methods in Enzymology*, **277**, 505-527.
- Misumi, Y., Oda, K., Fujiwara, T., Takami, N., Tashiro, K. and Ikehara, Y. (1991) Functional expression of furin demonstrating its intracellular localization and endoprotease activity for processing of proalbumin and complement pro-C3. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 16954-9.
- Moehring, J.M. and Moehring, T.J. (1983) Strains of CHO-K1 cells resistant to Pseudomonas exotoxin A and cross-resistant to diphtheria toxin and viruses. *Infection & Immunity*, **41**, 998-1009.
- Molloy, S.S., Anderson, E.D., Jean, F. and Thomas, G. (1999) Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends in Cell Biology*, **9**, 28-35.
- Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R. and Thomas, G. (1992) Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem*, **267**, 16396-402.
- Molloy, S.S. and Thomas, G. (2001) Furin. Academic Press, San Diego, CA, Vol. 22, pp. 199-235.
- Molloy, S.S., Thomas, L., VanSlyke, J.K., Stenberg, P.E. and Thomas, G. (1994) Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO Journal*, **13**, 18-33.
- Moulard, M. and Decroly, E. (2000) Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, **1469**, 121-132.
- Nakagawa, T., Hosaka, M., Torii, S., Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. (1993) Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE4. *Journal of Biochemistry*, **113**, 132-5.
- Nakayama, K. (1997) Furin - a mammalian subtilisin/kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochemical Journal*, **327**, 625-635.
- Nakayama, K., Hosaka, M., Hatsuzawa, K. and Murakami, K. (1991) Cloning and functional expression of a novel endoprotease involved in prohormone processing at dibasic sites. *Journal of Biochemistry*, **109**, 803-6.
- Nakayama, K., Kim, W.S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T. and Murakami, K. (1992) Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. Its testis-specific expression. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 5897-900.
- Navaza, J. (1987) On the fast rotation function. *Acta Crystallogr*, **43**, 645-653.
- Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol*, **48**, 443-53.
- Netzer, K.O., Suzuki, K., Itoh, Y., Hudson, B.G. and Khalifah, R.G. (1998) Comparative analysis of the noncollagenous NC1 domain of type IV collagen: identification of structural features important for assembly, function, and pathogenesis. *Protein Sci*, **7**, 1340-51.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. and Honig, B. (1993) Grasp: graphical representation and analysis of surface properties. *Biophysical Journal*, **64**.
- Oberbäumer, I., Wiedemann, H., Timpl, R. and Kühn, K. (1982) Shape and assembly of type IV procollagen obtained from cell culture. *EMBO Journal*, **1**, 805-10.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillations mode. *Methods in Enzymology*, **276**, 307-326.

- Oubrie, A., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Duine, J.A. and Dijkstra, B.W. (1999) The 1.7 Å crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* reveals a novel internal conserved sequence repeat. *J Mol Biol*, **289**, 319-33.
- Pantoliano, M.W., Whitlow, M., Wood, J.F., Rollence, M.L., Finzel, B.C., Gilliland, G.L., Poulos, T.L. and Bryan, P.N. (1988) The engineering of binding affinity at metal ion binding sites for the stabilization of proteins: subtilisin as a test case. *Biochemistry*, **27**, 8311-7.
- Perrakis, A., Morris, R. and Lamzin, V.S. (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat Struct Biol*, **6**, 458-63.
- Perutz, M.F. (1956) Isomorphous replacement and phase determination in non-centrosymmetric space groups. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **9**, 867-873.
- Petitclerc, E., Boutaud, A., Prestayko, A., Xu, J., Sado, Y., Ninomiya, Y., Sarras, M.P., Jr., Hudson, B.G. and Brooks, P.C. (2000) New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 8051-61.
- Plaimauer, B., Mohr, G., Wernhart, W., Himmelsbach, M., Dorner, F. and Schlokot, U. (2001) 'Shed' furin: mapping of the cleavage determinants and identification of its C-terminus. *Biochemical Journal*, **354**, 689-695.
- Ramachandran, G.N. and Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, **23**, 283-437.
- Ravelli, R.B.G., Leiros, H.-K.S., Pan, B., Caffrey, M. and McSweeney, S. (2003) Specific Radiation Damage Can Be Used to Solve Macromolecular Crystal Structures. *Structure*, **11**, 217-224.
- Ries, A., Engel, J., Lustig, A. and Kuhn, K. (1995) The function of the NC1 domains in type IV collagen. *J Biol Chem*, **270**, 23790-4.
- Rockwell, N.C. and Fuller, R.S. (2002) Specific modulation of Kex2/furin family proteases by potassium. *J Biol Chem*, **277**, 17531-7.
- Rockwell, N.C., Krysan, D.J., Komiyama, T. and Fuller, R.S. (2002) Precursor processing by Kex2/furin proteases. *Chemical Reviews*, **102**, 4525-4548.
- Rockwell, N.C. and Thorner, J.W. (2004) The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing. *Trends in Biochemical Sciences*, **29**, 80-87.
- Rockwell, N.C., Wang, G.T., Krafft, G.A. and Fuller, R.S. (1997) Internally consistent libraries of fluorogenic substrates demonstrate that Kex2 protease specificity is generated by multiple mechanisms. *Biochemistry*, **36**, 1912-7.
- Roebroek, A.J., Schalken, J.A., Bussemakers, M.J., van Heerikhuizen, H., Onnekink, C., Debruyne, F.M., Bloemers, H.P. and Van de Ven, W.J. (1986a) Characterization of human c-fes/fps reveals a new transcription unit (fur) in the immediately upstream region of the proto-oncogene. *Molecular Biology Reports*, **11**, 117-25.
- Roebroek, A.J., Schalken, J.A., Leunissen, J.A., Onnekink, C., Bloemers, H.P. and Van de Ven, W.J. (1986b) Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *EMBO Journal*, **5**, 2197-202.
- Roebroek, A.J.M., Umans, L., Pauli, I.G.L., Robertson, E.J., van Leuven, F., Van de Ven, W.J.M. and Constam, D.B. (1998) Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development*, **125**, 4863-4876.
- Ruoslahti, E. (1988) Fibronectin and its Receptors. *Annual Review of Biochemistry*, **57**, 375-413.

- Sarac, M.S., Cameron, A. and Lindberg, I. (2002) The furin inhibitor hexa-D-arginine blocks the activation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in vivo. *Infection & Immunity*, **70**, 7136-7139.
- Schechter, I. and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical & Biophysical Research Communications.*, **27**, 157-62.
- Schneider, G. and Lindqvist, Y. (1994) Ta6Br14 is a Useful Cluster Compound for Isomorphous Replacement in Protein Crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **50**, 186-191.
- Seidah, N.G. and Chretien, M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Research*, **848**, 45-62.
- Seidah, N.G., Day, R., Hamelin, J., Gaspar, A., Collard, M.W. and Chretien, M. (1992) Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Molecular Endocrinology.*, **6**, 1559-70.
- Seidah, N.G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewicz, M., Mbikay, M. and Chretien, M. (1990) cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases.[erratum appears in DNA Cell Biol. 1990 Dec;9(10):789; PMID: 2264933]. *DNA & Cell Biology.*, **9**, 415-24.
- Seidah, N.G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tadros, H., Mbikay, M., Chretien, M. and Day, R. (1996) Cdna Structure, Tissue Distribution, and Chromosomal Localization of Rat Pc7, a Novel Mammalian Proprotein Convertase Closest to Yeast Kexin-Like Proteinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 3388-3393.
- Sheldrick, G.M. (1997) Patterson Superposition and ab Initio Phasing. *Methods in Enzymology*, **276**, 628-640.
- Siebold, B., Deutzmann, R. and Kuhn, K. (1988) The arrangement of intra- and intermolecular disulfide bonds in the carboxyterminal, non-collagenous aggregation and cross-linking domain of basement-membrane type IV collagen. *Eur J Biochem*, **176**, 617-24.
- Siezen, R.J., Creemers, J.W. and Van de Ven, W.J. (1994) Homology modelling of the catalytic domain of human furin. A model for the eukaryotic subtilisin-like proprotein convertases. *Eur J Biochem*, **222**, 255-66.
- Siezen, R.J., de Vos, W.M., Leunissen, J.A. and Dijkstra, B.W. (1991) Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Eng*, **4**, 719-737.
- Siezen, R.J. and Leunissen, J.A.M. (1997) Subtilases - the Superfamily of Subtilisin-Like Serine Proteases. *Protein Science*, **6**, 501-523.
- Smeekens, S.P., Avruch, A.S., LaMendola, J., Chan, S.J. and Steiner, D.F. (1991) Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **88**, 340-4.
- Smeekens, S.P. and Steiner, D.F. (1990) Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *Journal of Biological Chemistry.*, **265**, 2997-3000.
- Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L. and Aten, B. (1967) Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science*, **157**, 697-700.
- Steiner, D.F. and Oyer, P.E. (1967) The Biosynthesis of Insulin and a Probable Precursor of Insulin by a Human Islet Cell Adenoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **57**, 473-480.

- Stieneke-Gröber, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H.D. and Garten, W. (1992) Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *Embo J*, **11**, 2407-14.
- Strausberg, S.L., Alexander, P.A., Gallagher, D.T., Gilliland, G.L., Barnett, B.L. and Bryan, P.N. (1995) Directed evolution of a subtilisin with calcium-independent stability. *Bio-Technology*, **13**, 669-673.
- Stubbs, M., Summers, L., Mayr, I., Schneider, M., Bode, W., Huber, R., Ries, A. and Kuhn, K. (1990) Crystals of the NC1 domain of human type IV collagen. *Journal of Molecular Biology*, **211**, 683-4.
- Sundaramoorthy, M., Meiyappan, M., Todd, P. and Hudson, B.G. (2002) Crystal structure of NC1 domains. Structural basis for type IV collagen assembly in basement membranes. *J Biol Chem*, **277**, 31142-53.
- Tangrea, M.A., Alexander, P., Bryan, P.N., Eisenstein, E., Toedt, J. and Orban, J. (2001) Stability and global fold of the mouse prohormone convertase 1 pro-domain. *Biochemistry*, **40**, 5488-5495.
- Tangrea, M.A., Bryan, P.N., Sari, N. and Orban, J. (2002) Solution structure of the pro-hormone convertase 1 pro-domain from *Mus musculus*. *Journal of Molecular Biology*, **320**, 801-812.
- Taylor, G. (2003) The phase problem. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **59**, 1881-1890.
- Taylor, N.A., van de Ven, W.J.M. and Creemers, J.W.M. (2003) Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *FASEB J*, **17**, 1215-1227.
- Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: From protein traffic to embryogenesis and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **3**, 753-766.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-80.
- Timpl, R. (1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. *European Journal of Biochemistry*, **180**, 487-502.
- Timpl, R., Oberbaumer, I., von der Mark, H., Bode, W., Wick, G., Weber, S. and Engel, J. (1985) Structure and biology of the globular domain of basement membrane type IV collagen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **460**, 58-72.
- Tripes. (2000) SYBYL Molecular Modelling Software., St Louis, MO.
- Turk, D. (1992) Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. Technische Universität München, Munich.
- van de Ven, W.J., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, H., van den Ouweland, A.M., van Duijnhoven, H.L., Roebroek, A.J. and Siezen, R.J. (1990) Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol Biol Rep*, **14**, 265-75.
- van der Rest, M. and Mayne, R. (1988) Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J Biol Chem*, **263**, 1615-8.
- Vey, M., Schafer, W., Berghofer, S., Klenk, H.D. and Garten, W. (1994) Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *Journal of Cell Biology*, **127**, 1829-42.
- Watanabe, T., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Nagahama, M., Murakami, K. and Nakayama, K. (1992) Sequence requirements for precursor cleavage within the constitutive secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 8270-4.

- Weber, S., Dolz, R., Timpl, R., Fessler, J.H. and Engel, J. (1988) Reductive cleavage and reformation of the interchain and intrachain disulfide bonds in the globular hexameric domain NC1 involved in network assembly of basement membrane collagen (type IV). *European Journal of Biochemistry.*, **175**, 229-36.
- Weber, S., Engel, J., Wiedemann, H., Glanville, R.W. and Timpl, R. (1984) Subunit structure and assembly of the globular domain of basement-membrane collagen type IV. *European Journal of Biochemistry.*, **139**, 401-10.
- Wise, R.J., Barr, P.J., Wong, P.A., Kiefer, M.C., Brake, A.J. and Kaufman, R.J. (1990) Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **87**, 9378-82.
- Wu, J.J. and Eyre, D.R. (1995) Structural analysis of cross-linking domains in cartilage type XI collagen. Insights on polymeric assembly. *Journal of Biological Chemistry.*, **270**, 18865-70.
- Yamauchi, M., Katz, E.P. and Mechanic, G.L. (1986) Intermolecular cross-linking and stereospecific molecular packing in type I collagen fibrils of the periodontal ligament. *Biochemistry*, **25**, 4907-13.
- Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., Lamendola, J. and Steiner, D.F. (1998) Regulatory Roles of the P Domain of the Subtilisin-Like Prohormone Convertases. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 11107-11114.
- Zhou, J., Ding, M., Zhao, Z. and Reenders, S.T. (1994) Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, alpha 6(IV). Isolation of the cDNAs for alpha 6(IV) and comparison with five other type IV collagen chains. *Journal of Biological Chemistry.*, **269**, 13193-9.