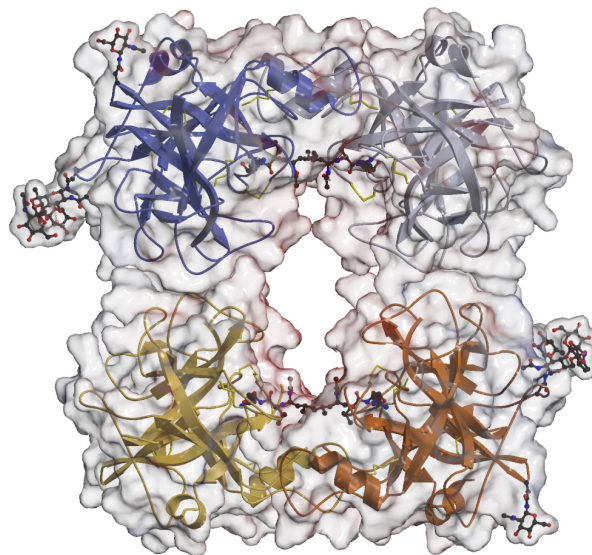


Röntgenkristallographische Analyse von
Aktivität und Faltung genetisch veränderter
 α I-Tryptasen

Biochemische Analyse des humanen Securins



Kerstin Barbara Rohr

Technische Universität München
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

**Röntgenkristallographische Analyse von Aktivität und
Faltung genetisch veränderter α I-Tryptasen**

Biochemische Analyse des humanen Securins

Kerstin Barbara Rohr

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Steffen Johannes Glaser

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. Robert Huber, i.R.
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher

Die Dissertation wurde am 27. Juni 2006 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 29. August 2006 angenommen.

It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent, but the one most responsive to change.

Charles Darwin (1809-1882)

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, von August 2002 bis April 2006 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Robert Huber angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Huber für das fortwährende Interesse an meiner Arbeit sowie die Bereitstellung der Laboratorien und in-house Mess-Stationen. Ich habe die große Freiheit bei der Bearbeitung meiner Themen genossen und dadurch meine Persönlichkeit voll entfalten können.

Ein ebenso großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfram Bode für die stetige Unterstützung und Beratung sowie für die Schaffung einer sehr angenehmen und kreativen Arbeitsatmosphäre.

Besonders Danken möchte ich Dr. Manuel Than für die exzellente Unterstützung, hervorragende Zusammenarbeit und die Geduld bei der Beantwortung fachlicher Fragen.

Herrn Prof. Dr. Norman Schechter, Department of Dermatology, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA und Dr. Trevor Selwood, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die Präparation der α I-Tryptase Mutanten.

Bei Dr. Constanze Breithaupt, Dr. Lorenz Chatwell, Mekdes Debela, Dr. Peter Göttig, Dr. Birgit Henrich, Dr. Stefan Henrich, Cora Keil, Sandra Lepthien, Dr. Klaus Maskos, Dr. Manuel Than, Dr. Katja Wenig und den vielen anderen Kollegen möchte ich mich für die Hilfe, das gemeinsame Arbeiten und die Freizeitaktivitäten ganz herzlich bedanken.

Dr. Gleb Bourenkov und Dr. Hans Bartunik danke ich für die Bereitstellung der Infrastruktur an der Max-Planck-Beamline BW6 am Deutschen Elektronen Synchrotron, Hamburg. Ganz besonders Danken möchte ich Renate Rüller und Monika Schneider für die Hilfe bei der Bewältigung bürokratischer Angelegenheiten. Mein Dank gilt auch Werner Dersch und Ottmar Paul für die Instandhaltung unserer technischen Einrichtungen, die zuverlässige und schnelle Hilfe bei technischen Problemen und für ihr Engagement beim Lösen von ausgefallenen technischen Fragestellungen.

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden für die Geduld und das Verständnis, das sie mir während meiner Doktorarbeit entgegen gebracht haben, danken. Ganz herzlicher Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, für ihre Liebe, ihr Vertrauen und die Unterstützung, die ich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit erfahren habe. Meinem Hund Nando möchte ich für das bereitwillige Überlassen eines Barthaares danken, mit dem ich die Kristallseeding-Versuche durchführen konnte.

Publikationen

1. **Rohr, K.B.**, Selwood, T., Marquardt, U., Schechter, N.M., Bode, W., Than, M.E. (2006). X-ray Structures of Free and Leupeptin-Complexed Human α I-Tryptase Mutants: Indication for an $\alpha \rightarrow \beta$ Tryptase Transition. *Journal of Molecular Biology* 357, 195-209.
2. **Rohr, K.B.**, Selwood, T., Marquardt, U., Schechter, N.M., Bode, W., Than, M.E. (2004). Insights into the Active-Site Conformation of Ligand-Free Tryptase. Jahresbericht HASYLAB 2004, Hamburg.
3. **Rohr, K.B.**, Selwood, T., Marquardt, U., Schechter, N.M., Bode, W., Than, M.E. (2003). Crystal Structure of a Recombinant Human α I-Tryptase Mutant. Jahresbericht HASYLAB 2003, Hamburg.

Protein Data Bank

1. **Rohr, K.B.**, Selwood, T., Marquardt, U., Schechter, N.M., Bode, W., Than, M.E. (2005). Crystal Structure of the Recombinant Human Alpha I Tryptase Mutant D216G in Complex with Leupeptin. PDB-Code: 2F9P.
2. **Rohr, K.B.**, Selwood, T., Marquardt, U., Schechter, N.M., Bode, W., Than, M.E. (2005). Crystal Structure of the Recombinant Human Alpha I Tryptase Mutant D216G. PDB-Code: 2F9O.
3. **Rohr, K.B.**, Selwood, T., Marquardt, U., Schechter, N.M., Bode, W., Than, M.E. (2005). Crystal Structure of the Recombinant Human Alpha I Tryptase Mutant K192Q/D216G in Complex with Leupeptin. PDB-Code: 2F9N.

Vorträge und Poster

1. IXth International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological control. Brdo Estate, Slowenien, 2005.
2. 22nd Winter School, Proteinases and their Inhibitors, recent developments. Tiers, Italien, 2005.
3. Graduate Retreat of the Max Planck Institute of Biochemistry. Schloss Ringberg, Tegernsee, Deutschland, 2004.
4. 21st Winter School, Proteinases and their Inhibitors, recent developments. Tiers, Italien, 2004.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung	1
1.1 Humane α I-Tryptase-Mutanten	1
1.2 Humanes Securin	2
2 Einleitung	5
2.1 Die Familie der Mastzell-Tryptasen	5
2.1.1 Mastzellen	5
2.1.2 Mastzell-Tryptasen	9
2.1.3 Humane α I-Tryptase	16
2.1.4 Zielsetzung	18
2.2 Der Separase-Securin-Komplex	21
2.2.1 Chromosomensegregation	21
2.2.2 Die Familie der Separasen	22
2.2.3 Regulation der chromosomalen Segregation	24
2.2.4 Transformierende Aktivität des Securins	24
2.2.5 Zielsetzung	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Material und Geräte	27
3.1.1 Chemikalien	27
3.1.2 Geräte	27
3.1.3 Datenbanken	28
3.1.4 Bakterienstämme und Vektoren	29
3.2 Molekularbiologische Methoden	29
3.2.1 Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA	30
3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA	30
3.2.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonucleasen	30
3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	30
3.2.5 DNA-Sequenzierung	31
3.3 Mikrobiologische Methoden	31
3.3.1 Herstellung von Nährmedien	31

3.3.2	Anzucht und Aufbewahrung von Bakterienzellen	31
3.3.3	Herstellung elektrokompeter <i>E.coli</i> -Zellen	32
3.3.4	Transformation elektrokompeter <i>E.coli</i> -Zellen	32
3.3.5	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	33
3.4	Proteinanalytische Methoden	33
3.4.1	Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration	33
3.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
3.4.3	Western blot und Proteindetektion durch Antikörperreaktion . . .	35
3.4.4	Methoden zur Proteinfärbung: Coomassie- und Silberfärbung . . .	36
3.4.5	Trocknen der SDS-Polyacrylamidgele	37
3.4.6	Analytische Gelfiltration	37
3.4.7	Konzentration und Dialyse von Proteinlösungen	38
3.4.8	Weitere analytische Methoden	38
3.5	Rückfaltung unlöslicher Proteine	38
3.5.1	Aufreinigung ungefalteter Proteine aus <i>inclusion bodies</i>	39
3.5.2	Rückfaltung durch <i>rapid dilution</i>	40
3.6	Native Aufreinigung von Proteinen	41
3.6.1	Aufschluss der <i>E. coli</i> -Zellen	41
3.6.2	Aufreinigung auf der NiNTA-Säule	41
3.6.3	Aufreinigung durch Gelfiltration	42
3.7	Proteinkristallographie	42
3.7.1	Kristallisation	42
3.7.2	Datensammlung und Datenreduktion	43
3.7.3	Grundlagen der Strukturlösung	44
3.7.4	Phasierung durch Pattersonsuchmethoden	46
3.7.5	Modellbau und Verfeinerung	48
3.7.6	Strukturanalyse und graphische Darstellung	49
4	Ergebnisse - Humane αI-Tryptase-Mutanten	51
4.1	Biochemische Arbeiten	51
4.2	Kristallisation und Strukturlösung	52
4.2.1	rHT α QG ^I	52
4.2.2	rHT α G ^I	53
4.2.3	rHT α G	55
4.3	Strukturbeschreibung	56
4.3.1	Struktur des Monomers	57
4.3.2	Struktur des Tetramers	58
4.3.3	Das aktive Zentrum der durch Leupeptin inhibierten Mutanten .	60
4.3.4	Substratbindungsbereich der Mutante rHT α G	63
5	Ergebnisse - Humanes Securin	67
5.1	Proteinaufreinigung	67
5.2	Biochemische Arbeiten am humanen Securin	69
5.2.1	Analytische Gelfiltration	69

5.2.2	N-terminale Sequenzierung und Massenspektrometrie	70
5.2.3	Analyse der Stabilität	71
5.3	Sekundärstrukturanalyse des Securins	71
5.3.1	Zirkulardichroismus	72
5.3.2	Kernresonanzspektroskopie	72
6	Diskussion - Humane αI-Tryptase Mutanten	75
6.1	Der Einfluss der Aminosäuren Asp216 und Lys192 auf die Aktivität der Tryptase	75
6.2	Flexibilität des Tryptasetetramers	76
6.3	Beitrag des 97-Loops zur enzymatischen Aktivität	77
6.4	Stabilitätsunterschiede zwischen α I- und β II-Tryptase	78
6.5	Flexibilität des 214-220-Segments	79
6.6	Ist native α I-Tryptase enzymatisch aktiv?	79
7	Diskussion - Humanes Securin	85
7.1	Securin - ein nativ ungefaltetes Protein	85
7.2	Die Familie der nativ ungefalteten Proteine	86
7.3	Chaperonfunktion des Securins	88
7.4	Expression und Rückfaltung humaner Separase	89
A	Abkürzungen	91
	Literaturverzeichnis	93

Kapitel 1

Zusammenfassung

1.1 Humane α I-Tryptase-Mutanten

Humane α - und β -Tryptasen (Isoenzyme α I, α II, β I, β II, β III) gehören zu den trypsinartigen Serinproteinasen, die in großen Mengen in Mastzellen exprimiert werden. Mastzellen sind granuläre Effektorzellen und spielen eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen und Entzündungsvorgängen. β -Tryptasen werden zusammen mit Heparin, Histamin und anderen Proteinasen in großen Mengen in den sekretorischen Granula gespeichert und nach der Aktivierung der Mastzellen exozytotisch sezerniert. Die enzymatisch aktive Form der β -Tryptase ist ein Tetramer, welches durch Proteoglykane stabilisiert wird. α -Tryptasen werden dagegen auch ohne vorherige Aktivierung der Mastzellen sezerniert. Es wurde angenommen, dass dies durch einen Aminosäureaustausch im Propeptid verursacht wird. Neuere Untersuchungen haben diese Hypothese jedoch in Frage gestellt. Die rekombinant exprimierte α I-Tryptase konnte zur aktiven Form prozessiert werden und bildet, wie die β -Tryptase, Tetramere aus.

Obwohl α - und β -Tryptasen eine sehr hohe Sequenzhomologie besitzen (je nach Isoenzym 92-95 %), weisen sie enorme Unterschiede hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität und Tetramerstabilität auf. Während die enzymatisch aktive β -Tryptase Heparin für die Aufrechterhaltung des tetrameren Zustands benötigt, ist das Tetramer der α -Tryptase auch in Abwesenheit von Heparin stabil. Es ist umstritten, ob die α -Tryptase gegenüber bestimmten Substraten eine geringe proteolytische Aktivität besitzt oder eher enzymatisch inaktiv ist. Strukturelle Analysen von α - und β -Tryptasen zeigten, dass das 214-220-Segment im β II-Tryptase-Komplex mit 4-Amidinophenylpyruvat (APPA) den rahmenartigen Eingangsbereich der tiefen S1-Tasche ausbildet. Bei der Struktur der α I-Tryptase ist dieser Zugang versperrt, da sich das 214-220-Segment zickzackartig über den Bereich der S1-Tasche erstreckt. Biochemische und strukturelle Untersuchungen ergaben, dass die Aminosäuren Lys192 und Asp216 für die reduzierte enzymatische Aktivität und erhöhte Stabilität des α I-Tryptase-Tetramers von Bedeutung sein könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Kristallstrukturen von zwei enzymatisch aktiven humanen α I-Tryptase-Mutanten (D216G und K192Q/D216G) im Komplex mit dem Inhibitor Leupeptin sowie die Kristallstruktur der α I-Tryptase-Mutante D216G oh-

ne Inhibitor untersucht. Der Eingangsbereich der S1-Tasche wies bei beiden inhibierten α I-Tryptase-Mutanten eine große Übereinstimmung mit dem Eingangsbereich der APPA-inhibierten β II-Tryptase auf. Eine vergleichende Analyse der Tryptase-Mutanten mit den Kristallstrukturen der α I- und β II-Tryptase zeigte eindeutig, dass Asp216 bedingt durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit der Oxyaniontasche und durch abstoßende Kräfte im Bereich der S1-Tasche ausschließlich für die α -tryptasespezifische Konformation verantwortlich ist. Gln192 dient durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken der Stabilisierung und Ausrichtung von Substraten, was die erhöhte enzymatische Aktivität der Doppelmutante gegenüber der Einzelmutante erklärt. Durch die Verwendung von Leupeptin als Inhibitor konnte erstmals der erweiterte Substratbindungsbereich analysiert und eine durch den P2-Rest Leucin hervorgerufene konzertante Umlagerung der im Kontaktbereich der Monomere gelegenen 97-loops beobachtet werden.

Die Kristallstruktur der Einzelmutante D216G ist die erste Struktur einer enzymatisch aktiven Tryptase, die nicht durch einen Inhibitor stabilisiert wurde. Am Eingangsbereich der S1-Tasche konnten hinsichtlich des 214-220-Segments zwei Konformationen beobachtet werden, eine „offene“, aktive β -tryptaseartige Konformation sowie eine „geschlossene“ α -tryptaseartige Konformation. Beide Konformationen stehen miteinander in einem Gleichgewicht, das von den konformationsbestimmenden Aminosäuren im näheren Umfeld des aktiven Zentrums und dem Substrat/Inhibitor beeinflusst wird. Eine Verfeinerung der Besetzung der beiden Konformationen ergab für die geschlossene und die offene Konformation ein Verhältnis von 1:3. Im Gegensatz zu den α I-Tryptase-Mutanten und der β -Tryptase liegt dieses Gleichgewicht bei den Wildtyp- α -Tryptasen durch die Aminosäure Aspartat an Position 216 stark auf der Seite der geschlossenen Konformation. Der Vergleich mit der Kristallstruktur der leupeptininhibierten α I-Tryptase-Mutante D216G zeigt, dass peptidische Inhibitoren wie Leupeptin im Verlauf der Bindung an das aktive Zentrum die offene Konformation induzieren können. Ähnlich wie der Komplementfaktor D sind α -Tryptasen möglicherweise Enzyme mit sehr hoher Substratspezifität, die erst durch ein geeignetes, sehr stark bindendes Substrat proteolytisch aktiv werden. Ein solches Substrat muss die Fähigkeit besitzen, die Umlagerung des 214-220-Segments zur offenen Konformation in Form eines *induced-fit*-Mechanismus zu bewirken. Diese Art von Kofaktor- oder Substratregulation wurde bereits bei einer Reihe von trypsinartigen Serinproteinasen beobachtet. Als klassische Beispiele gelten der ligandeninduzierte Übergang vom Trypsinogen zum Trypsin oder die kofaktorinduzierte Aktivierung von Prothrombin durch Staphylocoagulase.

1.2 Humanes Securin

Securin, auch als *pituitary tumor transforming gene product* (Pttg) bezeichnet, wurde erstmals aus Tumoren der Hypophyse der Ratte isoliert und aufgrund der Überexpression in einer Vielzahl von Tumoren der Gruppe der Protoonkogene zugeordnet. Die Invasivität eines Tumors korreliert hierbei mit der Höhe der Securinexpression. Securin besitzt im

Zellzyklus eine überaus wichtige Rolle, da es p53-abhängige Apoptosevorgänge indirekt reguliert und sowohl die Lokalisation als auch die enzymatische Aktivität der Cysteinproteinasen Separase kontrolliert. Separase ist das Schlüsselenzym, welches durch die Spaltung der Cohesinuntereinheit Scc1 für die Teilung der Chromosomen verantwortlich ist. Bis zur korrekten Anheftung aller Chromosomen an die Mitosespindel wird Separase durch Securin inhibiert. Die Aufhebung dieser Inhibition erfolgt durch die APC^{Cdc20}-abhängige Ubiquitylierung gefolgt von der Degradation des Securins im Proteasom. Durch die Spaltung des Cohesins und die Trennung der Schwesterchromatide wird das Voranschreiten im Zellzyklus ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Fragmente der humanen Separase und humanes Securin in *E. coli* exprimiert. Für die in Einschlusskörpern abgelagerte Separase wurden verschiedene Rückfaltungsmethoden getestet, die jedoch keine ausreichenden Mengen an gefaltetem Protein ergaben. Durch die Expression in Insektenzellen konnte die Separase mittels Affinitätschromatographie nativ aufgereinigt werden. Für kristallographische Versuche waren diese Mengen nicht ausreichend. Humanes Securin konnte in *E. coli* rekombinant exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gefolgt von Gelfiltration aufgereinigt werden. Das hydrodynamische Verhalten auf der Gelfiltration, die computergestützte Sekundärstrukturanalyse und die Anfälligkeit des aufgereinigten Proteins für Degradation gaben einen ersten Hinweis auf den nativ ungefalteten Charakter des Securins. Sowohl das CD-Spektrum als auch das ¹H-NMR-Spektrum bestätigten diese Vermutung, wodurch die röntgenkristallographische Analyse nicht durchgeführt wurde. Die fehlende Faltung erklärt möglicherweise die vielfältigen Funktionen des Securins, die von Transkriptionskontrolle, Inhibition und Targeting bis hin zur Funktion als Chaperon reichen.

Kapitel 2

Einleitung

2.1 Die Familie der Mastzell-Tryptasen

2.1.1 Mastzellen

Aktivierung der Mastzellen und Freisetzung von Mediatoren

1877 identifizierte Paul Ehrlich mit Hilfe histologischer Färbemethoden Zellen, welche er „als Produkte der Mästung der Bindegewebszelle“ erachtete und ihnen den Namen Mastzellen gab (Ehrlich, 1877). Erst über 100 Jahre später konnten ihr Ursprung und Reifungsprozess größtenteils aufgeklärt werden.

Mastzellen stammen von pluripotenten hämatopoetischen Zellen des Knochenmarkes ab. Über den Blutkreislauf gelangen die Vorläuferzellen an den eigentlichen Wirkungsort, die submucosale Gewebe einschließlich des gastrointestinalen und respiratorischen Traktes, sowie die Bindegewebe entlang der Blutgefäße. Vor allem aber sind Mastzellen direkt unterhalb der Epidermis, der äußersten Hautschicht, zu finden. Die treibende Kraft für die Differenzierung, das Überleben und die Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix ist jedoch die Interaktion des *stem-cell factor* (SCF) an den Rezeptor c-Kit (Zsebo *et al.*, 1990). Zusätzlich beeinflussen eine Reihe Zytokine die Differenzierung (Kitamura *et al.*, 1981; Metcalfe *et al.*, 1997). Die korrekte Lokalisation und Verteilung der Mastzellen sowie die lokale Freisetzung von Mastzellmediatoren wird durch die Bindung verschiedener Oberflächenrezeptoren an Bestandteile der extrazellulären Matrix (Laminin, Fibronectin oder Vitronectin) vermittelt. Mastzellen spielen eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen, Immunität, Autoimmunität, Angiogenese, Gewebeneubildung, Fibrose, Tumorwachstum und der Parasitenabwehr.

Zeitgleich mit der Differenzierung beginnt die Synthese verschiedener Mediatoren wie beispielsweise Histamin, Proteinasen oder der *tumor-necrosis factor- α* (TNF- α). Die Speicherung der Mediatoren erfolgt in den dichten Granula, welche den Mastzellen ihr charakteristisches Aussehen verleihen (siehe Abbildung 2.1). Nach der Aktivierung der Mastzellen durch Bindung von Immunoglobulin- ϵ (IgE) an die IgE-spezifischen Fc ϵ I-Rezeptoren und der Vernetzung der gebundenen Antikörper durch multivalente Antigene erfolgt die exozytotische Freisetzung der Mediatoren (Daeron *et al.*, 1995; Mekori

und Metcalfe, 2000). Neben der IgE-abhängigen Aktivierung können Mastzellen auch durch eine Reihe weiterer Substanzen aktiviert werden wie zum Beispiel polybasische Moleküle (compound 48/80, Mastoparan, Polymyxin B), Peptide (*peptide adrenocorticotrophic hormone*, Substanz P, *calcitonin gene-related peptide*, *vasoactive intestinal polypeptide*), Anaphylatoxine, Dextrane, Lektine oder IgG-Rezeptoren mit niedriger Affinität (Lagunoff *et al.*, 1983). Mastzellmediatoren können in drei Gruppen eingeteilt werden: (1) Mediatoren, die in großen Mengen synthetisiert und in den dichten Granula bis zur Aktivierung der Zellen gespeichert werden. (2) Mediatoren, die von Lipiden abgeleitet wurden und (3) Zytokine, Mediatoren, die erst nach der Aktivierung der Zellen *de novo* synthetisiert und anschließend sofort sekretiert werden.

Gespeicherte Mediatoren

Zu den gespeicherten Mediatoren zählt unter anderem **Histamin**, welches im Golgi-Apparat der Mastzellen durch Decarboxylierung von Histidin entsteht (White *et al.*, 1987). Die Speicherung erfolgt bei saurem pH in den sekretorischen Granula durch Assoziation mit Carboxylgruppen von Proteinen und Proteoglykanen, wobei je nach Organismus und Subtyp bis zu 3-30 pg Histamin pro Zelle gespeichert werden können (Fox *et al.*, 1985; Schulman *et al.*, 1983). Bei neutralem pH dissoziiert Histamin von den Proteinen und Proteoglykanen ab und interagiert im extrazellulären Raum mit Rezeptoren, die eine Vielfalt von Reaktionen wie beispielsweise die Kontraktion der glatten Muskel der Luftwege und des Gastrointestinaltraktes auslösen können (Metcalfe *et al.*, 1997).

Proteoglykane bestehen aus einem Proteinkern mit repetitiven Serin- und Glycinresten und kovalent verknüpften, sulfathaltigen Glycosaminoglykanen. Sie dienen der Lagerung und der Stabilisierung weiterer Mediatoren und können ebenfalls als extrazelluläre Mediatoren agieren.

Ein großer Anteil der dichten Granula besteht aus **neutralen Proteinase**n. Die tryptinartige Serinproteinase Tryptase ist das vorherrschende Enzym und kann in allen Mastzellsubtypen gefunden werden (siehe Kapitel 2.1.2). Chymasen sind dagegen nur in 85 % der Mastzellen der Haut und der intestinalen Submucosa vorhanden. Keine Chymase besitzen die Mastzellen der Lunge (Irani *et al.*, 1986). Dieser chymasefreie Typ von Mastzellen wird als MC_T bezeichnet, Mastzellen mit Tryptase und Chymase gehören dem Subtyp MC_{TC} an (Irani *et al.*, 1989). Chymasen sind Serinproteinasen, welche nach aromatischen Aminosäuren spalten. Sie konvertieren Angiotensin I zu Angiotensin II, degradieren Komponenten der Basalmembran, stimulieren Schleimabsonderung, degradieren Neuropeptide und konvertieren die Vorstufe von IL-1 β zur aktiven Form (Wintroub *et al.*, 1984; Mizutani *et al.*, 1991). MC_{TC} enthalten zusätzlich die Exopeptidase Carboxypeptidase A, welche vom C-Terminus der Proteine aromatische Aminosäuren abspaltet, und die chymotrypsinartige Serinproteinase Cathepsin G (Schwartz *et al.*, 1982; Schechter *et al.*, 1990).

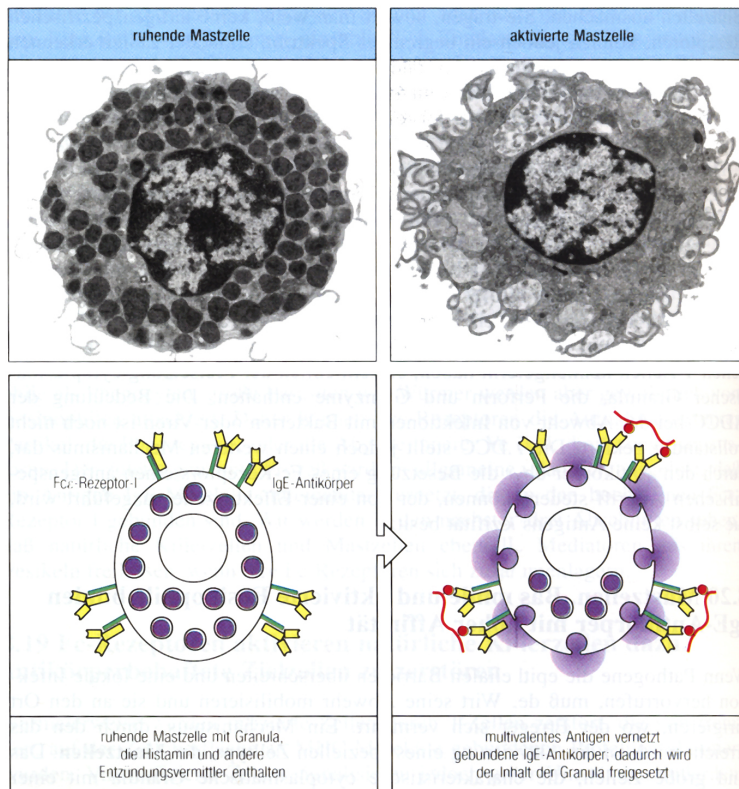


Abbildung 2.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen und schematische Zeichnung der Mastzellaktivierung (Janeway et al., 1997). Die Vernetzung der an Fc ϵ 1-Rezeptoren gebundene IgE-Antikörper durch multivalente Antigene bewirkt die exozytotische Freisetzung der Mastzellmediatoren.

De novo-synthetisierte Mediatoren

Zu den Mediatoren, die nicht in den dichten Granula gespeichert werden, zählt die Gruppe der **lipidischen Mediatoren**. Darunter gehören Cyclooxygenase- und Lipoxigenasemetabolite der Arachidonsäure, welche in hohem Grade Entzündungsreaktionen hervorrufen können. Produkte der Cyclooxygenase sind Prostaglandine und Thromboxane. Leukotriene, Hydroperoxyeicosatetraensäure und Hydroxyeicosatetraensäure werden durch Lipoxigenase synthetisiert. **Zytokine** (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-14 und NGF) und **Chemokine** (*macrophage inflammatory protein-1 α* , *monocyte chemoattractant protein-1* und Lymphotactin) gehören der zweiten Gruppe *de novo*-synthetisierter Mediatoren an. Diese Gruppe besitzt ein sehr breites Wirkungsspektrum, welches Zellwachstum, Reparaturen, Entzündungsvorgänge und die Immunantwort beinhaltet (Metcalf et al., 1997). *De novo*-synthetisierte Mediatoren stellen die zweite Welle der Mastzellaktivierung dar, welche erst Stunden nach der eigentlichen Aktivierung eintritt. Als erste erfolgt die Freisetzung der in den Granula gespeicherten Mediatoren. Zusätzlich besitzen Zytokine und Chemokine (wie beispielsweise TNF- α) die Fähigkeit, Mastzellen zu aktivieren, was als Autoaktivierung bezeichnet wird.

Funktion und Pathologie von Mastzellen

Mastzellen sind bedeutende Effektorzellen in Entzündungsreaktionen sowie während der angeborenen, erworbenen und pathologisch veränderten Immunantwort. Autoimmunerkrankungen, Fibrosen, Neoplasien, chronisch entzündliche Darmerkrankung (*inflammatory bowel disease*), rheumatische Entzündungskrankheiten oder allergische Entzündungsreaktionen sind auf Mediatoren der Mastzellen zurückzuführen (Dvorak *et al.*, 1976; Claman, 1993; Mochizuki *et al.*, 1984; de Cidre und Sacerdote de Lustig, 1990; Sarin *et al.*, 1987; Malone *et al.*, 1986; Metcalfe, 1983). Die Vielfalt an Mediatoren, die nach der Mastzellaktivierung sezerniert werden, erschwert jedoch die Untersuchung der spezifischen Wirkung einzelner Mediatoren (Beer und Rocklin, 1984; Slauson *et al.*, 1984; Falus und Meretey, 1992).

Bei **Allergien** lösen Mastzellen sowohl frühe als auch späte allergische Reaktionen aus. Je nach Dosis des Antigens kann die allergische Reaktion von einem einfachen Heuschnupfen (allergische Rhinitis) über die systemischen Anaphylaxie (Aktivierung der Mastzellen des Bindegewebes im Darm) bis hin zum anaphylaktischen Schock (Aktivierung der Mastzellen im gesamten Körper) reichen. Im Verlauf von chronischen Allergierkrankungen, bei denen Mastzellen übermäßig stimuliert werden, führt die Sekretion der Mediatoren zur Fibrose, einer Gewebeschädigung durch übermäßige Vermehrung von Bindegewebe. Bei allergischem Asthma kommt es zur Anhäufung von Kollagen und anderen Komponenten der extrazellulären Matrix unterhalb der Basalmembran der respiratorischen Epithelien (Brewster *et al.*, 1990). Atopische Dermatitis (Ekzem) ist dagegen eine durch Mastzellmediatoren verursachte fibrotische Erkrankung der Dermis (Leiferman *et al.*, 1985). Fibrose im Knochenmark, der Leber und der Milz tritt bei systemischer Mastozytose auf und rührt von anormaler Anhäufung von Mastzellen in Haut, Leber, Lymphknoten und dem Knochenmark (Travis und Ching-Yand, 1993) her. Mastzellen sind ebenfalls an **Angiogenesevorgängen**, also an der Bildung neuer Blutgefäße, beteiligt, was bei der Wundheilung und dem Tumorwachstum eine wichtige Rolle spielt (Trabucchi *et al.*, 1988; Meininger, 1995). Mastzellen wurden vermehrt in der näheren Umgebung von Blutkapillaren gefunden, und es konnte gezeigt werden, dass die sekretierten Mediatoren wie Heparin, Histamin oder TNF- α Angiogenese stimulieren (Ch'ng *et al.*, 2006). Mastzell-Proteinasen helfen, indem sie die Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen und so Raum für neue Blutgefäße schaffen (Meininger und Zetter, 1992).

Mastzellen spielen auch eine wichtige Rolle bei **Autoimmunerkrankungen** des Gehirns [Multiple Sklerose (MS), Experimentelle Autoimmun Enzephalomyelitis (EAE)], der Gelenke (rheumatoide Arthritis) und der Haut (bullöses Pemphigoid, Psoriasis). Es konnte gezeigt werden, dass bei Multiple Sklerose die Mastzelldegranulation in erhöhtem Maße auftritt und in der Cerebrospinalflüssigkeit eine erhöhte Menge an Tryptase vorhanden ist (Brenner *et al.*, 1994). EAE, das Tiermodell der Multiplen Sklerose, tritt bei Mastzell-defizienten Mäusen später und mit weniger schwerem Verlauf auf (Brown *et al.*, 2002). Der genaue Zusammenhang zwischen Mastzellaktivierung und der Autoim-

munerkrankung ist bisher nicht gänzlich geklärt, jedoch weisen veröffentlichte Daten einen Zusammenhang von Antikörperbindung an Fc-Rezeptoren (Fc γ R bei Autoimmunerkrankungen im Gehirn, Fc ϵ R bei Gelenkerkrankungen) und die dadurch verursachte Aktivierung der Mastzellen auf. Erhöhte Permeabilität der Blutgefäße, Ansammlung von Leukozyten und Chemokinen, Gewebereorganisation und chronische Entzündung sind die Folgen dieser Aktivierung und prägen das Krankheitsbild von Autoimmunerkrankungen maßgeblich (Benoist und Mathis, 2002).

Im Gegensatz zu Autoimmunerkrankungen, wo Mastzellaktivierung pathologische Veränderungen hervorrufen, stellt dagegen die Mastzellaktivierung bei einigen **parasitären Infektionen** eine Art Verteidigungsmechanismus dar. Mastzellmediatoren schädigen den Parasiten entweder direkt oder erschweren die Invasion durch Veränderung des Ionentransportes im intestinalen Epithel (Henderson *et al.*, 1986; Harari *et al.*, 1987). Durch die Sekretion der Mastzellmediatoren werden weitere Effektorzellen wie beispielsweise Eosinophile angezogen, und es kommt zur Schleimabsonderung und erhöhten Darmperistaltik, was das Anheften der Parasiten an das Darmepithel erschwert (Nutman, 1993).

2.1.2 Mastzell-Tryptasen

1981 wurde die Tryptase erstmals aus humanen Mastzellen der Lunge isoliert und aufgrund der Sequenzhomologie zu trypsinartigen Serinproteinasen dem Clan PA(S) zugeordnet (E.C.3.4.21.59) (Schwartz *et al.*, 1981). Tryptasen konnten bereits in verschiedenen Säugerarten wie dem Hund, der Maus, der Ratte, dem Schaf, der Kuh und dem Menschen identifiziert werden. Beim Menschen wurden cDNAs für humane α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Tryptase auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 (16p13.3) gefunden (Pallaoro *et al.*, 1999; Caughey, 2001; Wong *et al.*, 2001). Die verschiedenen Isoenzyme α I-, β I-, β II-, β III- und γ -Tryptase sind in einer telomernahen Region des Chromosoms 16 auf drei Loci verteilt. α I- und β I-Tryptase bzw. β II- und β III-Tryptase sind jeweils auf einem Locus zu finden. Der dritte Locus codiert für die Transmembrantryptasen γ I und γ II (Caughey *et al.*, 2000). Die Lokalisation der α - und β -Tryptase auf einem gemeinsamen Locus und der damit verbundene Wettlauf um die Dominanz führt zu verschiedenen Tryptasegenotypen. Soto *et al.* (2002) untersuchten eine Reihe von Individuen und fanden heraus, dass 21 % den $\alpha\alpha\beta\beta$ -Genotyp, 50 % den $\alpha\beta\beta\beta$ -Genotyp, 29 % den $\beta\beta\beta\beta$ -Genotyp und 0,23 % den $\alpha\alpha\alpha\alpha$ -Genotyp besaßen. Der Zusammenhang zwischen α -Tryptase-Defizienz und allergischen Erkrankungen oder systemischer Mastozytose konnte bis heute jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Für die Zukunft ist dies jedoch ein wichtiger und interessanter Forschungsaspekt. Die Proteinsequenzhomologie zwischen α - und β -Tryptasen beträgt je nach Isoenzym 92-99 % (siehe Abbildung 2.2). γ -, δ - und ϵ -Tryptasen sind dagegen weit weniger homolog. Die Homologie zur β -Tryptase beträgt hier nur 37-47 % (Fiorucci und Ascoli, 2004).

ϵ -Tryptase konnte bisher ausschließlich aus Lungepithel isoliert werden und weist im Vergleich zur α - und β -Tryptase eine andere Spezifität auf, da sie weder Fibronectin noch Vitronectin, Laminin, Plasminogen oder *single chain tissue-type plasminogen ac-*

tivator (setPA) spalten kann. ϵ -Tryptase zählt nicht zu den Mastzelltryptasen, da das Enzym in epitheliale Gewebe bzw. Geweben der Speise- und Luftröhre und nicht in Mastzellen synthetisiert wird (Wong *et al.*, 2001).

γ - und δ -Tryptasen

Die mRNA der δ I- und δ II-Tryptase konnte aus humanem Gewebe isoliert und untersucht werden, jedoch besitzen beide kodierende Gene ein vorzeitiges Stoppcodon, was die Substratspezifität signifikant beeinflusst (Caughey, 2001; Min *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die katalytische Triade intakt ist und δ -Tryptase Peptide nach Lysinresten spalten kann (Wang *et al.*, 2002). γ I- und γ II-Tryptasen (auch als *transmembrane tryptase* oder TMT bezeichnet) werden in den Mastzellen der Lungen synthetisiert und besitzen am C-Terminus eine hydrophobe Domäne, welche die Proteinase mit der Zellmembran verankert. Aufgrund dieser Domäne bleibt die γ -Tryptase nach der Aktivierung der Mastzellen möglicherweise an der Oberfläche der Mastzelle und hat deshalb einen lokal begrenzten Wirkungsbereich (Wong *et al.*, 2002).

β -Tryptasen

β -Tryptase wird sowohl in den Mastzellen der Lungen als auch der Haut synthetisiert und gespeichert (Schwartz, 1995). Die Menge an gespeicherter Tryptase kann dabei bis zu 35 pg Tryptase pro Zelle betragen (Xia *et al.*, 1995). β -Tryptase wird als Proform synthetisiert und vermutlich im Golgi-Apparat in zwei Schritten zur reifen Form prozessiert. Die autokatalytische Abspaltung der ersten 12 Aminosäuren erfolgt bei saurem pH zwischen Arg-3 und Val-2. Die daraus resultierende pro²-Tryptase besitzt zwei N-terminale Aminosäuren, die in einem zweiten Schritt durch die Dipeptidyl-Peptidase I abgespalten werden (Sakai *et al.*, 1996). Dies ermöglicht die Insertion des N-Terminus und die Bildung der bei chymotrypsinartigen Proteinase essentiellen Salzbrücke mit Asp194, welche schließlich die korrekte Ausbildung der S1-Tasche induziert (Pereira *et al.*, 1998). Die Aktivierung der β -Tryptase ermöglicht den Zusammenschluss der Monomere zum Tryptase-Tetramer, welches die aktive Form des Enzyms darstellt. Stabile Tetramere können jedoch nur in Anwesenheit von Heparin oder sehr hohen Salzkonzentrationen gebildet werden. In den sekretorischen Granula, dem Speicherort der aktiven Tryptase, ist das Tryptase-Tetramer stabil, da große Mengen an Heparin und anderen Proteoglykanen vorhanden sind (Schwartz und Bradford, 1986; Sommerhoff *et al.*, 2000). Nach Freisetzung der Tryptase dissoziieren die Tetramere langsam vom Heparin ab, verlieren ihre enzymatische Aktivität und bilden inaktive Monomere. Dieser reversible Prozess wird als spontane Inaktivierung bezeichnet (Schechter *et al.*, 1993). Der spontanen Inaktivierung durch Dissoziation kann neben Heparin auch durch kleine, kompetitive Inhibitoren wie 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonylfluoride (AEBSF) entgegengewirkt werden. Aktive Monomere entstehen nur nach spontaner Inaktivierung und anschließender Interaktion mit Heparin oder einem Molekül, welches die S1-Tasche reorganisieren kann. Jedoch liegt

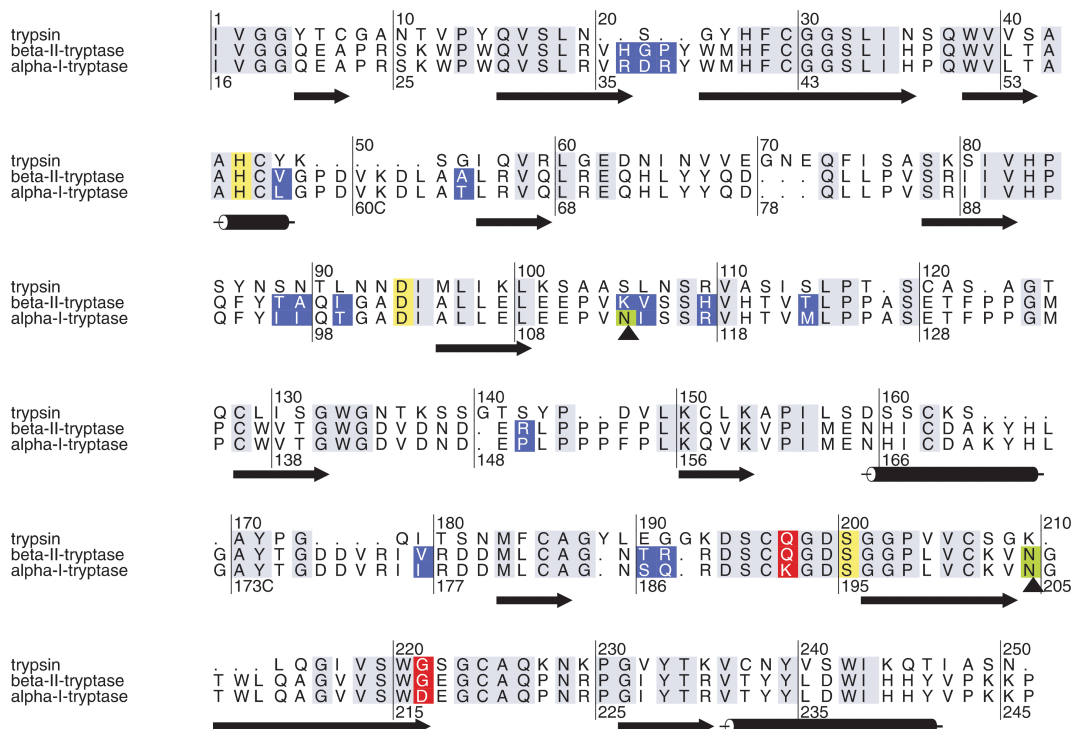


Abbildung 2.2: Strukturbasiertes Proteinsequenz-Alignment des bovinen Trypsins, der β II-Tryptase und der α I-Tryptase. Sequenzidentitäten sind hellblau hervorgehoben, nicht-konservierte Aminosäuren dunkelblau. Die katalytische Triade (Ser195, His57, Asp102) sind gelb, die Glykosylierungsstellen (Asn113, Asn204) grün gekennzeichnet. Die durch Mutagenese veränderten Reste an den Positionen 192 und 216 sind rot hervorgehoben. Unterhalb des Sequenzalignments ist die Sekundärstruktur als schwarze Pfeile (β -Faltblätter) und schwarze Zylinder (α -Helices) dargestellt. Die sequenzielle und chymotrypsinogen-basierte Nummerierung befindet sich oberhalb und unterhalb des Sequenzalignments.

unter dieser Bedingung das Gleichgewicht stark auf der Seite des aktiven Tetramers. Bei der Inaktivierung handelt es sich möglicherweise um den Übergang zu einer zymogenartigen Struktur, bei der die Salzbrücke zwischen Ile16 und Asp194 nicht mehr besteht (Selwood *et al.*, 2005). Die Kristallstruktur eines zymogenartigen Trypsin-Monomers konnte bislang noch nicht gelöst werden.

Die hohe Sequenzhomologie zu Trypsin (55%) und Chymotrypsin (52%) deutet auf eine ähnliche Proteinstruktur hin. Reife Trypsase besitzt 245 Aminosäuren und je nach Glykosylierung ein Molekulargewicht zwischen 30-36 kDa. Die von Pereira *et al.* (1998) veröffentlichte Struktur zeigt eine (chymo)trypsinartige Struktur, welche aus zwei sechsträngigen β -barrel-Strukturen besteht (siehe Abbildung 2.3). Die katalytische Triade (Ser195, His57 und Asp102) befindet sich zwischen den beiden β -barrels, während die *active site cleft* senkrecht dazu liegt (die Nummerierung entspricht der Chymotrypsinogen-Nummerierung). Die freie Aminogruppe des N-terminalen Restes Ile16 bildet eine Salzbrücke zum Asp194 aus, welche in vielen reifen trypsinartigen Serinproteinasestrukturen

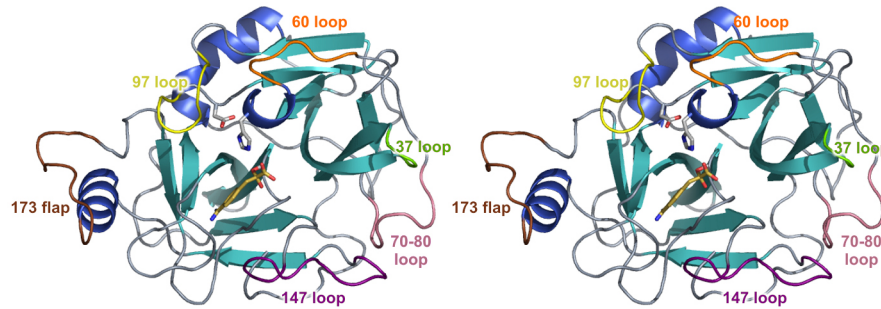


Abbildung 2.3: Proteinstruktur des β II-Tryptase-Monomers mit gebundenem Inhibitor 4-Amidinophenylpyruvat (APPA) als Stereoabbildung. Die katalytischen Triade (Ser195, His57, Asp102) wurde als *ball-and-stick*-Modell dargestellt und die nicht-konservierten Loopregionen farblich hervorgehoben.

zu finden ist. Diese Salzbrücke ermöglicht die Ausbildung der tiefen S1-Tasche, welche für die Präferenz für große Seitenketten, wie bei Arginin und Lysin, verantwortlich ist. Diese Präferenz wird noch durch das Vorhandensein eines Aspartats (Asp189) am Boden der S1-Tasche verstärkt. Die β -Tryptase-Isoenzyme besitzen bis auf β II-Tryptase zwei Glykosylierungsstellen an Asn113 und Asn204. Die Glykosylierungsstelle am Asn113 ist bei β II-Tryptase aufgrund einer Substitution (Asn113Lys) nicht vorhanden, was zu einer weniger pH-abhängigen Heparinaffinität führt, die mit einer höheren Tendenz zur Aggregatbildung einhergeht (Hallgren *et al.*, 2004). Während das Grundgerüst, bestehend aus den beiden β -barrels und zwei α -Helices, in hohem Maße strukturell konserviert ist, sind bei den sechs nicht-konservierten *loop*-Regionen (37-*loop*, 60-*loop*, 70-80-*loop*, 97-*loop*, 147-*loop*, 173-*flap*) starke Unterschiede bezüglich Sequenz und Faltung vorhanden. Die meisten der zum Trypsin veränderten Aminosäuren sind in diesen sechs *loop*-Regionen lokalisiert. Die Aminosäurezusammensetzung der Loopregionen ermöglicht die Tetramerisierung der Tryptase. Die vier Monomere besetzen dabei die vier Ecken eines rechteckigen Rahmens. Alle vier aktiven Zentren weisen in Richtung der zentralen Pore. Aufgrund der Anordnung der Monomere ergibt sich ein nahezu perfektes 222-symmetrisch aufgebautes Tetramer (siehe Abbildung 2.4). Diese Anordnung erklärt die sehr eingeschränkte Substratspezifität, da nur Peptide mit dem Durchmesser einer α -Helix an die aktiven Zentren gelangen können. Das Innere der zentralen Pore sowie die Kontaktbereiche der Monomere A und D bzw. B und C (auch als A-D-Interface bezeichnet) weisen ein negatives elektrostatisches Potential auf. Dagegen besitzt die Peripherie im Kontaktbereich der Monomere A und B bzw. C und D (A-B-Interface) ein eher positives elektrostatisches Potential, das sich über eine Länge von ca. 100 Å entlang der Monomere A und B (bzw. C und D) erstreckt. Es wird vermutet, dass es sich dabei um die Proteoglykanbindungsstelle handelt (Marquardt *et al.*, 2002). Durch Mutageneseexperimente konnten vier Histidine (His48, His117, His119 und His239) identifiziert werden, welche für die Bindung von Proteoglykanen wie Heparin essentiell sind (Hallgren *et al.*, 2004). Das A-B-Interface entsteht durch Interaktion der 37-*loops*, 70-80-*loops* und 152-*loops* der

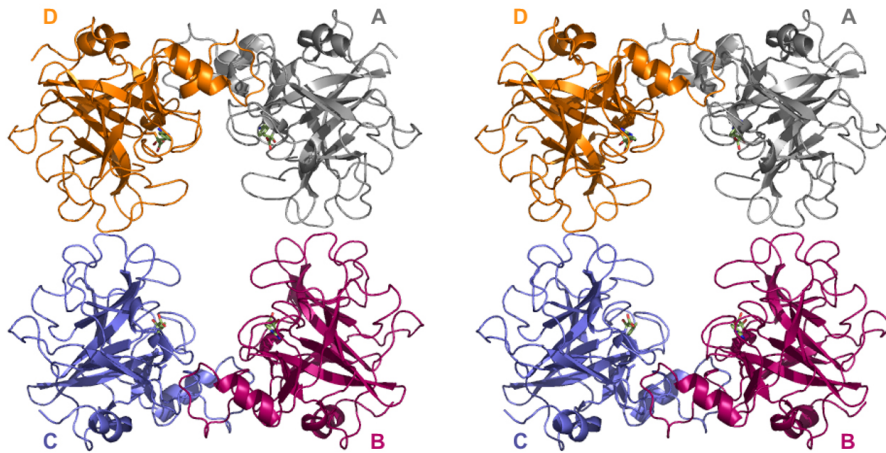


Abbildung 2.4: Proteinstruktur des β II-Tryptase-Tetramers als Stereoabbildung. Die vier Monomere A (grau), B (pink), C (blau) und D (orange) bilden das Tryptase-Tetramer, dessen vier aktive Zentren in Richtung innere Öffnung orientiert sind. Der Inhibitor APPA wurde als *ball-and-stick*-Modell dargestellt.

beteiligten Monomere und stellt das kleinere der beiden Kontaktflächen dar. Das Zusammenhalten dieser Kontaktfläche beruht ausschließlich auf hydrophobe Interaktionen und erfordert deshalb möglicherweise die zusätzliche Stabilisierung durch Proteoglykane. Das A-D-Interface besteht aus jeweils zwei *60-loops*, *97-loops* und *173-flaps* und wird durch hydrophobe Interaktionen, Wasserstoffbrücken und Salzbrücken stabilisiert.

Neben der Kristallstruktur der β II-Tryptase konnte die Struktur der α I-Tryptase gelöst werden (siehe Kapitel 2.1.3). Strukturen des γ I- und ε -Monomers wurden dagegen mit Hilfe von Modellierungsexperimenten näher beschrieben (Caughey *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2001). Aufgrund der fehlenden tyrosin- und prolinreichen Domänen ist die Tetramerisierung bei γ I- und ε -Tryptase unwahrscheinlich. Neben den Modellierungsexperimenten konnte auch die funktionelle Analyse zeigen, dass γ I- und ε -Tryptase eine unterschiedliche Substratspezifität aufweisen.

Biologische Funktion der β -Tryptase

Enzymatische und molekulare Eigenschaften der Tryptase sind weitaus besser erforscht als ihre biologische Funktion. Aufgrund der strukturellen und funktionellen *in-vitro*-Analysen wird angenommen, dass Tryptase bevorzugt kleine Peptide und nur vereinzelt große Substrate spaltet. Ebenso wie Trypsin spaltet β -Tryptase C-terminal von Arginin- oder Lysin-Resten (P1). Mit Hilfe von kombinatorischen Tetrapeptid-Bibliotheken konnten Präferenzen für die P2-P4-Reste ermittelt werden. Während an der P3-Position ebenfalls Arginin oder Lysin bevorzugt wird, weist die Tryptase an der P2- und P4-Position keine besondere Präferenz auf. Es konnte nur eine sehr geringe Präferenz für Asparagin als P2-Rest und Prolin als P4-Rest nachgewiesen werden (Harris *et al.*, 2001).

Die physiologische oder pathologische Rolle der Tryptase ist an die Verteilung der Mastzellen im Körper gekoppelt. Im respiratorischen Trakt spielt Tryptase eine Rolle bei Entzündungen und allergischen Reaktionen wie beispielsweise Asthma. Im Gegensatz zu der Vielzahl anderer Mediatoren, die nach der Aktivierung der Mastzelle sekretiert werden, zeichnet sich Tryptase durch ihre Resistenz gegen eine Vielzahl von endogenen oder proteinbasierten Inhibitoren und durch den, verglichen zu anderen Mediatoren, relativ lange anhaltenden aktivierten Zustand der Tryptase aus. Dies erhöht beispielsweise die Anfälligkeit und das Ausmaß der Bronchienverengung bei atopischem Asthma. Tam und Caughey (1990) zeigten, dass Tryptase bronchienweiternde Neuropeptide wie das *vasoactive intestinal peptide* (VIP), das *peptide histidine-methionine* (PHM) oder das *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) spaltet (Tam und Caughey, 1990). Tryptase wirkt chemotaktisch auf Eosinophile und Neutrophile. Die (auto-)aktivierende Wirkung auf Mastzellen wiederum bewirkt, dass die durch Mastzelldegranulation hervorgerufenen Effekte noch weiter verstärkt und/oder verlängert werden (He *et al.*, 1997). Der Protease-aktivierte Rezeptor PAR-2 ist ein weiteres wichtiges Substrat der Tryptase. Dieser oberflächenlokalisierte Rezeptor der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren induziert die Eicosanoid-abhängige Verengung der Bronchien (Cocks *et al.*, 1999). Tryptase wirkt jedoch auch auf längere Sicht und induziert Gewebsveränderungen der Lungen und Gefäße, indem sie fähig ist, in bestimmten Zelltypen wie Muskelzellen der glatten Muskulatur und der Fibroblasten der Lungen und der Dermis Mitose auszulösen (Akers *et al.*, 2000; Berger *et al.*, 2001). Die proteolytische Spaltung von PAR-2 induziert die Synthese und Sekretion des Zytokins TGF- β I, was die bereits erwähnte Autoaktivierung der Mastzellen durch Tryptase bewirkt (Berger *et al.*, 2003).

Das aktive Tryptase-Tetramer, dessen vier aktive Zentren in eine von den Monomeren gebildete zentrale Pore weisen, bevorzugt kleine Peptide mit dem Durchmesser von maximal einer α -Helix. Es gibt jedoch eine geringe Anzahl makromolekularer Substrate wie Fibrinogen, Fibronectin und Kininogen (Huang *et al.*, 1997; Fajardo und Pejler, 2003; Imamura *et al.*, 1996). Dockingexperimente zeigen, dass große Substrate wie Pro-Matrix-Metallo-Protease-3 (pro-MMP3, pro-Stromelysin) und Pro-Urokinase nur an exponierten Oberflächen-Loops gespalten werden können (Gruber *et al.*, 1989; Stack und Johnson, 1994; Sommerhoff *et al.*, 2000). Bei Krankheiten wie Arthritis, Sklerosis und Parodontitis, wo MMP-3-Aktivität mit dem Abbau von Knorpelgewebe einhergeht, spielt die Tryptase möglicherweise durch Aktivierung von MMP-3 eine wesentliche Rolle. Ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Auftreten von Mastzellen bzw. Mastzellmediatoren und Multiple-Sklerose-Plaques ist seit längerer Zeit bekannt. Neuerdings konnte jedoch gezeigt werden, dass Tryptase durch Aktivierung der zytokin-sekretierenden primären Effektorzellen (periphere monozytäre Blutzellen; PBMC) für die Ausbildung der Läsionen von Bedeutung ist (Malamud *et al.*, 2003). Tryptase aktiviert pro-Urokinase (*single-chain urinary-type plasminogen activator*), die häufig im Umfeld von invasiven Zellen und Metastasen gefunden werden kann. Es wird angenommen, dass die durch Mastzelldegranulierung hervorgerufene Gewebsveränderungen und Angiogenese in der Nähe von Tumoren für die Versorgung und Metastasierung der Tumore verantwortlich sind und dass Tryptase maßgeblich an diesen Angiogenesevorgängen beteiligt ist (Blair *et al.*, 1997; Fiorucci und Ascoli, 2004).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Wirkungsbereich der Tryptasen und damit auch die von ihnen hervorgerufenen pathologischen Veränderungen sehr breit gefächert ist. Durch Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix und Basallamina spielt Tryptase bei Asthma, Schuppenflechte und anderen akuten und chronischen Entzündungen eine wesentliche Rolle. Tumorwachstum kann durch Tryptase gefördert werden, indem die Versorgung der Tumore durch die von der Tryptase bewirkte Angiogenese sichergestellt wird. Auch bei Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose oder Arthritis und der Abwehr von bakteriellen Invasionen spielt die Tryptase eine wichtige Rolle (Rozniecki *et al.*, 1995; Fajardo und Pejler, 2003; Huang *et al.*, 2001). Die genauen Zusammenhänge zwischen der Tryptase und den dargestellten Pathologien sind bisher jedoch noch nicht ausreichend erforscht. Um die biologische Funktion der Tryptase genauer erforschen zu können und um die durch die Tryptase verursachten Krankheiten mildern zu können, sind hochspezifische Inhibitoren notwendig.

Tryptase-Inhibitoren

Aufgrund der Homologie zu Trypsin existieren eine Reihe unspezifischer, synthetischer Inhibitoren wie Leupeptin, Benzamidin oder Antipain, die jedoch nicht für die spezifische Inhibition der β -Tryptase geeignet sind. Benzamidinderivate wie 4-Amidinophenylpyruvat (APPA) oder monobasische Inhibitoren wie Gabexat-Mesilat zeigen eine höhere Selektivität für Tryptase gegenüber Trypsin auf (Stürzebecher *et al.*, 1992; Erba *et al.*, 2001). Die hohe Affinität für dibasische Inhibitoren wie bis-(5-Amidino-2-Benzimidazolyl)-Methan (BABIM) basiert auf der tetraedrischen Koordination eines Zinkions zwischen BABIM, His57 und Ser195. Der Vorteil dieser Inhibitoren liegt in der hohen Affinität, jedoch ist die Selektivität gegenüber Trypsin und anderen trypsinartigen Serinproteinasen zu gering, um Effekte eindeutig der Tryptase zuordnen zu können (Hallgren und Pejler, 2006).

Heparinantagonisten wie Laktoferrin und Myeloperoxidase funktionieren nach einer anderen Strategie. Sie inaktivieren Tryptase durch Verdrängung der Tryptase vom Heparin, was zu einer Destabilisierung des Tryptase-Tetramers führt (Fiorucci und Ascoli, 2004). Der wohl aussichtsreichste Tryptaseinhibitor, der peptidische Inhibitor APC-366, wurde am Schafmodell sowie in klinischen Studien an atopischen Asthmapatienten getestet (Cregar *et al.*, 1999; Krishna *et al.*, 2001). Die im Schafmodell durch APC-366 inhibierte frühe asthmatische Antwort (*early asthmatic response*; EAR) konnte am Menschen jedoch nicht in gleichem Ausmaß beobachtet werden (Krishna *et al.*, 2001).

Die Veröffentlichung der Kristallstruktur des β II-Tryptase-Tetramers eröffnete neue Möglichkeiten, hochspezifische Inhibitoren der Tryptase zu entwickeln. Bivalente Inhibitoren, mit Cyclodextrin oder Polyethylenglykol als flexible Linker, sowie die bereits an Tiermodellen getesteten Inhibitoren AMG-126737 und MOL-6131 besitzen sowohl eine höhere Spezifität als auch eine höhere Affinität (Wright und Dyson, 1999; Oh *et al.*, 2002; Cairns, 2005). Ebenfalls in klinischer Erprobung (Phase II) gegen ulzerative Kolitis und Psoriasis war APC-2059, ein bivalenter Inhibitor, der eine deutlich höhere Selektivität gegenüber Trypsin besitzt. Die Applikation von APC-2059 führte bei der Hälfte der Patienten zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes (Tremaine *et al.*, 2002).

Aufgrund der Ausbildung von Tryptase-Tetrameren mit den in der zentralen Pore lokalisierten aktiven Zentren sind endogene Inhibitoren wirkungslos gegen β -Tryptase. Nur der *leech derived trypsin inhibitor* (LDTI), isoliert aus *Hirudo medicinalis*, kann Tryptase in nanomolaren Konzentrationen zu 50 % inhibieren (Sommerhoff *et al.*, 1994). Die vollständige Inhibition durch endogene Inhibitoren konnte bisher nicht gezeigt werden. Die Modellierung von LDTI in das Tryptase-Tetramer zeigte, dass nur zwei Moleküle in die zentrale Pore passen, was im Einklang zur 50 %igen Inhibition steht (Pereira *et al.*, 1998). Dagegen konnten potente Tryptaseinhibitoren in anderen Organismen identifiziert werden. Trypstatin inhibiert Tryptase in *Rattus norvegicus* (Itoh *et al.*, 1994), *bovine pancreatic trypsin inhibitor* (BPTI) inhibiert in mikromolaren Konzentrationen bovine Tryptase 1 und 2 vollständig (Fiorucci *et al.*, 1995). LDTI zeigt dagegen bei boviner Tryptase kaum Inhibition (Erba *et al.*, 2000).

2.1.3 Humane α I-Tryptase

Aktivierung durch Dipeptidyl-Peptidase I

Obwohl α - und β -Tryptasen eine sehr hohe Sequenzhomologie von 92-95 % aufweisen (siehe Abbildung 2.2), gibt es Unterschiede in der Lokalisation, der enzymatischen Aktivität und der Stabilität. Sakai *et al.* (1996) nehmen an, dass im Gegensatz zur β -Tryptase die α -Tryptasen aufgrund eines Glutamins anstelle eines Arginins an Position -3 nicht korrekt prozessiert werden können. Dies hat einen gravierenden Einfluss auf deren Lokalisation. Während die β -Tryptase in den sekretorischen Granula bis zur Aktivierung der Mastzelle gespeichert wird, wird die α I-Tryptase als inaktives Proenzym kontinuierlich sekretiert (Sakai *et al.*, 1996). Die Rolle von Glu-3 bei der Prozessierung der α -Tryptase wurde jedoch angezweifelt (Huang *et al.*, 1999). Diese Zweifel wurden durch Untersuchungen mit spezifischen Antikörper bestärkt, da gezeigt werden konnte, dass die β -Tryptase zu einem gewissen Anteil ebenfalls als Proenzym sekretiert wird (Caughey, 2001). Dipeptidyl Peptidase I spielt bei der Aktivierung der Tryptasen zwar eine entscheidende Rolle, da Dipeptidyl-Peptidase-I-defiziente Mäuse die β -Tryptase nur in geringerem Umfang korrekt prozessieren können, jedoch zeigen diese Untersuchungen gleichzeitig, dass es weitere, bislang unbekannte Mechanismen geben muss, durch die β -Tryptase und möglicherweise auch α I-Tryptase aktiviert wird (Wolters *et al.*, 2001).

Enzymatische Aktivität

Während für die β -Tryptase eine Vielzahl physiologischer Funktionen bekannt sind, wurde bisher kaum über die biologische Relevanz der α I-Tryptase berichtet. Die einzig bekannte physiologische Funktion besteht in der Aktivierung des PAR-2 Rezeptors. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinant exprimierte α I-Tryptase in COS-Zellen zur aktiven Form prozessiert werden kann und diese das chromogene Substrat tosyl-Gly-Pro-Arg-4-Nitroanilid Acetat sowie den Rezeptor PAR-2 spaltet (Mirza *et al.*, 1997).

Huang *et al.* (1999) konnten enzymatische Aktivität bei rekombinant exprimierter und bei durch Enterokinasespaltung aktivierter α I-Tryptase nachweisen. Auch konnte gezeigt werden, dass die α I-Tryptase den Inhibitor DFP binden kann, dagegen jedoch nicht in der Lage ist, Fibrinogen zu spalten. Erste Indizien zeigten, dass die Aminosäure an Position 216 eine wichtige Rolle bei der „kontroversen“ Aktivität der α I-Tryptase spielt. Während dieser Rest bei β -Tryptasen und bei den meisten anderen chymotrypsinartigen Proteinasen ein Glycin ist, besitzt die α I-Tryptase an dieser Stelle ein Aspartat (Huang *et al.*, 1999).

Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe verschiedener α I-Tryptase-Mutanten bestätigt und eingehender untersucht (Selwood *et al.*, 2002). In der Nähe des aktiven Zentrums besitzt α I-Tryptase zwei Aminosäuren Lys192 und Asp216, die sich von β II-Tryptase unterscheiden (Gln192 und Gly216). Selwood *et al.* (2002) erzeugten drei humane α I-Tryptase-Mutanten (rHT α), deren Aminosäurerest 192 und/oder 216, also zu den in β -Tryptase jeweils vorhandenen Aminosäuren, mutiert wurde. Die durch Enterokinase zur aktiven Form prozessierten Mutanten rHT α -D216G, rHT α -K192Q und rHT α -K192Q/D216G wurden anschließend hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität und Stabilität analysiert. Es stellte sich heraus, dass rekombinant exprimierte Wildtyp- α I-Tryptase (rHT α) und rHT α -K192Q weder enzymatische Aktivität gegenüber kleinen Substraten wie tosyl-Gly-Pro-Lys-4-Nitroanilid besitzen noch eine Reaktion mit 4-Methylumbelliferyl-4-Guanidinobenzoat (MUGB) zeigen. Dagegen reagierten rekombinant exprimierte β II-Tryptase (rHT β), rHT α -D216G und rHT α -K192Q/D216G mit MUGB und verschiedenen Substraten. Aufgrund der Inaktivität der Mutante rHT α -K192Q folgerten Selwood *et al.* (2002), dass Gly216 für die Aktivität der Tryptase essentiell ist und Lys192 eine wichtige Rolle spielt. Die genaue Bedeutung von Lys192 konnte jedoch nicht geklärt werden. Darüber hinaus wiesen die verschiedenen Tryptase-Mutanten starke Unterschiede in Stabilität und Zerfallsrate des Tetramers auf, die mit der enzymatischen Aktivität korreliert. Hohe enzymatische Aktivität geht mit einer niedrigen Stabilität und hohen Zerfallsrate einher. Während bei β -Tryptasen Heparin oder hohe Salzkonzentrationen für die Tetramerstabilität essentiell sind, ist die α -Tryptase auch ohne Heparin und bei niedrigeren Salzkonzentrationen stabil (Selwood *et al.*, 2002). Die Frage, inwieweit Asp216 zu dieser hohen Stabilität der α I-Tryptase beiträgt, konnte jedoch nicht geklärt werden (Selwood *et al.*, 2002).

Kristallstruktur der Wildtyp- α I-Tryptase

Die von Marquardt *et al.* (2002) kurze Zeit später gelöste Kristallstruktur rekombinant exprimierter, humaner α I-Tryptase konnte den Grund für die stark reduzierte enzymatische Aktivität der α I-Tryptase aufzeigen und gleichzeitig bestätigen, dass α I-Tryptase ebenfalls das unter nativen Bedingungen vorhandene Tryptase-Tetramer ausbildet. α I-Tryptase besteht aus vier Monomeren, welche die Ecken eines Rahmens besetzen. Die aktiven Zentren weisen wie bei der β II-Tryptase zum Innern der zentralen Öffnung. Neben einem stark negativen elektrostatischen Potential im Inneren des Tetramers besitzt die Außenseite der Monomere A und B eine Reihe positiv geladener Aminosäuren, wel-

che möglicherweise für die Heparinbindung verantwortlich sind. Die Modellierung einer aus zwanzig Polysacchariden bestehenden heparinartigen Glucosaminoglykankette auf die Oberfläche des Tryptase-Tetramers zeigte, dass diese Region aufgrund ihrer Ladung und der Ausdehnung für Heparinbindung geradezu prädestiniert ist.

Die Struktur des Tryptase-Monomers entspricht weitgehend der von trypsinartigen Serinproteinasen. Das aktive Zentrum befindet sich zwischen zwei sechsträngigen β -barrels, die zueinander senkrecht stehen. Was die Aktivierung angeht, so zeigt α I-Tryptase die für trypsinartige Serinproteinasen typische Salzbrücke zwischen dem N-Terminus (Ile16) und Asp194. Dies ist in der Regel ein Zeichen für die korrekt ausgebildete S1-Tasche und einer aktiven Substratbindestelle (Bode, 1979). Dennoch zeigt α I-Tryptase im Vergleich zur β -Tryptase kaum enzymatische Aktivität. Der Grund dafür liegt in der Konformation des Substrat-Bindungsbereichs (214-220-Segment). Dieses Segment besteht aus fünf Aminosäuren und reicht von Ser214 bis Cys220. Seine Bedeutung liegt in der Ausbildung eines rahmenartigen Substratbindungsbereiches, an dem Substrate durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken binden. Dieser flexible Bereich dient der optimalen Ausrichtung des Substrates, wodurch die hydrolytische Spaltung ermöglicht wird. Bei α I-Tryptase hat dieses Segment eine vollkommen andere, neuartige Konformation. Das Segment verläuft quer über den Eingang zur S1-Tasche. Aufgrund des Aminosäureaustauschs an Position 216 (Glycin in β II-Tryptase, Aspartat in α I-Tryptase) ragt die in α I-Tryptase vorliegende Seitenkette des Aspartats in die Oxyaniontasche und bildet Wasserstoffbrücken mit den Amidwasserstoffatomen von Gly193 und Ser195 aus (siehe Abbildung 4.6). Diese Zickzack-Konformation erschwert die Substratbindung in zweierlei Hinsicht. Zum Einen ist der Zugang zur Oxyaniontasche blockiert, zum Anderen muss für eine erfolgreiche Substratbindung das 214-220-Segment erst eine β -tryptaseartige Konformation annehmen, was zusätzliche Energie erfordern würde. Bei der Frage der enzymatischen Aktivität der α I-Tryptase gehen die Meinungen der Forscher zwar auseinander, jedoch zeigt der Vergleich der beiden Tryptasekristallstrukturen, dass die Ursache für die deutlich reduzierte enzymatische Aktivität höchstwahrscheinlich in der Konformationsänderung des 214-220-Segments liegt.

2.1.4 Zielsetzung

Die Kristallstrukturen der humanen β II-Tryptase (Pereira *et al.*, 1998) und der α I-Tryptase (Marquardt *et al.*, 2002) lassen gravierende Unterschiede im Bereich des aktiven Zentrums und des Substratbindungsbereichs erkennen, welche möglicherweise für die deutlich reduzierte enzymatische Aktivität der α I-Tryptase verantwortlich sind (Huang *et al.*, 1999; Selwood *et al.*, 2002). Selwood *et al.* (2002) konnten zeigen, dass durch Mutation der Aminosäure 216 und/oder 192 die enzymatische Aktivität der α I-Tryptase wieder hergestellt werden kann, was gleichzeitig mit einem Verlust der Tetramerstabilität einhergeht. Ziel dieser Arbeit war die strukturelle Analyse dieser humanen α I-Tryptase-Mutanten rHT α -D216G (rHT α G^I) und rHT α -K192Q/D216G (rHT α QG^I) im Komplex mit dem Peptidinhibitor Leupeptin. Aufgrund der im Vergleich zur β -Tryptase erhöhten Tetramerstabilität der Mutante rHT α -D216G (rHT α G) sollte diese enzymatisch aktive

Tryptase-Mutante zusätzlich ohne die stabilisierende Wirkung eines Inhibitors kristallisiert werden. Die Kristallstrukturen sollten Rückschlüsse auf die Rolle der Aminosäuren an den Positionen 192 und 216 bezüglich Aktivität und Stabilität bei Tryptasen geben und zeigen, ob die komplette Rückfaltung des 214-220-Segments, welches bei der α I-Tryptase über den Eingang zur S1-Tasche hinausragt, durch Mutation dieser Reste ermöglicht werden kann. Der Inhibitor Leupeptin wurde gewählt, um erweiterte Substratbindungsstellen aufzuzeigen, die durch Verwendung des Inhibitors 4-Amidinophenylpyruvat bei der Kristallisation der β II-Tryptase nicht analysiert werden konnten.

2.2 Der Separase-Securin-Komplex

2.2.1 Chromosomensegregation

Zell- und Kernteilung wird seit über 100 Jahren erforscht. Der detaillierte Ablauf auf molekularer Ebene ist dagegen erst seit den letzten 15 Jahren bekannt und keineswegs vollständig aufgeklärt. Die Kernteilung (Mitose) soll sicher stellen, dass das Erbgut gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird und muss deshalb streng kontrolliert werden. Ein komplexes Kontrollsystem aus Cyclinen und cyclinabhängigen Proteinkinasen achtet während der verschiedenen Mitosephasen auf die korrekte Verdopplung der DNA, ausreichende Zellgröße, günstige Umgebung und die korrekte Anheftung der Chromosomen an die Mitosespindel. Die in der Synthesephase replizierte DNA liegt während der Mitosephase als kondensierte Chromosomen vor, welche aus zwei am Zentromer verbundene Schwesterchromatide bestehen. Das Zentromer ist gleichzeitig der Anheftungspunkt für die Kinetochor-Mikrotubuli des Spindelapparates, welche während der Anaphase die Schwesterchromatide zu den beiden Zellpolen ziehen. Dieses augenscheinliche „Ziehen“ geschieht jedoch durch die kontinuierliche Depolymerisation sowohl am Plus- als auch am Minusende der Mikrotubuli. Um sicherzustellen, dass nicht beide Schwesterchromatide zum selben Pol gezogen werden, gibt es einen bislang noch nicht komplett verstandenen Mechanismus, der als *chromatid cohesion* bezeichnet wird (Tanaka *et al.*, 2000). Die Anheftung der Mikrotubuli (Kinetochormikrotubuli) an die Kinetochore des Zentromerbereichs erzeugt an den Kinetochormikrotubuli beider Zellpole eine gewisse Spannung, die durch einen Aurora-B-abhängigen Mechanismus kontrolliert wird. Bei der Anheftung beider Chromatide an die Mikrotubuli desselben Pols führt die Abwesenheit einer solchen Spannung zur Destabilisierung der falsch angehefteten Mikrotubuli. In diesem Fall ist der Spindel-Kontrollpunkt (*spindle checkpoint*), bestehend aus Bub- und Mad-Proteinen, Mps1-Kinase, CENP-E, Zw10 und Rod, aktiv und verhindert bis zur bipolaren Anheftung aller Chromosomen an die Mitosespindel das Voranschreiten im Zellzyklus (Nicklas, 1997; Li *et al.*, 1997; Hoyt, 2001). Solange die bipolare Anheftung nicht vollständig ist, sind die Komponenten des Mad-Bub-Komplexes (unter anderem Mad2 und BubR1) an das Kinetochor gebunden und inhibieren Cdc20 (Elledge, 1998), welches im Komplex mit dem *anaphase promoting complex* (APC) für den proteolytischen Abbau des Securins verantwortlich ist (Musacchio und Hardwick, 2002). Werden Mad2 und BubR1 freigesetzt, führt dies zur Aktivierung von APC^{Cdc20} und letztendlich zur Segregation der Chromosomen durch den proteolytischen Abbau des Cohesin-Komplexes.

Der Cohesin-Komplex

Die Kohäsion der Chromatide wird durch einen ringartigen Komplex aus mehreren Proteinen (Smc1, Smc3, Scc1, Scc3) gewährleistet, der als Cohesin bezeichnet wird (Haering und Nasmyth, 2003). Die zwei Untereinheiten Smc1 und Smc3 (oder analog Smc2 und Smc4) besitzen am N- und C-Terminus globuläre Domänen (*head*), die durch zwei lange *coiled-coil*-Regionen verbunden sind (Uhlmann, 2003). Im Komplex bilden die *coiled-coil*-

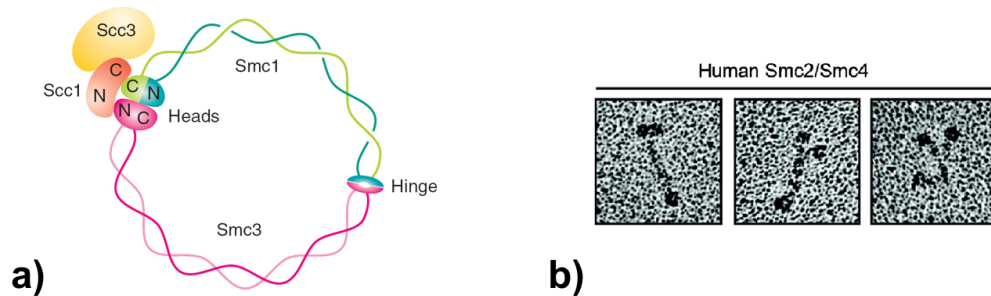


Abbildung 2.5: Der Cohesin-Komplex. (a) Schematische Darstellung des Cohesin-Komplexes (Abbildung aus Uhlmann, 2003). (b) Elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Konformationen von humanen Smc2/Smc4-Komplexen (Abbildungen aus Anderson *et al.*, 2002).

Regionen einen langen α -helikalen Bereich, der im Zentrum ein flexibles Gelenk (*hinge*) besitzt (siehe Abbildung 2.5). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass sich die Scc-Untereinheiten (Scc1 und Scc3) an der Kopfregion der Smc-Untereinheiten befinden, wobei nur Scc1 direkt mit Smc1 und Smc3 interagiert (Anderson *et al.*, 2002). Für die Trennung der Schwesterchromatide ist die Spaltung des Cohesins notwendig. Dies geschieht durch hydrolytische Spaltung der Untereinheit Scc1 durch die Cysteinprotease Separase. Separase wurde dem CD-Clan der Cyststeinproteinasen (E.C.3.4.22.49) zugeordnet und wird vermutlich in allen Eukaryonten exprimiert. In *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Aspergillus nidulans* verhindern Mutationen, die zur Inaktivität der Separase führen, die Trennung der Chromatide. Dies hat fatale Folgen für den Organismus, da der Zellzyklus nicht gestoppt wird und die Chromosomen nicht gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden. Da zusätzliche Spindelpolkörper (in höheren Eukaryonten als Zentromer bezeichnet) und re-replizierte Chromosomen in den Tochterzellen vorgefunden wurden, wurde der Phänotyp *extra spindle pole mutant* genannt, was der Separase auch den Namen ESP1 eingebracht hat (Baum *et al.*, 1988).

2.2.2 Die Familie der Separasen

Die Separase ist eine relativ große Proteinase mit einem Molekulargewicht von ca. 150-230 kDa. Bislang konnten Separasen bei Tieren (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*), Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*), Pilzen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) und parasitischen Protozoen (*Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*) gefunden werden. Die C-terminale Domäne ist unter allen Separasen konserviert und wird als Separase-Domäne bezeichnet. Die Zuordnung zum CD-Clan, zu der auch Clostripain, Gingipain R und Caspasen gehören, erfolgte aufgrund ihrer Sequenzhomologie.

Humane Separase besitzt 2.120 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 220 kDa. Die im C-terminalen Bereich lokalisierte katalytische Domäne reicht von Aminosäure

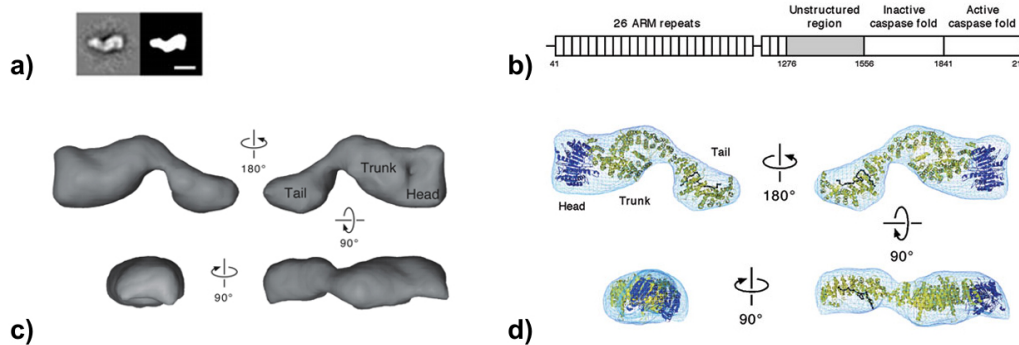


Abbildung 2.6: Rekonstruktion der humanen Separase im Komplex mit dem Inhibitor Securin anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen. (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Separase-Securin Komplexes ($10\ \mu\text{m}$ -Skalierung). (b) Schematische Darstellung der Separase. (c,d) Verschiedene Ansichten der Domänenstruktur humaner Separase im Komplex mit Securin. 3D-Rekonstruktion des Separase-Securin-Komplexes als Oberfläche (c) und transparente Oberfläche (d) mit dem von Viadiu *et al.*, (2005) vorgeschlagenem Modell, welches auf der Importin- β - (gelb) und der Caspase-3-Struktur (blau) basiert. Die Bilder wurden von Viadiu *et al.* (2005) übernommen.

1.276-2.120 und grenzt N-terminal an drei autokatalytische Erkennungssequenzen. Mutagenesestudien zeigten, dass sich das Cystein und das Histidin der katalytischen Dyade an den Positionen Cys2029 und His2003 befinden (Uhlmann *et al.*, 1999). Die proteolytische Spaltung der Scc1-Untereinheit des Cohesinkomplexes erfolgt C-terminal der Konsensussequenz ExxR (Position 172 und 450), jedoch nur, wenn Scc1 zuvor durch Polo-like-Kinase phosphoryliert wurde (Hornig und Uhlmann, 2004).

Viadiu *et al.* (2005) konnten die molekulare Struktur des Separase-Securin-Komplexes mit einer Auflösung von $25\ \text{\AA}$ elektronenmikroskopisch (EM) aufklären. Der Komplex besitzt eine Länge von $180\ \text{\AA}$ und eine Breite von $60\ \text{\AA}$. Im zentralen Bereich befindet sich eine unstrukturierte, flexible Region, welche den α -helikalen N-Terminus und die C-terminale katalytische Domäne verbindet (siehe Abbildungen 2.6b). Neue strukturelle Analysen zeigen, dass diese katalytische Domänen zwei caspaseartige Faltungen aufweisen, von denen die Erste aufgrund der katalytischen Reste Ala1715 und Thr1743 vermutlich inaktiv und die Zweite (His2003, Cys2029) aktiv ist. Die im N-terminalen Bereich lokalisierten 26 ARM-Motive (Armadillo-Motive) weisen eine hohe Homologie zu Importin- β auf. Das von Viadiu *et al.*, (2005) in Abbildung 2.6 vorgeschlagene Modell des Separase-Securin-Komplexes beinhaltet die Importin- β -Struktur sowie die Caspase-3 Struktur (Viadiu *et al.*, 2005). Die Lage des Securins in diesem Komplex ist weitgehend unbekannt, jedoch schlagen die Autoren vor, dass sich Securin breitflächig an die Separase anschmiegt, wie es beispielsweise bei der Bindung von Axin an β -Catenin bereits gezeigt wurde (Shi, 2004). Eine hochaufgelöste Struktur des Separase-Securin-Komplexes oder der strukturierten Regionen würde detaillierte Informationen über die Interaktion von Separase und Securin ergeben.

2.2.3 Regulation der chromosomalen Segregation

Nachdem die Spaltung des Cohesins ein irreversibler Schritt im Zellzyklus ist, dessen Fehlregulation fatale Folgen hat, wurden im Laufe der Evolution verschiedene Regulationsmechanismen der Separase etabliert. Die Regulation erfolgt durch die Phosphorylierung des Substrates Scc1 und durch die Inhibition der Separase. Ein wichtiger Regulator der Separase ist dabei der Inhibitor Securin (Pttg oder Pds1). Wie in Abbildung 2.7 gezeigt, wird Securin zu Beginn der Anaphase nach der Ubiquitinylierung durch den APC^{Cdc20} im Proteasom degradiert (Cohen-Fix *et al.*, 1996; Funabiki *et al.*, 1996). Nach der Dephosphorylierung wird die Separase aktiv und ermöglicht durch Spaltung des Cohesin-Komplexes das Voranschreiten im Zellzyklus. Securin übt jedoch möglicherweise noch einen weiteren regulatorischen Einfluss auf die Separase aus, indem es für die korrekte Lokalisation der Separase und deren aktive Konformation durch eine zusätzliche Chaperonfunktion verantwortlich ist (Hornig *et al.*, 2002). Beim Vorhandensein von DNA-Schäden wird dagegen eine weitere Kinase (Chk1) aktiv, die Securin phosphoryliert und somit vor Ubiquitinylierung durch den *anaphase promoting complex* schützen kann (Sanchez *et al.*, 1999).

Neben der Regulation des Separasesubstrats Scc1 und des Inhibitors Securin wird möglicherweise die Proteinexpression und Lebensdauer der Separase streng kontrolliert, da hohe Separasekonzentrationen während der Metaphase auftreten und während der Anaphase sinken. Separase besitzt direkt vor der katalytischen Domäne drei autokatalytische Spaltstellen (Arg1486, Arg1509 und Arg1535) mit der Konsensussequenz ExxR (Waizenegger *et al.*, 2002). Inwiefern die Spaltung der Aktivierung oder der Degradation dient, ist bislang unklar. Auch wird der Spaltung eine weitere nicht-proteolytische, jedoch bisher unbekannt Funktion zugeschrieben. Untersuchungen mit Zellen, die nicht-spaltbare Separase exprimieren, weisen Defekte im Aufbau der Mitosespindel und der Ausrichtung von Metaphasechromosomen entlang der Metaphaseplatte auf (Papi *et al.*, 2005). Diese Störungen treten vor der eigentlichen Aktivierung der Separase auf und deuten auf zusätzliche Separasefunktionen hin. Es konnte gezeigt werden, dass gespaltene und ungespaltene Separase Securin binden kann und die einzelnen Fragmente nicht-kovalent verbunden bleiben. Nachdem die Spaltung nicht unbedingt für enzymatische Aktivität erforderlich ist, wird angenommen, dass dies der erste Schritt in der Degradation der Separase ist (Waizenegger *et al.*, 2002).

Welchen Effekt die Phosphorylierung der Separase auf deren Aktivität hat, konnte bisher noch nicht ausreichend geklärt werden, jedoch könnte dies noch ein weiterer Securin-unabhängiger Kontrollmechanismus sein (Stemmann *et al.*, 2005).

2.2.4 Transformierende Aktivität des Securins

Bevor die Rolle des Securins als Regulator der Separase bekannt war, wurde das Securin-Gen (*pituitary tumor-transforming gene, pttg*) als Protoonkogen identifiziert. Securin ist bei Signalübertragungsvorgängen über die MAP-Kinase-Kaskade beteiligt und interagiert dabei mit dem *c-myc*-Promotor. Das Produkt des *c-myc*-Gens wiederum bindet direkt an die *p53*-Promotorsequenz (Hamid und Kakar, 2004). Securin kann dadurch

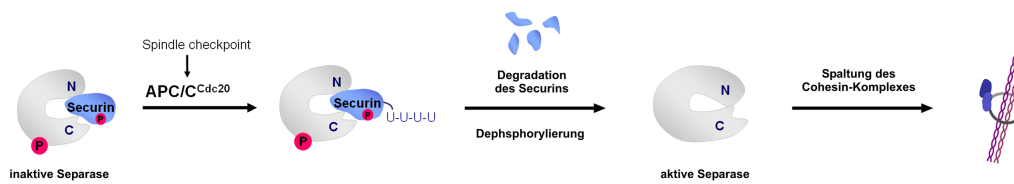


Abbildung 2.7: Die Aktivierung der Separase durch Degradation des Securins. Securin interagiert mit der Separase im N- und C-terminalen Bereich. Nach Ubiquitylierung des Securins erfolgt dessen Degradation durch das Proteasom. Die CyclinB-abhängige Dephosphorylierung der Separase führt zur Aktivierung der Cysteinproteinase, die daraufhin die Scc1-Untereinheit des Cohesin-Komplexes spaltet.

indirekt die *p53*- und auch die *bax*-Expression hochregulieren (Pei, 2001). Der genaue Zusammenhang zwischen Überexpression des Protooncogens *pttg* und der Tumorentstehung ist nicht genau bekannt, jedoch wird vermutet, dass dies über die *c-myc*-abhängige Veränderung der *p53*-Expression und Induktion der *bax*-Expression geschieht (Hamid und Kakar, 2004). Securin wird in allen Tumorarten der Hirnanhangdrüse und verschiedenen Schilddrüsen-, Brust-, Dickdarm-, Keimzell- und Testistumoren überexprimiert (Puri *et al.*, 2001). Insbesondere bei Tumoren der Hirnanhangdrüse, Schilddrüse und der Speiseröhre korreliert die Invasivität mit der Höhe der Securinexpression (Zhang *et al.*, 1999; Saez *et al.*, 2006), womit sich Securin auch als prognostischen Marker anbietet.

2.2.5 Zielsetzung

Separase und ihr Inhibitor Securin spielen eine überaus wichtige Rolle während den Zellteilungsvorgängen, da die Separase durch die Hydrolyse der Cohesinuntereinheit Scc1 für die Trennung der Schwesterchromatide und den Eintritt in die Anaphase verantwortlich ist. Separase wird aufgrund der C-terminalen Proteinasedomäne und der Homologie zu Proteinase wie Caspase-3 und Gingipain-R dem CD-Clan zugeordnet. Die Kristallstruktur des Separase/Securin-Komplexes bzw. der inhibierten Separase ist von besonderem Interesse, da Separase ein strukturell bislang völlig unbekanntes Protein ist, das eine zentrale Rolle im Zellteilungszyklus einnimmt. Auch die Struktur des Inhibitors Securin ist von besonderem Interesse, da Securin als Protooncogen und potentieller biologischer Marker von pharmakologischem Interesse ist. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung der Expression und eines Protokolls für die Aufreinigung verschiedener Separasefragmente aus *Spodoptera frugiperda* oder *E. coli* für die spätere Kristallisation. Weiterhin sollte humanes Securin exprimiert, aufgereinigt, biochemisch analysiert und kristallisiert werden.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Material und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen BioRad (München), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), QIAGEN (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Die für molekularbiologische Arbeiten verwendeten Enzyme und Vektoren wurden von den Firmen New England BioLabs (Schwalbach) und Invitrogen (Karlsruhe) erworben. Kommerzielle Kristallisations-Screens stammen von den Firmen Hampton Research (Laguna Hills, USA), Emerald BioStructures (Bainbridge Island, USA), Jena Biosciences (Jena), Nextal (Montreal, Kanada) und Sigma-Aldrich (München).

3.1.2 Geräte

Laborgeräte

Äkta Explorer	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Autoklav	Tuttnauer Systec (Wettenberg), 5075 ELV
	Tuttnauer Systec (Wettenberg), 2540 EL
Blot-Apparatur	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Brutschrank	Heraeus (Hanau), B5042
Elektroporator	Stratagene (Heidelberg), Elektroporator 1000
Feinwaage	Satorius (Göttingen), BP 211D
Fluorometer	Tecan (Crailsheim), Safire ^{2TM}
FPLC-Chromatographie-Säulen	Amersham Pharmacia (Freiburg)
FPLC-Systeme	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Homogenisator	IKA-Werke (Staufen), Ultra-Turrax T25 basic
Magnetrührer	IKA-Werke (Staufen), RET
pH-Meter	Mettler-Toledo (Giessen), MP220

	mit Elektrode InLab 410
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Schlauchpumpe	Amersham Pharmacia (Freiburg), LKB T-1
Schüttelinkubator	Braun (Melsungen), HAT
SMART-System	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Sonifier	Branson Ultrasonics (Danbury, USA), W250
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg), compact Eppendorf (Hamburg), comfort
Ultra-Turrax	IKA-Werke (Staufen), T25-Basic
UV/VIS-Spektrometer	Beckmann (München), DU-7500 Perkin Elmer (Wellesley, USA), PE Lambda 17
Waage	Mettler Toledo (Giessen), PE3600
Zentrifugen	Eppendorf (Hamburg), 5804R Eppendorf (Hamburg), 5415R Beckmann (München), J-6M/E Beckmann (München), Avanti TM

Kristallographie

Drehanodengenerator	Rigaku (Kemsing Sevenoaks, Großbritannien), RU200
Detektor	Mar Research (Hamburg), Mar345mm Mar Research (Hamburg), MarCCD
Kristallisationsplatten	Charles Supper Company (Natick, MA USA), CrysChem Greiner Bioone (Frickenhausen), 96-Well
Cryoanlage	Oxford Cryosystems Ltd. (Oxford, Großbritannien)
Kristallisationsroboter	Beckmann (München), Biomek 1000 Zinsser Analytic GmbH (Frankfurt), Cartesian
Lichtmikroskop	Leica (Wetzlar), MZ12 ₅ Leica (Wetzlar), MZ12

3.1.3 Datenbanken

Für die Literaturrecherche sowie zur Analyse der DNA- und Proteinsequenzen wurden folgende Internetadressen und deren Linksammlungen verwendet:

EMBL	http://www.ebi.ac.uk
MEROPS	http://merops.sanger.ac.uk
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
PDB	http://pdbeta.rcsb.org/pdb/Welcome.do
Protein-Protein Interaction Server	http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsp/PP/server
SWISSPROT	http://www.expasy.org
Web of Knowledge	http://www.db-hosts.mpg.de/WoS

3.1.4 Bakterienstämme und Vektoren

Bakterienstämme

Folgende *E. coli*-Bakterienstämme wurden während der Arbeit verwendet:

<i>DH5α</i>	(ITC Biotechnology GmbH, Heidelberg)
BL21(DE3)	(Stratagene, Heidelberg)
Rosetta(DE3) (Cam ^R)	(Novagen, Wisconsin, USA)
Rosetta(DE3)pLysS (Cam ^R)	(Novagen, Wisconsin, USA)

Molekularbiologische Arbeiten wurden mit dem Bakterienstamm *DH5α* durchgeführt. Für die Expression wurden die *E. coli*-Stämme BL21(DE3), Rosetta(DE3) und Rosetta(DE3)pLysS verwendet. BL21 zeichnet sich durch das Fehlen der *lon* und *ompT* Proteinasen aus, welche häufig für die Degradation des rekombinanten Proteins verantwortlich sein können. Die Rosetta-Stämme sind Derivate des BL21-Stammes und enthalten ein zusätzliches Plasmid mit sechs verschiedenen tRNAs. Das Plasmid gleicht die unterschiedliche Verwendung von Codons aus und verhindert Abbrüche der Translation aufgrund fehlender tRNAs. DE3-Stämme sind Lysogene des Bakteriophagen λDE3 und besitzen eine chromosomale Kopie des T7 RNA-Polymerase Gens, welches unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors steht. pLysS-Stämme besitzen zusätzlich ein Plasmid, das das Gen für das T7 Lysozym enthält. T7 Lysozym ist ein Inhibitor der T7 RNA-Polymerase und verhindert somit die basale Transkription vor der eigentlichen Induktion.

Vektoren

Die Plasmide K03, K13, K16, K20, K42 und K44 wurden freundlicherweise von Kelly Boatright (The Burnham Institute, La Jolla, USA) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid K03 enthält große Teile der humanen Separase und diente als Ausgangsplasmid für weitere Klonierungen. Die cDNA-Fragmente der humanen Separase wurden über NdeI und XhoI Restriktionsschnittstellen in den Vektor pET23b (Novagen, Madison, USA) kloniert. K13 (AS 1882-2120), K20 (AS 1918-2120), K42 (AS 1474-2120) und K44 (AS 1419-2120) kodieren für verschiedene Separase-Fusionsproteine mit N-terminalem His-Tag und stehen unter der Kontrolle eines T7 Promotors der durch Zugabe von 5mM IPTG induziert werden kann. Die vollständige cDNA des humanen Securins (AS 1-202) wurde ebenfalls über NdeI und XhoI Restriktionsschnittstellen in den Vektor pET23b kloniert und besitzt einen C-terminalen His-Tag.

3.2 Molekularbiologische Methoden

Bei molekularbiologischen Arbeiten sowie beim Umgang mit Bakterien wurden alle Lösungen zuvor autoklaviert, und es wurde stets steril gearbeitet. Die für die Aufrei-

nung der Proteine und für die Kristallisation verwendeten Puffer und Lösungen wurden zuvor sterilfiltriert und gegebenenfalls entgast.

3.2.1 Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA

Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der Absorption (A) bei 260 nm ermittelt. Es wurde angenommen, dass $A_{260\text{ nm}} = 1$ einer DNA-Konzentration von $50\ \mu\text{g/ml}$ entspricht. Der Quotient A_{260}/A_{280} sollte bei reiner DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *QIAGEN Plasmid Purification Kits* durchgeführt. Das Protokoll beruht auf der alkalischen Lyse der *E.coli*-Zellen, gefolgt von der Fällung chromosomaler DNA und Zellfragmenten mit anschließender Anionenaustauschchromatographie und Isopropanol-Fällung. Je nach Bedarf wurden das *Spin Mini Kit*, das *Midi Kit* oder das *Maxi Kit* verwendet (siehe *QIAGEN Plasmid Purification Handbook* für ein detailliertes Protokoll). Die Plasmid-DNA wurde nach dem Waschen mit 70 % Ethanol in autoklaviertem und destilliertem H_2O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonucleasen

Zur Analyse der Plasmid-DNA sowie für die Klonierung von Separase- und Securin-Fragmenten wurde die DNA durch enzymatischen Verdau gespalten. Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England BioLabs bezogen und der DNA-Verdau nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Analyse des DNA-Verdau wurden 500-750 ng DNA auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zur Analyse und Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden die DNA-Proben mit 5x Probenpuffer (70 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol in 1x TAE-Puffer) und 1x SYBR-Green (Molecular Probes, Eugene, USA) versetzt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,9-1,2 % Agarose-Gele gegossen. Dazu wurde die Agarose in 1x TAE aufgekocht und in eine horizontale Gelkammer gefüllt. Die Elektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer bei 7 V/cm durchgeführt.

50x TAE-Puffer:

242 g	Tris
57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
	ad 1 l dest. H ₂ O

3.2.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma Medigenomix (Martinsried) durchgeführt.

3.3 Mikrobiologische Methoden**3.3.1 Herstellung von Nährmedien**

Nährmedien wurden nach folgenden Rezepten hergestellt und autoklaviert (121 °C, 20 min, 1 bar). Alle Antibiotika-Stocklösungen wurden sterilfiltriert und bei -20 °C aufbewahrt.

Antibiotikastocklösungen:

1.000 x	Ampicillin (Amp):	100 mg/ml	in H ₂ O
1.000 x	Chloramphenicol (Cam):	34 mg/ml	in Ethanol
1.000 x	Kanamycin (Kan):	30 mg/ml	in H ₂ O

LB-Medium**(Luria-Bertani-Medium)**

10 g	NaCl
10 g	Bacto-Trypton
5 g	Hefeextrakt
	ad 1 l dest. H ₂ O

SOB-Medium

0,574 g	NaCl
0,186 g	KCl
20 g	Bacto-Trypton
5 g	Hefeextrakt
	ad 1 l dest. H ₂ O

3.3.2 Anzucht von Bakterienzellen**Plattenkulturen**

Für die Herstellung der Plattenkulturen wurde zum LB-Medium 20 g/l Bacto-Agar gegeben und autoklaviert. Nach dem Auskühlen des LB-Agars wurden Antibiotika zugegeben, gemischt und auf Petrischalen (10 cm Durchmesser) verteilt. Die Platten wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Bakterienzellen wurden mit Hilfe einer ausgeglühten Impfpöse auf den LB-Platten ausgestrichen.

Flüssigkulturen

Abhängig von der weiteren Verwendung der Bakterienzellen wurden verschieden große Flüssigkulturen hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge LB-Medium hergestellt und autoklaviert. Nach dem Auskühlen des Mediums wurde gegebenenfalls Antibiotika zugegeben. Die Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie einer Plattenkultur angeimpft. Test- und Großexpressionen wurden dagegen mit Vorkultur im Verhältnis 1:100 - 1:1.000 angeimpft.

Vorkultur:	5-8 ml	im 15 ml-Falconröhrchen
Testexpression:	100 ml	im 250 ml-Schikanekolben
Großexpression:	1 l	im 2 l-Schikanekolben

Glycerinkulturen

Für die Herstellung lagerungsfähiger *E.coli*-Kulturen, wurde eine Vorkultur hergestellt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Vorkultur wurde mit Glycerin im Verhältnis 1:4 vermischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.3.3 Herstellung elektrokompetenter *E.coli*-Zellen

Vor der Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden alle verwendeten Gegenstände autoklaviert und es wurde stets steril gearbeitet. Weiterhin wurden die Zellen nach der Ernte bei 4 °C zügig weiterverarbeitet.

E.coli-Zellen wurden von einem Glycerinstock auf eine LB-Platte (mit entsprechendem Antibiotikum bei Rosetta(DE3) Zellen) ausgestrichen. Die 50 ml SOB-Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie der Plattenkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die 1 l SOB-Hauptkultur mit 5 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer $OD_{550\text{ nm}} = 0,8$ weiter inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (4.200 rpm, 4 °C, 10 min) der Zellen und dem Abgießen des Überstandes wurden die Zellen zwei Mal mit 500 ml eiskaltem Waschpuffer (10 % Glycerin in bidestilliertem H₂O) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 ml Waschpuffer aufgenommen und die optische Dichte bei $\lambda = 550\text{ nm}$ ($OD_{550\text{ nm}}$) bestimmt. Gegebenenfalls wurde die Zellsuspension entsprechend verdünnt, so dass die optische Dichte ($OD_{550\text{ nm}}$) im Bereich von 200-300 lag. Die Zellsuspension wurde in 90 μ l-Portionen aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die Transformationseffizienz lag bei 10^6 - 10^7 Transformanten pro μ g Plasmid-DNA.

3.3.4 Transformation elektrokompetenter *E.coli*-Zellen

Für die Transformation wurden 40 μ l elektrokompetente *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 100-300 ng Plasmid-DNA vorsichtig vermischt und in eisgekühlte Elektropo-

rationsküvetten (BioRad) überführt. Nach der Transformation mit dem Elektroporator (Elektroporator 1.000, Stratagene) wurden die Zellen in sterile Caps gefüllt und mit 0,95 ml LB-Medium vermischt. Nach 30-60 min Inkubationszeit bei 37 °C wurden 100 μ l bzw. 900 μ l auf LB-Platten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert. Für das Ausplattieren der 900 μ l wurden die Zellen 5 min bei 5.000 rpm abzentrifugiert, in einem Tropfen LB-Medium resuspendiert und auf die Platte übertragen. Die ausplattierten Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.5 Überexpression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Testexpression rekombinanter Proteine

Vor der eigentlichen Großexpression wurden Testexpressionen in kleinerem Maßstab durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Parameter wie der Bakterienstamm (Rosetta(DE3)pLysS, BL21(DE3) und Rosetta(DE3)), Induktionszeitpunkt ($OD_{600\text{ nm}} = 0,5-1,2$) und Temperatur (18 °C, 25 °C, 30 °C und 37 °C) verändert. Die 100 ml-Kultur wurde mit der Vorkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zur entsprechenden $OD_{600\text{ nm}}$ im Schüttelinkubator inkubiert. Die Induktion erfolgte mit 1 mM IPTG. Um den Grad der Proteinexpression und die Löslichkeit des Proteins zu testen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten 2 ml-Proben entnommen. Dazu wurden die Proben 5 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert. Die Pellets wurden in Resuspensionspuffer (0,1 M Tris-HCl pH 7,0, 0,3 M NaCl) resuspendiert und auf Eis sonifiziert. Nach erneutem Abzentrifugieren (10 min, 13.200 rpm) wurde zum Überstand und zum Pellet SDS-Probenpuffer gegeben und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

Großexpression rekombinanter Proteine

Für die eigentliche Proteinexpression wurden die Bedingungen der Testexpression auf einen größeren Maßstab übertragen. Nach der Großexpression wurden die Zellen pelletiert (30 min, 4.200 rpm, 4 °C) und in 12,5 ml Resuspensionspuffer pro 1 l-Expression aufgenommen, schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

3.4 Proteinanalytische Methoden

3.4.1 Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Photometrische Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung nach Bradford beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums (von 465 nm auf 595 nm) von Coomassie brilliant blue G-250 bei der Bindung des Farbstoffs an Ammoniumgruppen von Proteinen. Als Bradford-Reagenz

wurde der Protein Assay von Bio-Rad verwendet. Es wurden 200 μl Protein Assay mit 800 μl einer in H_2O verdünnten Proteinlösung gemischt und nach 5 min Inkubation bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ gemessen. Mit Hilfe bekannter Proteinkonzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA) wurde eine Eichgerade erstellt und deren Steigung als Koeffizient für die Umrechnung von Absorption in Proteinkonzentration verwendet.

Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung bei $\text{OD}_{280 \text{ nm}}$

Diese Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Verhalten der Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Cystein UV-Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$ zu absorbieren. Die Proteinkonzentration kann gemäß der Formel $A_{280 \text{ nm}} = \varepsilon \cdot c \cdot d$ (A = Absorption bei $\lambda_{280 \text{ nm}}$, ε = Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$], c = Proteinkonzentration [mg/ml], d = Schichtdicke der Küvette [cm]) berechnet werden. Die Extinktionskoeffizienten wurden mit dem Programm *ProtParam* berechnet (Gasteiger *et al.*, 2005).

humane αI -Tryptase:	$\varepsilon =$	64.400 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
humanes SKI-I:	$\varepsilon =$	42.400 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
humanes Securin:	$\varepsilon =$	8.605 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das diskontinuierliche Lämmli-System verwendet. Das Sammelgel besaß eine Acrylamid-Konzentration von 5%. Je nach Molekulargewicht der Proteinproben wurden für die Trenngele Acrylamid-Konzentrationen zwischen 10% und 15% verwendet. Vor dem Auftragen der Proteinproben wurden diese mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Als Proteinstandard wurde für coomassie- oder silbergefärbte Gele und *western blots* der *high range marker* bzw. *low range marker* von Sigma-Adrich (München) verwendet. Bei *western blots* mit anschließendem Nachweis durch Antikörper wurde der *prestained broad range protein marker* von New England BioLabs (Schwalbach) aufgetragen. Zur besseren Auftrennung wurde die Gelelektrophorese zunächst 10 min bei 25 mA, dann bis zur vollständigen Auftrennung bei 30 mA durchgeführt.

	Trenngel (10 ml)			Sammelgel (5 ml)	
	10 %	12 %	15 %		5 %
H_2O	1,9 ml	1,6 ml	1,1 ml	H_2O	3,4 ml
30 % Acrylamid	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml	30 % Acrylamid	0,83 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,0 M Tris (pH 6,8)	0,63 ml
10 % SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	10 % SDS	0,05 ml
10 % APS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	10 % APS	0,05 ml
TEMED	2 μl	2 μl	2 μl	TEMED	5 μl

4 x SDS-Probenpuffer:		10 x SDS-Laufpuffer:	
50 mM	Tris (pH 7,5)	35 mM	SDS
2 %	SDS	1,92 M	Glycin
20 %	Glycerin	0,25 M	Tris
84 mM	β -Mercaptoethanol		
0,04 %	Bromphenolblau		

Für die Herstellung des nicht-reduzierenden 4 x SDS-Probenpuffers wurde kein β -Mercaptoethanol zugegeben.

3.4.3 Western blot und Proteindetektion durch Antikörperreaktion

Western blot

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung eines Proteingemisches wurden die Proteine durch das Semi Dry Verfahren auf eine Membran übertragen. Für die Sequenzierung wurde eine PVDF-Membran (Immobilon-P^{SQ}, Porengröße 0,2 μ m, Millipore, Eschborn) verwendet, während für die Antikörperreaktion eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-C extra, Porengröße 0,45 μ m, Amersham, Freiburg) eingesetzt wurde. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese für 10 min im Transferpuffer (1 x TGS, 20 % Methanol) inkubiert. Auf der Anodenplatte wurden 6 Lagen Whatman-Filterpapier (3MM, Whatman, Maidstone, England), die Nitrocellulose oder PVDF-Membran, das SDS-Polyacrylamidgel und wieder 6 Lagen Whatman-Filterpapier luftblasenfrei aufeinander geschichtet. Das Filterpapier und die Membran wurden zuvor ebenfalls in Transferpuffer eingeweicht. Bei PVDF-Membranen wurde diese zuvor noch kurz mit Methanol benetzt. Anschließend wurde die *Semi Dry Blot* Apparatur (PeqLab Biotechnologie, Erlangen) mit der Kathodenplatte verschlossen. Der Western Blot wurde 1,5 h bei 10 V durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde der Blot anschließend mit Coomassie-Färbelösung gefärbt und mit der Entfärbelösung entfärbt (siehe Kapitel 3.4.4).

Proteindetektion durch Antikörperreaktion

Für den Nachweis eines His-Tag-Fusionsproteins wurde zunächst das Proteingemisch gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Anschließend erfolgte die Absättigung der Membran (Blocken) durch eine 5 %ige (w/v) Milchpulver-Suspension in TBST für 1 h. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBST-Puffer für jeweils 10 min wurde die Membran für 1 h mit dem primären Antikörper (1:2.800 in TBST verdünnter *mouse IgG2a anti-his antibody*, Amersham Biosciences, Freiburg) inkubiert und danach nochmals dreimalig mit TBST-Puffer für jeweils 10 min gewaschen. Der sekundäre, alkaline Phosphatase gekoppelte anti-mouse IgG (Fab specific) Antikörper (Sigma-Aldrich, München) wurde im Verhältnis 1:5.000 (in TBST-Puffer) eingesetzt und ebenfalls 1 h mit der Membran inkubiert. Nach erneutem dreimaligem

Waschen mit TBST (10 min) erfolgte die Farbreaktion durch Inkubation des Western blots mit dem alkaline Phosphatase Substrat BCIP (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt*) und dem Oxidanz NBT (*nitro blue tetrazolium chloride*), welches die Farbreaktion verstärkt und den Nachweis dadurch sensitiver macht. Das Nachweisreagenz wurde als NBT/BCIP Stocklösung von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen und im Verhältnis 1:20 in Phosphatasepuffer (0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl₂) verdünnt mit der Membran inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem H₂O gestoppt.

10 x TBST

500 mM Tris-HCl pH 7,5
 1,5 M NaCl
 1 % Tween 20

2 x TGS

50 mM Tris
 384 mM Glycin
 0,2 % SDS

3.4.4 Methoden zur Proteinfärbung: Coomassie- und Silberfärbung**Coomassie-Blau-Färbung**

Coomassie Brilliant Blau R-250 ist ein Farbstoff der unspezifisch an fast alle Proteine bindet und 0,1-2,0 µg Protein pro Bande anfärbt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel erst für 1 h in heißer Coomassie-Färbelösung und anschließend mehrmals in heißer Entfärbelösung inkubiert bis die vollständige Entfärbung des Hintergrundes eingetreten war.

Coomassie-Färbelösung

450 ml Ethanol
 100 ml Eisessig
 400 ml H₂O
 2,5 g Coomassie Brilliant Blau R-250
 ad 1 l H₂O

Entfärbelösung

450 ml Ethanol
 100 ml Eisessig
 400 ml H₂O
 ad 1 l H₂O

Für die Färbung von PVDF-Membranen wurde anstelle von Ethanol Methanol als Lösungsmittel verwendet.

Silberfärbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das SDS-Gel zunächst 30 min in der Fixierlösung inkubiert. Nachdem die Proteine 30 min in der Inkubationslösung oxidiert wurden und das Gel drei Mal für je 10 min in destilliertem H₂O gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation des Gels in der Silberlösung für ebenfalls 30 min. Währenddessen binden Silberionen an Sulfhydryl- und Carboxylgruppen der Aminosäureseitenketten und ermöglichen die Anfärbung der Proteinbanden durch die

Reduktion der Silberionen in der Entwicklungslösung. Die Reaktion wurde durch Ersetzen der Entwicklungslösung mit Stopplösung beendet und das Gel wie im nächsten Abschnitt beschrieben, getrocknet.

Fixierlösung (100 ml)

40 ml Ethanol
10 ml Eisessig
50 ml H₂O

Inkubationslösung (100 ml)

30 ml Ethanol
6,8 g Natriumacetat Trihydrat
0,2 g Natriumthiosulfat Pentahydrat
70 ml H₂O

Silberlösung (50 ml)

50 mg Silbernitrat
50 ml H₂O
30 μ l Formaldehyd

Entwicklungslösung (100 ml)

2,6 g Natriumcarbonat
100 ml H₂O
30 μ l Formaldehyd

Die Formaldehydlösung wurde erst kurz vor Verwendung des Puffers frisch zugegeben.

Stopplösung (100 ml)

1,46 g EDTA Dihydrat
100 ml H₂O

3.4.5 Trocknen der SDS-Polyacrylamidgele

Zur Aufbewahrung wurde das Proteingel 10 min in einer Lösung aus 70 % Ethanol und 3 % Glycerin geschwenkt. Zwei Cellophan-Folien (30 cm x 30 cm, Techne, Jahnsdorf) wurden kurz in destilliertem H₂O eingeweicht. Das Proteingel wurde luftblasenfrei zwischen zwei Cellophan-Folien in die Plexiglas-Vorrichtung zum Trocknen der Gele eingespannt und bis zum vollständigen Trocknen des Gels bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.4.6 Analytische Gelfiltration

Analytische Gelfiltrationen wurden am SMART-System (Amersham Pharmacia) unter Verwendung der Gelfiltrationssäulen Superdex 75 PC3.2, Superdex 200 PC3.2 und Superose 6 PC3.2 (Amersham Pharmacia) durchgeführt. Vor dem Auftrag wurden die Proben durch kurze Zentrifugation (5.000 rpm, 1 min) filtriert (Millex-Filter, 0,22 μ m Porendurchmesser). Je nach Protein wurden NaCl-haltige Puffer verwendet, wobei zur Verhinderung unspezifischer Säuleninteraktionen eine Salzkonzentration von 150 mM nie unterschritten wurde. Der Gelfiltrationslauf wurde bei einer Flußrate von 80 μ l/min durchgeführt. Für eine grobe Abschätzung des Molekulargewichtes wurde der BioRad

Protein Standard, wie in der Packungsanleitung angegeben, verwendet. Die gesammelten 50 μ l-Fractionen wurden durch SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Silber- oder Coomassiefärbung analysiert.

3.4.7 Konzentration und Dialyse von Proteinlösungen

Für die Konzentration von Proteinlösungen wurden, je nach Protein und Menge, verschiedene Konzentratoren, mit auf Cellulose basierte Membranen, der Firma Millipore, Schwalbach (Centricon, Centriprep, Amicon Ultra und Amicon Ultrafree-MC) sowie Konzentratoren mit einer Polyethersulfon Membran der Firma Vivascience, Hannover (Vivaspin 500) verwendet.

Die Dialyse von Proteinlösungen wurde während eines Zeitraums von über 18 h bei 4 °C durchgeführt. Die Dialysemembran Spectra/Por (Spectrumlabs, Breda, Niederlande) wurde zunächst in 5 mM EDTA und anschließend zwei mal in destilliertem H₂O aufgeköcht. Es wurde zweimal gegen ein mindestens 400-faches Volumen dialysiert.

3.4.8 Weitere analytische Methoden

Die N-terminale Sequenzierung wurde von Reinhardt Mentele und Dr. Karlheinz Mann am Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführt. Dazu wurde das Protein nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine PVDF-Membran übertragen und mittels Coomassiefärbung angefärbt.

Die LC-ESI Massenspektrometrie erfolgte durch den Massenspektrometrie-Service des Max-Planck-Instituts für Biochemie von Frau Elisabeth Weyher-Stingl.

Die Aufnahme des eindimensionalen ¹H-NMR Spektrums des humanen Securins erfolgte durch Loyola d’Silva aus der Gruppe NMR-Spektroskopie von Dr. Tad Holak, Max-Planck-Institut für Biochemie.

3.5 Rückfaltung unlöslicher Proteine

Die Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli* kann unter Umständen zur Bildung bakterieller Einschlusskörper (*inclusion bodies*) führen. *Inclusion bodies* sind dichte Aggregate von ungefalteten oder falsch gefalteten Polypeptidketten, welche meist intrazellulär im Cytoplasma oder bei sekretierten Proteinen im Periplasma vorkommen. Die Aggregation entsteht möglicherweise aufgrund einer begrenzten Anzahl von Chaperonen während der Überexpression rekombinanter Proteine oder der Tendenz zur Aggregation des Proteins. Hydrophobe Oberflächen von teilweise gefalteten Proteinen können so zur intermolekularen Aggregation führen. Bei der Bildung der *inclusion bodies* handelt es sich um ein dynamisches Gleichgewicht aus Hinzufügen und Entfernen von partiell gefalteten Proteinen aus dem Aggregat (Carrio und Villaverde, 2002). Die Rückfaltung unlöslicher Protein beinhaltet demnach die Isolation der reinen *inclusion bodies* aus den

Bakterienzellen, deren vollständige Denaturierung durch Harnstoff oder Guanidinium-Hydrochlorid und letztendlich die Rückfaltung durch Dialyse, *rapid dilution* oder Rückfaltung auf der Affinitätssäule.

3.5.1 Aufreinigung aus *inclusion bodies*

Nach der Anzucht von zwölf 1l-Kulturen, wurden die *E. coli*-Zellen durch Zentrifugation (4.200 rpm, 20 min, 4 °C) pelletiert und das überstehende LB-Medium verworfen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, so dass ein Zellpellet einer 2l-Expression entspricht. Jedes dieser Pellets wurde in 10 ml Puffer P1 aufgenommen und bei -20 °C weggefroren.

Für die Aufreinigung der *inclusion bodies* wurden 0,5 Volumen Puffer P2 und eine Spatelspitze Lysozym auf die aufgetauten *E. coli*-Zellen gegeben, vorsichtig eingerührt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein gekühltes Rossetengefäß gefüllt und drei Mal für je vier Minuten im Wasser/Eis-Bad sonifiziert (Makrotip, *output control*: 10, *puls*: 70 %), wobei darauf geachtet wurde, dass die Zellsuspension stets gekühlt war. Sobald die Suspension eine flüssige Konsistenz aufwies, wurden die unlöslichen Zellfragmente abzentrifugiert (20.000 rpm, 20 min, 4 °C). Da die *inclusion bodies* durch Zellfragmente, -organellen und nicht-aufgeschlossene Zellen noch stark verunreinigt waren, wurde das Pellet drei Mal mit Puffer P2 gewaschen. Dazu wurde das Pellet mit einem Dounce Homogenisator oder Ultraturrax (IKA-Werke, Staufen) im Puffer resuspendiert und anschließend abzentrifugiert (20.000 rpm, 20 min, 4 °C). Dieser Waschschrift wurde noch drei Mal mit Puffer P3 und zur Entfernung der Detergentien nochmals zwei Mal mit Puffer P4 wiederholt. Das Pellet wurde abgewogen und unter der Annahme, dass ein Viertel des Gewichts Protein ist, wurde die Proteinkonzentration durch Zugabe von Puffer P4 auf 50 mg/ml eingestellt und durch den Dounce Homogenisator oder Ultraturrax (IKA-Werke, Staufen) resuspendiert. 25 mg-Aliquots wurden auf Eppendorf-Caps verteilt und diese abzentrifugiert (13.200 rpm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets bei -20 °C aufbewahrt.

Puffer P1

0,1 M Tris-HCl pH 7,0
0,15 M NaCl
1 mM EDTA

Puffer P2

0,1 M Tris-HCl pH 7,5
6 % Triton-X-100
1 mM EDTA

Puffer P3

0,1 M Tris-HCl pH 7,5
1 % LDAO
1 mM EDTA

Puffer P4

0,1 M Tris-HCl pH 7,0
1 mM EDTA

3.5.2 Rückfaltung durch *rapid dilution*

Die Rückfaltung durch *rapid dilution* basiert auf der Annahme, dass durch hohe Verdünnung des Proteins die Tendenz zur Aggregation reduziert wird. Die Rückfaltung wird ausgelöst durch die gleichzeitige Reduktion der Denaturant-Konzentration und durch die Änderung des Redox-Potentials (bei Proteinen mit Disulfidbrücken), welche die Ausbildung von Disulfidbrücken erlaubt. In der Praxis geschieht dies durch Eintropfen einer geringen Menge hochkonzentrierter Proteinlösung (2-10 mg/ml) in ein großes Volumen einer Rückfaltungsbedingung, welche zur besseren Verteilung des Proteins während des Eintropfens stark gerührt wird.

Die Rückfaltungsbedingung besteht aus einer Puffersubstanz, stabilisierend wirkenden Additiven (Arginine, Harnstoff, PEG oder Glycerin) und Salz. Bei extrazellulären Proteinen wird üblicherweise bei einem pH 8-9 gearbeitet und reduziertes GSH als Redox-System verwendet. Luftsauerstoff bewirkt die langsame Oxidation des GSH zu GSSG und erlaubt so die Ausbildung der Disulfidbrücken. Der Fortschritt der Oxidation kann durch den Ellmans Test beobachtet werden.

Solubilisierung der *inclusion bodies*

Für die Solubilisierung der *inclusion bodies* wurde zunächst 25 mg unlösliches Protein in 1 ml 6 M Guanidinium-Hydrochlorid, 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M DTT gelöst, unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (13.200 rpm, 10 min, 4 °C) entfernt und anschließend über Nacht zwei Mal gegen jeweils 1 l 4 M Guanidinium-Hydrochlorid im Dialyseschlauch (12-14 kDa Ausschlussgröße; Spectra/Por, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, USA) dialysiert.

Rapid dilution

Um eine geeignete Rückfaltungsbedingung zu finden, wurden verschiedene Bedingungen zunächst im kleinen Maßstab getestet. Dafür wurden je 2 ml der verschiedenen Rückfaltungspuffer 30 min bei 4 °C äquilibriert. Unter starkem Rühren wurde die entsprechende Menge des löslichen, ungefalteten Proteins langsam in den Rückfaltungspuffer getropft. Die Proteinkonzentration im Rückfaltungsansatz betrug zwischen 0,1-0,5 mg/ml. Anschließend wurden die Rückfaltungsansätze über Nacht und unter langsamem Rühren bei 4 °C inkubiert. Bei Proteinen, welche im nativen Zustand Disulfidbrücken aufweisen, wurden die Ansätze so lange langsam gerührt und bei 4 °C inkubiert, bis die Konzentration an freien Thiolgruppen unter 1 mM betrug.

Ellmans Test

Der Oxidationsgrad freier Thiol-Gruppen lässt sich mit Hilfe des Ellmans Test (Ellman, 1959) nachweisen. DTNB reagiert mit freien SH-Gruppen unter Spaltung der eigenen

Disulfidbrücke zu dem Chromophor TNB (2-Nitro-5-Thiobenzoessäure, Absorptionskoeffizient $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Absorptionsmaximum $\lambda = 412 \text{ nm}$).

Zu $438 \mu\text{l}$ H_2O und $25 \mu\text{l}$ 1 M Tris-HCl pH 8,0 wurden $2 \mu\text{l}$ Ellmans Reagenz (100 mM DTNB in Ethanol) und $5 \mu\text{l}$ Rückfaltungsansatz gegeben. Aufgrund der Luftoxidation wurde die Probe unverzüglich bei $\text{OD}_{412 \text{ nm}}$ gemessen und die millimolare Menge an freien Thiolgruppen nach der Formel $(\text{OD}_{412 \text{ nm}} \cdot 100)/13,6$ berechnet.

Dialyse und analytische Gelfiltration

Nach der Rückfaltung wurde der Rückfaltungsansatz abzentrifugiert (13.200 rpm , 20 min , 4°C). Zur Analyse wurden jeweils die gleiche Menge an Überstand ($24 \mu\text{l}$) und $6 \mu\text{l}$ Pellet (in $500 \mu\text{l}$ $4 \times$ SDS-Probenpuffer resuspendiert) in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Rückfaltungsansätze, bei denen noch lösliches Protein im Überstand vorhanden war, wurde anschließend bei 4°C gegen ein mindestens 1.000 -faches Volumen verschiedener Arginin-freier Puffer dialysiert. Dabei wurden pH, Salzkonzentration und das Salz selbst variiert. In Anschluss an die Dialyse wurden die Proben wiederum abzentrifugiert (13.200 rpm , 20 min , 4°C) und durch gelelektrophoretische Auftrennung des Überstandes und des Pellets analysiert.

Die Proben, die nach der Dialyse noch lösliches Protein aufwiesen, wurden im Centricon (Millipore) einkonzentriert und nach der Filtration (Millexfilter mit $0,22 \mu\text{m}$ Porendurchmesser, Millipore) durch Gelfiltration (SMART-System, Amersham Pharmacia) auf Aggregation untersucht.

3.6 Native Aufreinigung von Proteinen

3.6.1 Aufschluss der *E. coli*-Zellen

Die gefrorenen *E. coli* -Zellen wurden mit der zweifachen Menge an Auftragspuffer (50 mM Tris pH 8,0, $0,3 \text{ M}$ NaCl, 5 mM Imidazol) und einem Spatel Lysozym versetzt und im lauwarmen Wasserbad langsam aufgetaut. Zur Vermeidung proteolytischer Degradation wurden nach Herstellerangaben *Complete-Mini Inhibitor Cocktail Tablets - EDTA-free* (Roche Diagnostics, Mannheim) zuvor im Auftragspuffer gelöst. Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese in ein Rosettengefäß überführt und fünf Mal für je zwei Minuten im Wasser/Eis-Bad sonifiziert (*Macrotip, output control: 8, puls: 60%*). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (20.000 rpm , 60 min , 4°C) abgetrennt.

3.6.2 Aufreinigung auf der NiNTA-Säule

Humanes Securin wurde mittels Affinitätschromatografie auf der NiNTA-Säule (10 ml Ni-NTA *superflow* (Qiagen, Hilden)) aufgereinigt. Dazu wurde das abzentrifugierte Lyosat zunächst filtriert (Millex-GV, $0,22 \mu\text{m}$ Porendurchmesser, Millipore) und die Säule

(XK16/20, Amersham Pharmacia) mit Auftragspuffer (50 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol) äquilibriert. Das filtrierte Lysat wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Amersham Pharmacia, Freiburg) bei geringer Flussrate auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde so lange mit Auftragspuffer gewaschen, bis die Absorption bei OD_{280 nm} einen konstanten Wert annahm. Aufgrund der hohen Überexpression des humanen Securins und der guten Bindung an die Säule war ein einziger Waschschrift bei 10 % Elutionspuffer (50 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) ausreichend, gefolgt von der Elution des Proteins bei 100 % Elutionspuffer. Zur Analyse der einzelnen Aufreinigungsschritte wurden jeweils 100 μ l-Proben entnommen und mit gleicher Menge nicht-reduzierendem bzw. reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Das Protein wurde bis zur Gelfiltration bei 4 °C aufbewahrt.

3.6.3 Aufreinigung durch Gelfiltration

Um letzte Verunreinigungen zu entfernen wurde als letzter Reinigungsschritt eine Gelfiltration durchgeführt. Vor der präparativen Gelfiltration wurde mit Hilfe des SMART-Systems (Amersham Pharmacia, Freiburg) eine Analyse in kleinem Maßstab durchgeführt. Für die analytische (PC3.2/30-Säulen, Amersham Pharmacia) sowie die präparative (XK16/60, XK26/60; Amersham Pharmacia) Gelfiltration wurde jeweils Superdex 75 und Superdex 200 als Säulenmaterial verwendet. Die Gelfiltrationen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und im Fall des humanen Securins wurde ein Tris-NaCl-Puffer (10 mM Tris pH 8,0, 0,25 M NaCl) gewählt.

3.7 Proteinkristallographie

3.7.1 Kristallisation

Die Kristallisationsversuche wurde nach der Dampfdiffusionsmethode im *sitting-drop*-Verfahren durchgeführt. Als Kristallisationsplatten wurden 24-well Chrychem-Platten (Charles Copper Company, Natick, USA) oder 96-well Greiner-Platten (Greiner Bio-One, Essen) verwendet und mit durchsichtiger CrystalClear-Folie (Hampton Research, Laguna Hills, USA) abgeklebt. Für das Auffinden der initialen Kristallisationsbedingung wurden verschiedene, auf *sparse matrix screening* (Jancarik *et al.*, 1991) basierende kommerzielle Screens sowie ein hauseigener Screen verwendet. Die Kristalle wurden durch Verfeinerung der initialen Bedingung optimiert, dabei wurden zusätzlich Additive und das Verfahren des *microseedings* eingesetzt. Durch Verwendung eines Schnurrbarthaars (Nando, Gambach) wurden beim *microseeding* Mikrokristalle in neue Kristallansätze überführt mit dem Ziel, an den zugefügten Kristallisationskeimen das Kristallwachstum anzuregen.

Die Kristallisationsbedingungen der verschiedenen Tryptasen sind in der Tabelle 3.2 aufgelistet. Bei der Kristallisation der α I-Tryptase betrug das Volumen der Reservoirolösun-

gen 400 μl und das Tropfenverhältnis 1,5 μl Proteinlösung (10 mM Mops pH 6,8, 0,7 M NaCl) zu 1,5 μl Reservoirlösung. Die Kristalle wuchsen innerhalb von 1-2 Tagen. Die leupeptinfreie Mutante rHT α G steht nicht unter dem stabilisierenden Effekt des Inhibitors und kann bei einer Salzkonzentration von 0,7 M NaCl zu Monomeren zerfallen. Aus diesem Grund wurde rHT α G bis zur Kristallisation in 10 mM Mops pH 6,8, 2 M NaCl aufbewahrt. Bei dieser Salzkonzentration führte die Kristallisation zu nahezu perfekt merohedral verzwilligten Kristallen. Wurde jedoch kurz vor der Kristallisation die NaCl-Konzentration von 2,0 M auf 0,7 M reduziert, entstanden nach einem Tag nicht-verzwilligte Kristalle, welche das Tryptase-Tetramer enthielten.

Protein	Konzentration	Kristallisationsbedingung
rHT α G	7,4 mg/ml	27,5 % PEG1500
rHT α G ^I	12 mg/ml	28,0 % PEG1500
rHT α QG ^I	12 mg/ml	28,0 % PEG1500

Tabelle 3.2: Kristallisationsbedingungen der verschiedenen Tryptasespezies

3.7.2 Datensammlung und Datenreduktion

Um die Qualität der Kristalle zu testen, wurden zunächst röntgenkristallographische Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurde jeweils eine geringe Menge Kristallisationslösung und - mit ca. 1 cm Abstand - ein Kristall mit dem ihn umgebenden Kristallisationspuffer in eine Kapillare (0,5 bzw. 0,7 mm Durchmesser, Müller, Schönwalde) gesogen. Der Puffer, der den Kristall umgab, wurde mit noch dünneren Kapillaren vorsichtig entfernt. Nachdem die Kapillare mit Wachs verschlossen und auf dem Goniometerkopf platziert wurde, konnten initiale Bilder des Kristalls bei Raumtemperatur aufgenommen werden.

Für komplette Datensätze wurden die Messungen unter Kryobedingungen bei 100 K durchgeführt. Um die Ausbildung von Eiskristallen zu verhindern, wurden verschiedene Kryoprotektantien sowie nur die Reservoirlösung getestet (Rodgers, 1994). Es zeigte sich, dass die langsame Zugabe von 7-15 % D(-)-2,3-Butandiol für die Tryptase-Kristalle am besten geeignet war. Kristalle der α I-Tryptase wurden nach Zugabe des Kryoprotektanz mit Hilfe eines Kryoloops aus der Kristallisationsschale gefischt und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Humane α I-Tryptase-Mutanten D216G und K192Q/D216G

Die Datensätze von rHT α G und rHT α G^I wurden abteilungsintern mit Hilfe des CuK α -Drehanodengenerators RU200 ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$; Rigaku, Tokio, Japan) mit Graphit-Monochromator und *image-plate* Detektor (MAR Research, Hamburg) aufgenommen. Der

hochaufgelöste Datensatz der Doppelmutante rHT α QG^I wurde an der *wiggler beamline* BW6 der Max-Planck-Gesellschaft ($\lambda = 1,05 \text{ \AA}$; HASYLAB, Deutsches Elektronensynchrotron, Hamburg) mit Hilfe eines CCD-Detektors (MAR Research, Hamburg) aufgenommen. Bei abteilungsinternen Messungen wurde für die Ermittlung des optimalen Messbereichs und Drehwinkels MOSFLM (Leslie *et al.*, 1986) verwendet, bei Messungen an der Beamline BW6 dagegen das Programm BEST (Popov und Bourenkov, 2003). Während der Aufnahme eines Diffraktionsbildes wurde im Fall der Doppelmutante rHT α QG^I der Kristall um $0,2^\circ$ gedreht. Der Abstand zwischen Kristall und Detektor betrug 100 mm. Bei der Datensammlung der leupeptininhibierten Einzelmutanten rHT α G^I wurde der Kristall um $0,4^\circ$ gedreht und 18 min belichtet. Der Abstand zum Detektor betrug hierbei 185 mm. Der Drehwinkel der leupeptinfreien Einzelmutante rHT α G betrug $0,5^\circ$ und der Plattenabstand 155 mm. Es wurde über einen Zeitraum von 20 min belichtet. Für die Indizierung und Skalierung der Datensätze wurden DENZO, SCALEPACK und TRUNCATE (Ottwinowski und Minor, 1997; French und Wilson, 1978) verwendet.

3.7.3 Grundlagen der Strukturlösung

Beugung am Kristall

Röntgenstrahlen sind aufgrund ihrer Wellenlänge für die strukturelle Aufklärung biologischer Makromoleküle auf atomarer Ebene besonders geeignet. Die Wellenlänge dieser elektromagnetischen Strahlung liegt in der Größenordnung der Atomabstände biologischer Makromoleküle und ist ausreichend, um in diese Materie bis zu 1 mm tief einzudringen. Gleichzeitig werden Röntgenstrahlen jedoch an den Elektronen unter Emission eines Photons gestreut (kohärente Streuung). Das eigentliche Diffraktionsbild entsteht durch konstruktive Interferenz der emittierten Strahlung am Kristallgitter und kann mit Hilfe der Braggschen Gleichung $n\lambda = 2d\sin(\Theta)$ und der Ewald Konstruktion beschrieben werden. Ein Reflex entsteht nur dann, wenn die Braggsche Gleichung erfüllt ist, das heißt wenn eine Schar paralleler Gitterebenen genau so orientiert ist, dass der Röntgenstrahl unter dem sogenannten Braggwinkel einfällt. Die Ewald Konstruktion veranschaulicht den reziproken Zusammenhang von Kristallgitter und Diffraktionsbild unter Einbeziehung eines imaginären reziproken Gitters. Jeder Gitterpunkt des reziproken Gitters steht dabei für einen Reflex, welcher durch die Indizes h, k und l beschrieben wird. Die gemessene Intensität eines Reflexes $I(hkl)$ ist proportional zum Quadrat der Amplitude des Strukturfaktors $\mathbf{F}(hkl)$.

$$I(hkl) \propto |F(hkl)|^2$$

Der Strukturfaktor $\mathbf{F}(hkl)$ ist abhängig von der Lage der Atome in der Einheitszelle und beschreibt die Summe aller atomaren Streubeiträge in Richtung hkl unter Berücksichtigung der relativen Phasenverschiebung. Der Temperaturfaktor (B-Faktor) berücksichtigt

die Schwingung der Atome um eine Gleichgewichtsposition und geht in den atomaren Strukturfaktor mit ein. Die Röntgenstrahlen treffen in den Einheitszellen eines Kristalls nicht auf identische Atome an exakt der gleichen Position, wodurch sich vor allem bei hohen Streuwinkeln die Intensität des gestreuten Röntgenstrahls verringert. Aus diesem Grund muss der atomare Formfaktor mit einem temperaturabhängigen Faktor multipliziert werden.

Berechnung der Elektronendichte

Der Strukturfaktor $\mathbf{F}(hkl)$ kann durch die Fourier-Transformation der Elektronendichte $\rho(hkl)$ beschrieben werden. Durch Umkehrung der Fourier Transformation kann aus den Strukturfaktoren die Elektronendichte für jede Position x,y,z in der Einheitszelle berechnet werden.

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

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

Strukturfaktoren setzen sich aufgrund der Welleneigenschaft der emittierten Photonen aus Amplitude und Phase zusammen, also $\mathbf{F}(hkl) = |F(hkl)| \exp[i\alpha]$. Der Betrag der Strukturfaktoren $|F(hkl)|$ kann experimentell über die Intensität bestimmt werden, die Phaseninformation ist jedoch experimentell nicht unmittelbar messbar. Bei bekannten Phasenwinkeln errechnet sich die Elektronendichte aus

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

Lösung des Phasenproblems

Bei der Berechnung der Elektronendichte von Kleinmolekülen können Phasen durch **Direkte Methoden** ermittelt werden, die auf der Ausnutzung von Zusammenhängen zwischen den Intensitäten innerhalb von Reflexgruppen und den Phasen beruhen.

Aufgrund der höheren Komplexität werden in der Proteinkristallographie andere Methoden den direkten Methoden vorgezogen. Bei der **Methode des Isomorphen Ersatzes** (*multiple isomorphous replacement*; MIR) werden die Phasen mit Hilfe eines Schwermatomderivats ermittelt, welches im Vergleich zum nativen Kristall - mit Ausnahme der

Schweratome - nur geringfügige Änderungen in der Zelle bzw. den Atompositionen aufweist. Die Positionen der Schweratome werden mittels Differenzpatterson-Funktionen mit dem Koeffizienten $(|F_{PH}| - |F_P|)^2$ bestimmt und ermöglichen dadurch die Phasenberechnung. Aus diesen und den Differenzen in den Reflexintensitäten der verschiedenen Datensätze lassen sich die Phasen des unsubstituierten Proteinkristalls ermitteln.

Ebenso können Phasen durch die Methode der **Multiplen Anomalen Dispersion** (*multiple anomalous dispersion*; MAD) bestimmt werden. Diese Methode benötigt kein isomorphes Schweratomderivat, sondern erfordert ein anomal streuendes Atom sowie die Messung bei verschiedenen Wellenlängen. Anomale Streuung tritt nach der Anregung von Elektronen mit einer Wellenlänge auf, welche etwas größer als die Eigenfrequenz der Elektronen ist. In diesem Fall können die Phasenwinkel basierend auf Intensitätsunterschiede zwischen den Bijvoet-Paaren ($|F_{hkl(+)}|^2$ und $|F_{hkl(-)}|^2$) ermittelt werden.

Die Methode des **Molekularen Ersatzes** (Pattersonsuchmethoden, *molecular replacement*) nutzt für die Positionierung der Struktur in der asymmetrischen Einheit bekannte Phaseninformation bereits gelöster Strukturen (siehe 3.7.4).

3.7.4 Phasierung durch Pattersonsuchmethoden

Das Phasenproblem konnte bei den Tryptasemutanten mit Hilfe der Pattersonsuchmethoden (molekularer Ersatz) gelöst werden. Diese Methode wird verwendet, wenn bereits die Struktur eines homologen Proteins mit einer Sequenzidentität von mindestens 30 % vorhanden ist, wobei die Faltung und weniger die Sequenzidentität eine Rolle spielt. Beim molekularen Ersatz wird eine „fremde“ Struktur (Suchmodell) geborgt, um die Position der Struktur in der asymmetrischen Einheit zu finden. Die korrekte Platzierung des Suchmodells ermöglicht die Bestimmung der Phasenwinkel und die Berechnung der Elektronendichte. Für die korrekte Platzierung sind sechs Parameter ($\varphi, \theta, \psi, x, y, z$) erforderlich, die durch Rotations- und Translationssuche gefunden werden. Dies erfolgt im Pattersonraum mit Hilfe der Patterson-Synthese, da dort ohne jegliche Phaseninformation und durch Trennung von Rotation und Translation das Suchmodell positioniert werden kann. Die Entkoppelung von Rotation und Translation reduziert die Anzahl der möglichen Positionen und ermöglicht so die Suche. Die Patterson-Synthese entspricht einer Fourier-Synthese, bei der keine Phaseninformation, sondern stattdessen die quadrierten Strukturfaktoren verwendet werden.

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

$$P(\mathbf{u}) = \int_{\mathbf{r}} \rho(\mathbf{r}) \times \rho(\mathbf{r} + \mathbf{u}) dv$$

Die Maxima der Patterson-Synthese spiegeln die Endpunkte von Abstandsvektoren wider. Die Intensität eines Patterson-Maximums wird aus dem Produkt der Elektronenzahlen der beteiligten Atome berechnet. Man kann diese Abstandsvektoren nach intermolekularen Vektoren (*cross vector*) und intramolekularen Vektoren (*self vector*) unterscheiden.

Die **Rotationsuche** erfolgt mit Hilfe der intramolekularen Vektoren. Die Patterson-Maps des Suchmodells und der gesuchten Struktur werden überlagert. Maximale Korrelationswerte weisen auf eine optimale Überlagerung und die korrekte Orientierung des Moleküls hin. Die Überlagerungsfunktion R wird wie folgt berechnet:

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

$P(\mathbf{u})$ und $P(\mathbf{u}_r)$ stehen für die Pattersonfunktion des Suchmodells und des rotierten Modells. U entspricht dem Volumen, indem die intramolekularen Vektoren betrachtet werden.

Bei der **Translationssuche** wird das rotierte Suchmodell in der Einheitszelle positioniert. Die drei dafür notwendigen Parameter (x, y, z) werden ermittelt, indem die berechneten Strukturfaktoren F_{calc} mit den beobachteten Strukturfaktoren F_{obs} verglichen werden. Als Maß für die Überlagerung kann der R-Faktor oder der Korrelationsfaktor (C) verwendet werden.

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

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

Eine gezieltere Möglichkeit ergibt sich durch den Vergleich der interatomaren Vektoren (*cross vectors*) der Patterson-Synthese. Unter Zuhilfenahme der Symmetrioperation der jeweiligen Raumgruppe erhält man die Abstandsvektoren zwischen den Symmetrieverwandten. Maximale Überlagerung ergibt sich, wenn der intermolekulare Vektor \mathbf{t} des Suchmodells dem beobachteten intermolekularen Vektor \mathbf{t}_0 entspricht. Die dazugehörige Translationsfunktion T lautet:

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

$P(\mathbf{u})$ und $P_{1,2}(\mathbf{u}, \mathbf{t})$ entsprechen der Pattersonfunktion des beobachteten Modells und des Suchmodells. Mit der Bestimmung der sechs Parameter kann das Suchmodell in der asymmetrischen Einheit platziert und durch Verfeinerungs- und Modellbauzyklen der realen Struktur angepasst werden.

3.7.5 Modellbau und Verfeinerung

Im Anschluss an die Pattersonsuchmethoden wurden im neu-orientierten Modell die nicht-konservierten Aminosäuren bzw. die eingefügten mutierten Reste ausgetauscht. Nach einem *rigid-body-refinement*, bei dem die vier einzelnen Monomere des Tetramers als rigide Körper betrachte wurden, erfolgten mehrere Verfeinerungszyklen mit dem Programm CNS unter Berücksichtigung der Parameter von Engh und Huber (1991). R-Faktor und R_{Free} -Faktor wurden verwendet, um einen Hinweis zu erhalten, wie gut das Modell der Wirklichkeit entspricht. Für die Berechnung des R_{Free} -Faktors wurden 5% der Reflexe markiert, die von der Verfeinerung ausgenommen wurden.

Zu Beginn wurden die Modelle durch *simulated annealing* und Geometrieverfeinerung verbessert. *Simulated annealing* wurde jedoch bei späteren Verfeinerungsrunden nicht mehr verwendet, da es zu keiner Verbesserung des Modells führte. Ab einem R-Faktor von ca. 25% erfolgte neben der Geometrieverfeinerung noch zusätzlich die isotrope Verfeinerung der zuvor fixierten B-Faktoren. Topologie- und Parameterinformationen für die Moleküle D(-)-2,3-Butandiol und Leupeptin wurden mit Hilfe von SYBYL (*molecular modelling package*, Tripos Associates, St. Louis) und XPLO2D (Kleywegt und Jones, 1997) erstellt und in die Verfeinerung miteinbezogen. Im Verlauf der letzten Verfeinerungszyklen wurden den Modellen alternative Konformationen und Wassermoleküle hinzugefügt. Mit der Verbesserung des Modells wurde zusätzliche Elektronendichte bei den Monomeren B und D an den Aminosäuren Asn113 und Asn204 sichtbar, die den ersten Zuckermolekülen der N-Glykosylierung entspricht. Diese Glykosylierungen wurden dem Modell hinzugefügt und ebenfalls in die Verfeinerung miteinbezogen.

In die Verfeinerung des Strukturmodells von rHT α G wurde für die multiple Konformation des 214-220-Segments ein einmaliges *occupancy-refinement* durchgeführt. Die *occupancy* beschreibt, zu welchem prozentualen Anteil eine Konformation mit den jeweiligen Atomen besetzt ist. Der B-Faktor, welcher die Flexibilität eines Atoms repräsentiert, und die *occupancy* sind miteinander gekoppelt, weshalb in der Regel nur der B-Faktor und nicht die *occupancy* verfeinert wird. Für Verfeinerung der *occupancy* bei rHT α G mussten zunächst, die aufgrund der nicht berücksichtigten, multiplen Konformation falsch verfeinerten B-Faktoren an korrekte Werte angepasst werden. Korrekte B-Faktoren konnten aus der verfeinerten Struktur von rHT α G^I, bei der das 214-220-Segment aufgrund der Leupeptinbindung zu 100% in der offenen Konformation vorliegt, übernommen werden. Der Bau der Strukturmodelle erfolgte mit dem Programm MAIN (Turk, 1992). $2F_{obs} - F_{calc}$ - und $F_{obs} - F_{calc}$ -Elektronendichtekarten wurden mit den Programmen MAIN und CNS berechnet. Bei Bereichen schlecht definierter Elektronendichte wurden zusätzlich mit Hilfe von CNS $2F_{obs} - F_{calc}$ -*composite omit maps* verwendet.

Die Verfeinerung des Modells erfolgte unter Berücksichtigung der nicht-kristallographi-

schen 222-Symmetrie (NCS) des Tryptase-Tetramers. In den ersten Verfeinerungsrunden wurden strenge *ncs-restraints* verwendet, die im Verlauf der Verfeinerungszyklen immer weiter reduziert wurden.

3.7.6 Strukturanalyse und graphische Darstellung

Die Strukturen wurden mit den Programmen Validation, SFCheck (Vaguine *et al.*, 1999) und Procheck (Laskowski *et al.*, 1993) analysiert. Für Überlagerungen mit anderen Strukturen wurden die Programme MAIN (Turk, 1992) und LSQMAN (Kleywegt und Jones, 1994) verwendet. Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) erstellt und mittels Alscript (Barton, 1993) graphisch dargestellt. Die Flächen der Monomerinteraktionsbereiche wurden mit Hilfe des *Protein-Protein Interaction Servers* (Jones und Thornton, 1996) berechnet. Strukturabbildungen wurden mit den Programmen MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), BOBSCRIPT (Esnouf, 1999), Raster3d (Merritt und Murphy, 1994), GRASP (Nicholls *et al.*, 1991) und PYMOL (DeLano, 2002) erstellt.

Kapitel 4

Ergebnisse - Humane α I-Tryptase-Mutanten

4.1 Biochemische Arbeiten

Die Klonierung, Expression und Aufreinigung der α I-Tryptase-Mutanten D216G und K192Q/D216G wurden von Trevor Selwood (Department of Dermatology, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) durchgeführt und das Protein für die Kristallisation freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Konzentrationsbestimmung der Tryptasen

Die Proteinkonzentration der α I-Tryptase-Mutanten wurde durch Absorptionsmessung bei $A_{280\text{ nm}}$ ermittelt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von $64.900\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ berechnet und betrug bei der Kristallisation der leupeptin-gebundenen Mutanten 12 mg/ml, bzw. 7,4 mg/ml bei der aktiven α I-Tryptase Mutante D216G.

Molekulargewichtsbestimmung und Gelfiltration

Die Sauberkeit der Präparation wurde durch SDS-PAGE und Gelfiltration verifiziert (siehe Abbildung 4.1). In der denaturierenden, Coomassie-gefärbten SDS-PAGE sind zwei Proteinbanden zu erkennen, welche durch Variation in der Glykosylierung erklärt werden können. Die Tryptase-Mutanten laufen auf einer Höhe von 28-32 kDa. Eine genaue Größenbestimmung wurde durch massenspektrometrische Analyse in Zusammenarbeit mit Frau Elisabeth Weyher-Stingl durchgeführt. Es wurden bis zu elf unterschiedliche Tryptase-Monomere gefunden, die glykosylierungsbedingt ein Molekulargewicht zwischen 30,0 und 32,5 kDa besaßen.

Die analytische Gelfiltration mit Hilfe des SMART-Systems und einer Superdex 200 PC3.2 Gelfiltrationssäule ergab einen homogenen Peak. Das Molekulargewicht der Tryptasen liegt auf der durch verschiedene Standardproteine geeichten Säule bei ungefähr

110 kDa. Dies entspricht dem drei- bis vierfachen Molekulargewicht, welches durch Massenspektrometrie oder SDS-PAGE bestimmt werden konnte. Aufgrund der Tetramerstruktur der α I- und β II-Tryptase war anzunehmen, dass es sich hierbei um das Tryptase-Tetramer handelt. Die Differenz zum theoretischen Molekulargewicht von 120 kDa lässt sich durch die Ungenauigkeit der Eichung und die Abhängigkeit des Laufverhaltens von möglicher Säuleninteraktion und Architektur des Tetramers erklären. Der korrekt prozessierte N-Terminus wurde durch eine N-terminale Sequenzierung verifiziert. Beide Tryptase-Mutanten besaßen die Proteinsequenz IIVG, welche den ersten vier Aminosäuren der reifen Tryptase entspricht.

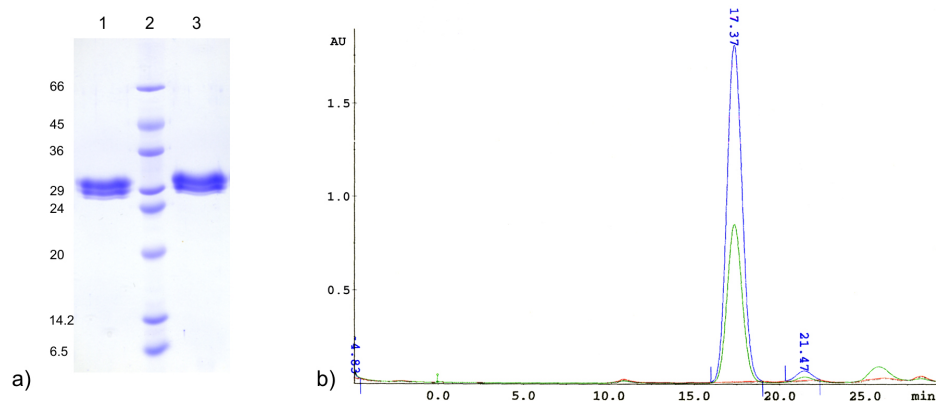


Abbildung 4.1: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Gelfiltration der α I-Tryptase-Mutanten. (a) 15% SDS-PAGE von rHT α G (1) und rHT α QG (3). Als Proteinmarker wurde der *high range* Proteinmarker von Sigma (2) verwendet. (b) Analytische Gelfiltration (Superdex 200 PC3.2) der leupeptininhibiterten α I-Tryptase Einzelmutante rHT α G^I als Beispiel.

4.2 Kristallisation und Strukturlösung

4.2.1 rHT α QG^I

Initiale nadelförmige Kristalle wuchsen innerhalb von 2-3 Wochen bei 20 °C in einer Kristallisationsbedingung bestehend aus 25 % PEG1500. Versuche, die Kristalle durch Additivscreens oder Feinscreens zu verbessern, die zusätzlich Puffersubstanzen und Salze enthielten, schlugen fehl. Auch *microseeding* und die Kristallisation bei verschiedenen Temperaturen blieb erfolglos. Wie sich jedoch herausstellte, ist es bei der Kristallisation der rHT α QG^I notwendig, frisch aufgereinigtes Protein zu verwenden. Innerhalb von zwei Wochen nach der Aufreinigung reduziert sich die Kristallisationsfähigkeit der Tryptase merklich, was zur Kristallisation von Nadelstrukturen führte, wie sie bei den initialen Kristallisationsexperimenten auftraten. Frisch aufgereinigtes Protein kristallisierte dagegen innerhalb von 14 Tagen in orthorhombischer Form. Die Kristallisation erfolgte bei 20 °C mit 500 μ l 28 % PEG1500 als Reservoirlösung. Es wurden 1,5 μ l Reservoirlösung

mit $1,5 \mu\text{l}$ Proteinlösung (12 mg/ml in 10 mM Mops pH 6,8, 0,7 M NaCl, 0,2 mM Leupeptin) vermischt. Die Kristalle besaßen eine Größe von $60 \times 60 \times 300 \mu\text{m}^3$, gehörten der Raumgruppe $P2_12_12_1$ an und enthielten ein Tetramer pro asymmetrischer Einheit (siehe Abbildung 4.2). Das Tetramer entsprach dem unter physiologischen Bedingungen vorhandenen Tetramer, das auch bei den Kristallstrukturen der α I-Tryptase und β II-Tryptase zu finden war. Der Proteingehalt der Kristalle betrug 51 %.

Die Kristalle wurden für die bei 100 K durchgeführten Messungen im Cryopuffer gebadet. Dazu wurde dreimalig im Abstand von je zwei Minuten $D(-)$ -2,3-Butandiol zugegeben, so dass die Endkonzentration in der Kristallisationsschale 7 % betrug. Der Kristall wurde auf einen Cryoloop überführt und in flüssigem Stickstoff weggefroren. Ein nativer Datensatz wurde an der Wiggler Beamline BW6 am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY, Hamburg) mit Hilfe eines *MAR Research 165 mm charge-coupled device detector* (MAR Research, Norderstedt) aufgenommen. Der Drehwinkel betrug $0,2^\circ$ und der Winkelbereich 90° . Es konnten Daten bis zu einer limitierenden Auflösung von $1,6 \text{ \AA}$ gesammelt werden. Die Zellparameter des Kristalls betragen $a = 83,31 \text{ \AA}$, $b = 88,57 \text{ \AA}$, $c = 163,37 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Die Struktur der Tryptase-Mutante wurde mit DENZO/SCALEPACK prozessiert (Otwinowski und Minor, 1997) und durch Patterson-Suchmethoden (*molecular replacement*) mit Hilfe des Programms AMoRe gelöst (Navaza, 1994). Die Proteinstruktur des humanen α I-Tryptase-Tetramer (PDB-Code: 1LTO) diente dabei als Suchmodell. Aufgrund des symmetrischen Tetramers wurden vier Lösungen mit ähnlichen Korrelationskoeffizienten und R-Faktoren gefunden. Es wurde eine Lösung gewählt und diese anschließend durch *rigid body refinement*, also durch Verfeinerung mit Betrachtung der vier Monomere als rigide Körper, besser an die Elektronendichte angepasst. Bis zu einem R-Faktor von $R_{\text{cryst}} = 19,0\%$, $R_{\text{free}} = 23,6\%$ folgten abwechselnd Verfeinerungs- und Modellbau-Zyklen mit den Programmen CNS-v1.1 und MAIN (Brunger *et al.*, 1998; Turk, 1992). Der freie R-Faktor (F_{free}) wurde aus 5 % der Reflexe berechnet, die auf dünnen Auflösungsschalen verteilt waren. Für die Verfeinerung wurden die Parameter von Engh & Huber verwendet (Engh und Huber, 1991). Die Struktur wurde unter Verwendung von $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ und $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichten überbaut. In den letzten Verfeinerungszyklen wurden *bulk solvent correction* miteinbezogen und Wassermoleküle zum Modell hinzugefügt sowie alternative Konformationen, Zuckermoleküle und $D(-)$ -2,3-Butandiol in die Elektronendichte gebaut. Strenge NCS-Restriktionen wurden während der gesamten Verfeinerung zwischen den Molekülen A/C und B/D angewandt. Die Statistik zur Datensammlung und Verfeinerung ist in Tabelle 4.1 aufgeführt.

4.2.2 rHT α G^I

Kristalle von rHT α G^I wuchsen innerhalb von zwei Wochen in einer Reservoirolösung aus 28 % PEG1500. Dazu wurden $1,5 \mu\text{l}$ Protein (12 mg/ml in 10 mM Mops pH 6,8, 0,7 M NaCl, 0,2 mM Leupeptin) mit $1,5 \mu\text{l}$ Reservoirolösung vermischt und bis zur Kristallisation bei 20°C aufbewahrt. Der für die Aufnahme eines Datensatzes verwendete Kristall war an einem Ende mit weiteren Kristallen verwachsen. Aufgrund seiner Größe von $20 \times 20 \times 250 \mu\text{m}^3$, war es möglich einen geeigneten Bereich für die Messung abzutrennen.

Kristall	rHT α QG ^I	rHT α G ^I	rHT α G
Raumgruppe		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Moleküle pro asymmetrischer Einheit		4	
Datensammlung			
Zellkonstanten			
a (Å)	83,31	83,30	83,31
b (Å)	88,57	88,23	88,93
c (Å)	163,37	162,87	162,92
α, β, γ (°)	90	90	90
Auflösung (Å)	1,6	2,3	2,1
Anzahl der Reflexe			
beobachtet	605.912	207.214	296.713
unabhängig	156.713	53.746	79.731
Completeness (%) ^a	98,9 (92,9)	99,6 (98,3)	99,7 (99,9)
R _{sym} (%) ^{a,b}	6,0 (47,7)	9,1 (36,0)	7,1 (33,9)
< I > / < σ > ^a	23,8 (2,4)	15,1 (3,3)	18,7 (4,3)
Wellenlänge (Å)	1,05	1,54	1,54
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	19,9-1,6	15,0-2,3	19,2-2,1
Anzahl der verwendeten Reflexe:			
<i>working set + test set</i>	156.604	53.696	70.547
<i>test set</i>	7.659	2.700	3.684
Test set size (%)	5,2	5,2	5,0
R _{cryst} /R _{free} (%)	19,0/23,6	21,7/25,9	21,6/24,5
Anzahl der Atome:			
Protein	8.142	7.715	7.926
Wasser	1.183	404	764
Liganden	244	158	76
Sonstige	24	24	0
Rmsd bonds (Å)	0,011	0,009	0,010
Bonded B's (Å ²)	2,9	1,8	1,8
gemittelter B-Faktor (Å ²) ^d	19,5 (20,8)	25,6 (36,5)	23,0 (28,1)

Tabelle 4.1: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik.

^a Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösungsschale (1,63-1,60 Å bei rHT α QG^I; 2,38-2,30 Å bei rHT α G^I und 2,17-2,10 Å bei rHT α G).

^b $R_{sym} = \sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)$.

^c $R_{cryst} = \sum_h ||F_{obs}(h)| - |F_{calc}(h)|| / \sum_h |F_{obs}(h)|$. Der R_{free} wurde von 5% der Reflexe berechnet, die nicht für die Verfeinerung berücksichtigt wurden.

^d In Klammern wurden die Werte für den Wilson-Plot-B-Faktor angegeben.

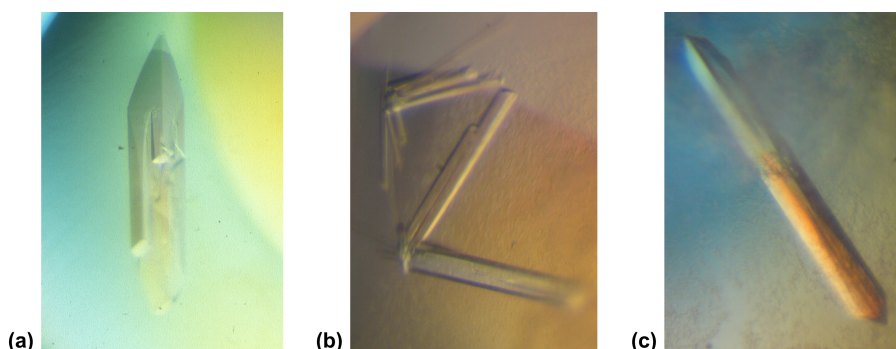


Abbildung 4.2: Kristalle der α I-Tryptase-Mutanten. (a) rHT α QG^I, (b) rHT α G^I und (c) rHT α G.

Zu der Kristallisationslösung, welche den Kristall enthielt, wurde in mehreren Schritten *D*(-)-2,3,-Butandiollösung zugegeben, bis die Endkonzentration 12,5 % betrug. Anschließend wurde ein kompletter nativer Datensatz des Kristalls bei einer Temperatur von 100 K an einem RIGAKU Drehanodengenerator (Rigaku/MSK, Sevenoaks, England) mit monochromatischer CuK_{α} -Strahlung und einer 345 mm *MAR Research Image Plate* aufgenommen. Der Winkelbereich betrug 90° bei einem Drehwinkel von $0,5^{\circ}$ pro Bild, die limitierende Auflösung betrug $2,3 \text{ \AA}$. Die orthorhombischen Kristalle gehörten der Raumgruppe $P2_12_12_1$ an und hatten im Vergleich zu rHT α QG^I fast identische Zellparameter (siehe Tabelle 4.1). Die Daten wurden mit DENZO/SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) prozessiert. Für die Patterson-Suche wurde jedoch das Modell rHT α QG^I (PDB-Code: 2F9N) ohne Liganden wie Zuckerreste oder Leupeptin und dem Cryoprotektanz *D*(-)-2,3-Butandiol verwendet. Verfeinerung und Modellbau erfolgten wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben. Die finalen R-Faktoren betragen $R_{cryst} = 21,7\%$, $R_{free} = 25,9\%$ (siehe Tabelle 4.1).

4.2.3 rHT α G

Die Kristallisation der leupeptinfreien Einzelmutante rHT α G erfolgte zunächst in Analogie zu den leupeptingebundenen Mutanten rHT α QG^I und rHT α G^I. Im Unterschied zu den leupeptingebundenen Mutanten befand sich die uninhibierte Einzelmutante rHT α G aufgrund der niedrigeren Tetramerstabilität in einem Hochsalz-Puffer (10 mM Mops pH 6,8, 2,0 M NaCl). Kristalle wuchsen binnen 3-4 Wochen in einem Puffer aus 40 % PEG1500 und 0,4 M NaCl. Am DESY aufgenommene Datensätze konnten aufgrund von annähernd perfekter merohedralearer Verzwilligung nicht gelöst werden. Der Beitrag der Zwillingsfraktion an den gemessenen Intensitäten betrug 40 %. Aus diesem Grund wurde zunächst versucht, nicht-verzwilligte Kristalle herzustellen.

Die Verwendung eines neuen Proteinpuffers mit niedrigerem Salzgehalt (10 mM Mops pH 6,8, 0,7 M NaCl) führte zur Kristallisation der leupeptinfreien Einzelmutante. Der Kristall besaß im Vergleich zu rHT α QG^I und rHT α G^I ähnliche Zellkonstanten ($83,31 \text{ \AA} \times 88,92 \text{ \AA} \times 162,92 \text{ \AA}$) und die identische Raumgruppe ($P2_12_12_1$). Die Abwesenheit des

stabilisierend wirkenden Leupeptins kann bei niedriger Salzkonzentration zum Zerfall des Tetramers führen. Die Kristallstruktur von rHT α G bestätigt jedoch aufgrund der gleichen Tetramerarchitektur, dass dies während der extrem kurzen Kristallisationsphase von 1-2 Tagen nicht eingetreten ist.

Für die Kristallisation bei 20 °C wurde als Reservoirpuffer 27,5 % PEG1500 verwendet und 1,5 μ l davon mit 1,5 μ l der Proteinlösung (7,4 mg/ml rHT α G in 10 mM Mops pH 6,8, 0,7 M NaCl) vermischt. Ein kompletter nativer Datensatz wurde bei einer Temperatur von 100 K an einem RIGAKU Drehanodengenerator mit monochromatischer CuK_{α} -Strahlung und einer 345 mm *MAR Research Image Plate* (Rigaku/MSO, Sevenoaks, England) aufgenommen. Die limitierende Auflösung betrug 2,1 Å, der Winkelbereich umfasste 90 ° und der Drehwinkel 0,5 °. Datenreduktion, Strukturlösung und Verfeinerung erfolgte analog zu rHT α G^I.

Das 214-220-Segment der aktiven Mutante rHT α G wurde zu Beginn wie im Patterson-Suchmodell (rHT α QG^I) vorgegeben, in die Elektronendichte gebaut und über mehrere Zyklen verfeinert. Die im Vergleich zu den vier bekannten Tryptasestrukturen hohen B-Faktoren des 214-220-Segments und die zusätzlich vorhandene Elektronendichte am Eingang zur S1-Tasche führte zur Annahme einer weiteren „alternativen“ Konformation des 214-220-Segments. Diese zweite Konformation entspricht der Konformation des 214-220-Segments in der Struktur der α I-Tryptase und wird deshalb als α -Konformation bezeichnet. Unter Verwendung der B-Faktoren, die sich für dieses Segment nach der Verfeinerung der Kristallstrukturen von rHT α QG^I und rHT α G^I ergaben, wurde die *occupancy* (prozentualer Anteil der Belegung einer Konformation) verfeinert. Für die α -Konformation ergab sich ein Wert von 0,25, für die β -Konformation ein Wert von 0,75. Wassermoleküle, die im Fall der offenen Konformation in der S1-Tasche lokalisiert sind, wurden eingefügt und einer *occupancy* von 0,75 zugewiesen. Um Fehler durch das Strukturmodell zu verringern (*model bias*), wurde für das 214-220-Segment mit Hilfe von MAIN eine *kicked omit map* berechnet (Turk, 1992). Zehn Elektronendichten wurden unabhängig voneinander berechnet, nachdem zuvor alle Atome zufällig um 0,3 Å versetzt wurden. Bei der Berechnung der Elektronendichte wurde der Bereich von Val213 bis Gly226 der α -Konformation ausgenommen, alle anderen Atome wurden für die Berechnung von F_{calc} und α_{calc} verwendet. Anschließend wurden die zehn Elektronendichten gemittelt. Um *model bias* noch weiter zu reduzieren und die Elektronendichte noch zu verbessern, wurde die *kicked omit map* nochmals unter Verwendung der 222-Symmetrie des Tetramers gemittelt. Die finalen R-Faktoren betragen $R_{cryst} = 23,0\%$ und $R_{free} = 28,1\%$ (siehe Tabelle 4.1).

4.3 Strukturbeschreibung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Kristallstrukturen von zwei rekombinant exprimierten, humanen α I-Tryptase-Mutanten rHT α -D216G (rHT α G^I) und rHT α -K192Q/D216G (rHT α QG^I) und im Komplex mit dem Inhibitor Leupeptin sowie die Struktur der Einzelmutante rHT α -D216G (rHT α G) in Abwesenheit eines Inhibitors durch Patterson-

Suchmethoden gelöst. Alle drei Kristalle besaßen die Raumgruppe $P2_12_12_1$ und nahezu identische Zellkonstanten (siehe Tabelle 4.1). Wie bei der Struktur der α I-Tryptase konnte bei allen Tryptase-Mutanten ein Tetramer pro asymmetrischer Einheit gefunden werden. Obwohl sich die Kristallform der drei Tryptase-Mutanten von den Formen der α I-Tryptase und β II-Tryptase unterscheidet, ist in allen Kristallen auch eine ähnlich Tetramerarchitektur zu finden.

Die Datensätze der Einzelmutanten wurden in der Abteilung Strukturforschung (Max-Planck-Institut, Martinsried) aufgenommen, während für den Datensatz der Doppelmutante Synchrotronstrahlung (DESY, Hamburg) verwendet wurde. Dieser Datensatz besitzt eine limitierende Auflösung von 1,6 Å und eine etwas bessere Datenqualität als die beiden Datensätze der Einzelmutante. Die Struktur des Monomers und des Tetramers wird deshalb im Folgenden anhand der Kristallstruktur von rHT α QG^I erklärt. Unterschiede zwischen den einzelnen Tryptase-Mutanten werden in den darauffolgenden Abschnitten näher erläutert. Für die Hauptketten der Monomere ist in allen drei Strukturen die Elektronendichte von Ile16 bis Lys244 definiert. Bereiche, die nicht in der Elektronendichte vorhanden sind, wurden durch Herabstufung der *occupancy* auf den Wert „0“ von der Verfeinerung ausgenommen. Bei der Beschreibung des Tryptase-Tetramers wurde die chymotrypsinogen-basierte Nummerierung verwendet. Aminosäuren von benachbarten Monomeren wurden mit „*“ gekennzeichnet.

4.3.1 Struktur des Monomers

Die Struktur des Monomers gleicht der Struktur anderer trypsinartiger Serinproteinasen. Das Monomer besteht aus zwei sechssträngigen β -barrels, die zueinander senkrecht stehen, zwei α -Helices (mittlere und C-terminale Helix) und einer kurzen helikalen Windung (Ala55-Val59; siehe Abbildung 4.3). Die Ähnlichkeit der Monomerstruktur im Vergleich zur α I- und β II-Tryptase zeigt sich in der geringen rms-Abweichung von 0,4 Å. Die rms-Abweichung wurde unter Verwendung von 240 Carbonylatomen pro Monomer berechnet. Im Gegensatz zu dem eher konservierten Kernbereich des Proteins besitzt die Tryptase sechs nicht-konservierte *loop*-Regionen (*37-loop*, *60-loop*, *70-80-loop*, *97-loop*, *147-loop* und *173-flap*), welche aufgrund ihrer einzigartigen Aminosäurekomposition für die Ausbildung des Tryptase-Tetramers verantwortlich sind. Die zwischen α I- und β II-Tryptase nicht-konservierten Aminosäuren sind hauptsächlich in diesen *loop*-Regionen zu finden (siehe Abbildung 2.2). Die Aminosäuren der katalytischen Triade (Ser195, His57 und Asp102) befinden sich zwischen den beiden β -barrels. Die *active site cleft* verläuft dagegen senkrecht zu diesem Bereich. In allen drei Kristallstrukturen ragt der N-Terminus (Ile16) in das Monomer und bildet eine Salzbrücke zu Asp194 aus. Diese Salzbrücke bewirkt die korrekte Faltung des Monomers und die Ausbildung der S1-Tasche, in der große P1-Reste wie Arginin oder Lysin Platz finden können. Außerdem sorgt die Salzbrücke für die korrekte Faltung der Oxyaniontasche.

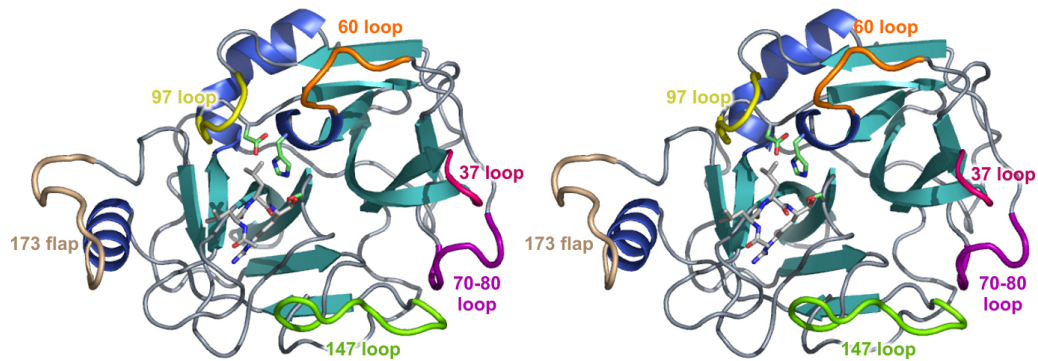


Abbildung 4.3: Stereoabbildung des Monomers der Mutante rHT α QG^I in Standardorientierung. Die zwei β -barrels wurden in Türkis dargestellt, die α -Helices in Blau. Die sechs nicht-konservierten Oberflächenloops, die an der Ausbildung der Tetramer-Kontakte beteiligt sind, wurden farblich hervorgehoben. Die *active site cleft* befindet sich zwischen den beiden β -barrels und die dazugehörigen Aminosäuren der katalytischen Triade (Ser195, His57 und Asp102) wurden als grünes *ball-and-stick*-Modell dargestellt. Der Inhibitor Leupeptin, der an das aktive Zentrum bindet, wurde als graues *ball-and-stick*-Modell abgebildet.

4.3.2 Struktur des Tetramers

Die physiologisch relevante Einheit (biologische Einheit) ist bei allen Trypsasemutanten sowie bei den Strukturen der α I- und β II-Trypsase das Trypsase-Tetramer, welches eine pseudo-222 Symmetrie besitzt (siehe Abbildung 4.4). Die vier Monomere berühren sich gegenseitig an Kontaktbereichen, den sogenannten Interfaces. Das große A-D-Interface ist der Interaktionsbereich von Monomer A und D bzw. B und C. Das kleine A-B-Interface wird von Monomer A und B bzw. C und D gebildet.

Kontaktflächen im Tetramer

Die Kontaktfläche des kleinen A-B-Interfaces beträgt ca. 590 \AA^2 und ist hinsichtlich ihrer Größe vergleichbar mit den Kontaktflächen von α I-Trypsase (520 \AA^2) und β II-Trypsase (530 \AA^2). Jedoch konnte die von Marquardt *et al.* (2002) für dieses Interface vorgeschlagene stabilisierende Salzbrücke zwischen Arg37A und Glu149* nicht bestätigt werden und wird somit nicht zur Stabilisierung des A-B-Interfaces beitragen (Reste des benachbarten Monomers wurden mit „*“ gekennzeichnet).

Im A-D-Interface konnten dagegen bedeutende Unterschiede festgestellt werden (siehe Tabelle 4.2). Die Kontaktfläche des Interfaces beträgt 1.270 \AA^2 bei rHT α QG^I und 1.250 \AA^2 bei rHT α G^I. Das Interface von rHT α G besitzt dagegen je nach Konformation des 214-220-Segments mit 1.080 \AA^2 bzw. 1.040 \AA^2 eine Fläche, die der von α I-Trypsase (1.020 \AA^2) und β II-Trypsase (1.050 \AA^2) eher entspricht. Zusätzlich bestehen Unterschiede im Abstand der Monomere A-D (bzw. B-C). Der Abstand bei rHT α QG^I ist um $1,4 \text{ \AA}$ geringer als bei α I-Trypsase ($23,8 \text{ \AA}$ und $22,4 \text{ \AA}$). Deutlicher wird der Unterschied bei der

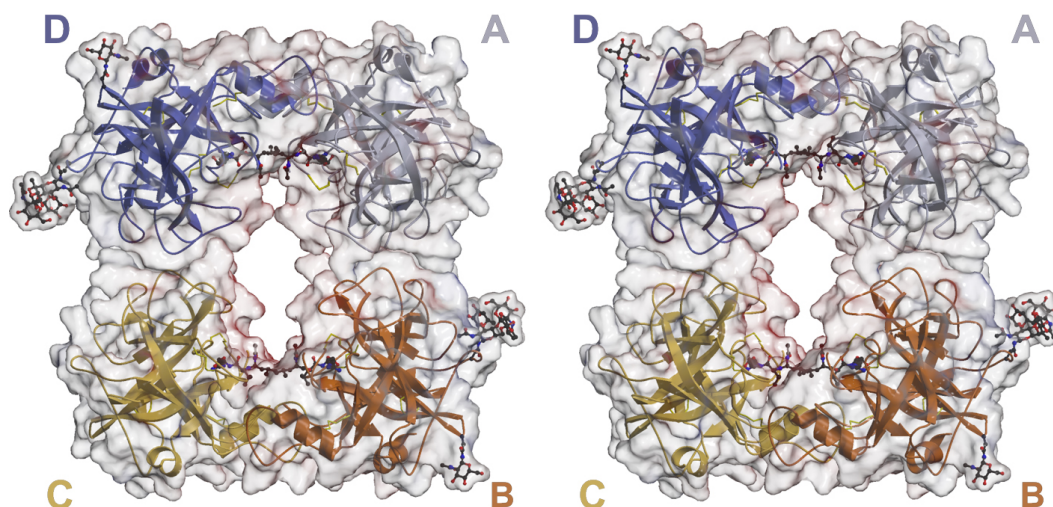


Abbildung 4.4: Stereoabbildung des Tetramers der Mutante $rHT\alpha QG^I$ mit semitransparen- ter Oberfläche. Die Monomere A, B, C und D wurden in den Farben grau, orange, gelb und blau dargestellt. Der ans aktive Zentrum gebundene Inhibitor Leupeptin und die Glykosylierung an Asn113 und Asn204 wurden als graue *ball-and-stick*-Modelle abgebildet.

Einzelmutante. Während die leupeptingebundene Mutante einen Monomerabstand von 22,3 Å besitzt, ist der Abstand der freien Mutante identisch zum Abstand der β II-Tryps- tase (23,1 Å; siehe Tabelle 4.2). Die Daten zeigen, dass die Bindung des Leupeptins eine Veränderung hervorruft, die dafür sorgt, dass sich der Monomerabstand reduziert und die Kontaktflächen vergrößern. Diese Unterschiede sind auf eine durch Leupeptinbin- dung hervorgerufene Veränderung des 97-loops zurückzuführen, die im Abschnitt 4.7 näher erläutert wird.

Enzym	Kontaktfläche A-D	Abstand A-D
$rHT\beta$	1.050 Å ²	23,1 Å
$rHT\alpha$	1.020 Å ²	23,8 Å
$rHT\alpha G(\beta\text{-Konf})$	1.080 Å ²	23,1 Å
$rHT\alpha G(\alpha\text{-Konf})$	1.040 Å ²	—
$rHT\alpha G^I$	1.250 Å ²	22,3 Å
$rHT\alpha QG^I$	1.270 Å ²	22,4 Å

Tabelle 4.2: Kontaktflächen und Abstände der Monomere A und D. Die Größe der Kon- taktfläche wurde durch den *protein-protein interaction server* berechnet. Die Monomerabstände wurden relativ zur Lage der katalytischen Zentren berechnet.

Glykosylierung

Wie auch die α II-, β I- und β II-Tryptase besitzt die α I-Tryptase zwei N-Glykosylierungsstellen am Asn113 und Asn204 mit den Konsensussequenzen Asn-X-Ser und Asn-X-Thr (siehe Abbildung 2.2). In den drei Strukturen rHT α QG^I, rHT α G^I und rHT α G ist an beiden Glykosylierungsstellen Elektronendichte vorhanden, jedoch ausschließlich an den Monomeren B und D. Eine mögliche Erklärung liegt in den unterschiedlichen Kontaktbereichen zu Symmetrieverwandten. Der Abstand zwischen dem jeweils symmetrieverwandten Tetramer ist bei den Monomeren B und D deutlich geringer als bei den Monomeren A und C. Dies kann bei den Monomeren B und D eine geringere Flexibilität der Glykosylierung zur Folge haben, die dadurch an diesen Glykosylierungsstellen gut definierte Elektronendichte hervorbringt. Eine weitere Möglichkeit wäre die asymmetrische Glykosylierung der Monomere B und D. Da die Tryptase vor der Assemblierung zum Tetramer glykosyliert wird, dürften selektiv nur die Hälfte der Tryptase-Untereinheiten glykosyliert werden und jeweils zwei nicht-glykosylierte und zwei glykosylierte Untereinheiten zum tetrameren Komplex zusammenfinden. Aus diesem Grund wird diese asymmetrische Glykosylierung aller Wahrscheinlichkeit nach nur durch die Packung der Tetramere im Kristall vorgetäuscht. Die Glykosylierung am Asn113, welche durch Elektronendichte definiert ist, zeigt zwei N-Acetyl-Glukosaminreste (GlcNAc) und zwei Fukosereste (FUC). Die zwei Fukosereste sind durch eine α 1,3- und eine α -1,6-glykosidische Bindung an den ersten GlcNAc-Rest gebunden. Dieses GlcNAc besitzt eine weitere glykosidische Bindung (α 1,4) zu einem zweiten GlcNAc (siehe Abbildung 4.5). Die Difukosylierung des ersten GlcNAc ist typisch für Insekten und trat aufgrund der Expression in Insektenzellen auf.

4.3.3 Das aktive Zentrum der durch Leupeptin inhibierten Mutanten Substratbindungsbereich bei leupeptingebundenen Mutanten

In den enzymatisch aktiven α I-Tryptase-Mutanten rHT α QG und rHT α G ist Leupeptin kovalent an das aktive Zentrum gebunden. Die C-terminale Aldehydgruppe bildet einen Hemiacetal-Komplex mit Ser195 O^γ (siehe Abbildung 4.6a). Das Carbonylsauerstoffatom des P1-Restes ragt nicht in die Oxyaniontasche, sondern weist aus der *active site cleft* heraus unter Ausbildung einer Sauerstoffbrücke zum His57 N^{ε2}. Leupeptin bildet Wasserstoffbrücken mit den Atomen der Hauptkette des Segments Ser214-Gly216 und ein leicht verdrilltes, antiparalleles Faltblatt aus. Diese antiparallele Ausrichtung ist ein Markenzeichen vieler trypsinartiger Serinproteinasen (Huber und Bode, 1978). Das Segment Ser214-Cys220 (214-220-Segment) beschreibt einen offenen Rahmen, der im Bereich von Glu217 um 90° geknickt ist. Diese Konformation wurde bereits bei der enzymatisch aktiven β II-Tryptase gefunden und unterscheidet sich gravierend von der Konformation, die in der α I-Tryptase vorgefunden wurde. Bei der α I-Tryptase ist das 214-220-Segment stark verformt und ragt zickzackartig über die S1-Tasche. Die Bindung von Substratketten an das aktive Zentrum ist in diesem Fall nur nach starker Umorganisation dieses Bereiches möglich.

In den zwei leupeptininhibierten α I-Tryptase-Strukturen rHT α QG^I und rHT α G^I ragt

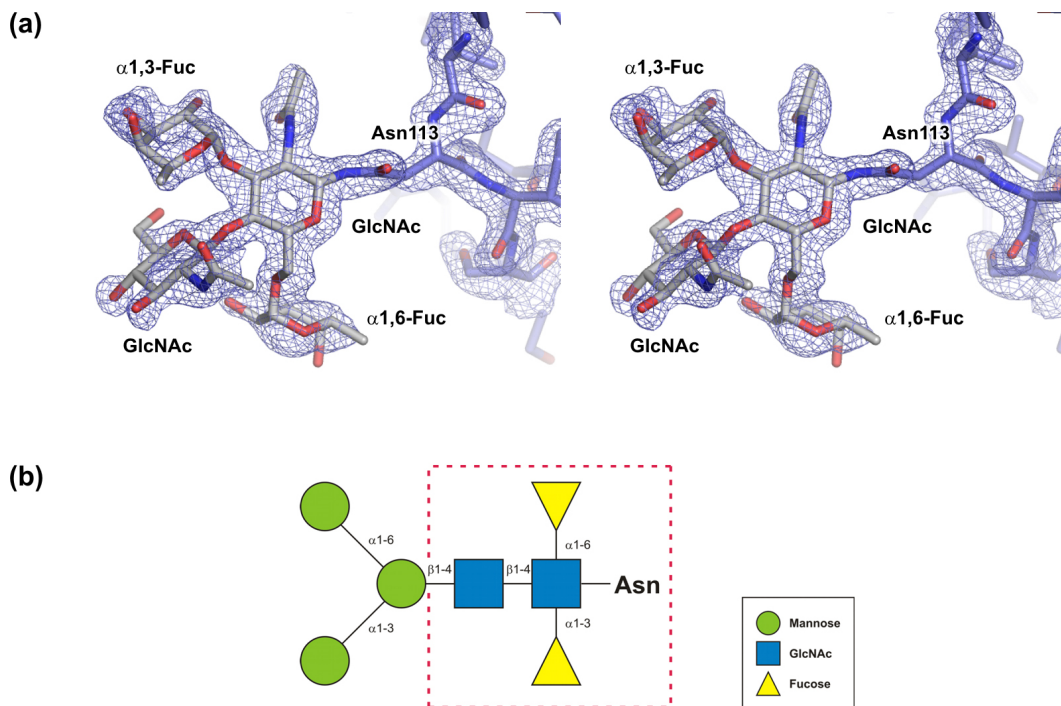


Abbildung 4.5: N-glykosidisch an Asn113 gebundene Zucker. Stereoabbildung der Glykosylierung an Asn113 des Monomers B. Die $2F_{obs}-F_{calc}$ Elektronendichte (blau) wurde auf 1σ konturiert. Zwei Fukosereste sind $\alpha 1,3$ - und $\alpha 1,6$ -glykosidisch mit dem ersten GlcNAc verknüpft, an das $\alpha 1,4$ -glykosidisch ein weiteres GlcNAc gebunden ist. (b) Schematische Darstellung des Pentasaccharidkernbereichs der N-glykosidisch gebundenen Zucker wie sie bei Insekten auftreten kann. Die rote, durchbrochene Linie zeigt die in der Elektronendichte definierten Zuckerreste

die Seitenkette des P1-Arginins in die S1-Tasche, welche durch die Segmente 226-228, 214-220, 190-195 und die Cys191-Cys220-Disulfidbrücke gebildet wird. Die distale Guanidinogruppe des P1-Arginin bildet am Boden der S1-Tasche Wasserstoffbrücken mit beiden Carboxylatsauerstoffatomen des Restes Asp189 aus sowie mit dem Carbonylsauerstoff von Gly219 und einem in der S1-Tasche verborgenen Wassermolekül. In der Struktur der Doppelmutante rHT α QG^I wird Leupeptin durch eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen Gln192 N^ε und dem Carbonylsauerstoffatom von P2-Leucin stabilisiert. Gln192 bildet zusätzlich eine Wasserstoffbrücke mit einem Wassermolekül aus, welches selbst aufgrund seiner Position zwischen dem 214-220-Segment und Leupeptin über Wasserstoffbrücken mit P1-Arginin N^{ε2}, Gly216 O und Gly218 O verbunden ist. In der Struktur der Einzelmutante rHT α G^I trägt die Aminosäure Lys192, welche das Gln192 bei rHT α QG^I ersetzt, nicht zur Stabilisierung der Leupeptinbindung bei, da die Seitenkette in Richtung der zentralen Pore ragt und dadurch keine Wasserstoffbrücke mit Leupeptin ausbilden kann (siehe Abbildung 4.6).

In beiden α I-Tryptase-Mutanten ragt die P2-Leucin-Seitenkette des Leupeptins in die

hydrophobe S2-Tasche, die durch die Seitenketten von His57, Trp215, Phe94 und Thr99 des „eigenen“ 97-loops und einer Seitenkette des 97-loops des benachbarten Monomers (Ile97*) ausgebildet wird. Während der kanonischen Bindung eines Substrates bildet das Amidstickstoffatom des P3-Restes eine Wasserstoffbrücke mit Gly216 O aus, so dass die Seitenkette des P3-Restes in Richtung der zentralen Pore und somit weg vom aktiven Zentrum weist. Bei der Bindung von Leupeptin an die beiden α I-Tryptase-Mutanten ist der P3-Rest Leucin um 120° um die $C^\alpha - C$ -Bindung gedreht. Der Carbonylsauerstoff bildet eine nicht-kanonische Wasserstoffbrücke mit dem Amidstickstoff des Gly219 aus. In dieser „rotierten“ Konformation zeigt die P3-Seitenkette in die Richtung des 97*-loop und befindet sich in einer hydrophoben Bindungsregion, die aus den Seitenketten von Ile96* und Ile96* gebildet wird (siehe Abbildung 4.6).

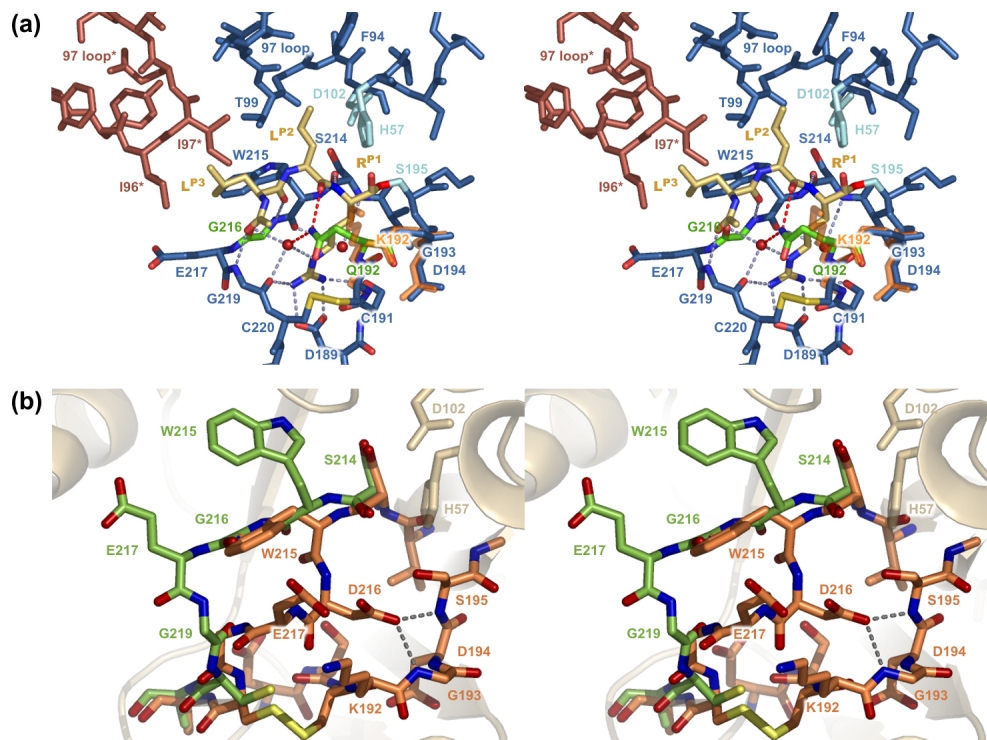


Abbildung 4.6: Leupeptinbindung und Konformationsunterschiede am aktiven Zentrum. (a) *Active site cleft* der α I-Tryptase-Mutante rHT α QG^I mit dem an Ser195 (hellblau) gebundenen Inhibitor Leupeptin (gelbe C-Atome, blaue N-Atome, rote O-Atome). Die 97-loops von Monomer A und D wurden in den Farben blau und braun abgebildet, Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt. Die mutierten Reste Gln192 und Gly216 wurden grün hervorgehoben. Die durch die Mutation an Position 192 zusätzlich entstandenen Wasserstoffbrücken sind als rot gestrichelte Linien dargestellt. Das Segment 191-194 der Mutante rHT α Q^I wurde als halbtransparentes orange-farbenes Stickmodell mit rHT α QG^I überlagert. (b) Überlagerung des Substratbindungsbereichs von α I-Tryptase (orange) und β II-Tryptase (grün). In der α I-Tryptase ist das 214-220-Segment deformiert und versperrt den Zugang zur S1-Tasche. Asp216 stabilisiert diese α -Konformation durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit den Amidstickstoffatomen von Gly193 und Ser195. In der Struktur der β -Tryptase besitzt das 214-220-Segment eine offene β -Konformation, die der Substratbindung entgegenkommt.

Flexibilität des 97-Loops

In den Strukturen der α I-Tryptase und β II-Tryptase weisen die 97-loops trotz dreier nicht-konservierter Aminosäuren (Ile96, Ile97, Thr99 in α I-Tryptase, Thr96, Ala97, Ile99 in β II-Tryptase; siehe Abbildung 2.2) eine nahezu identische Konformation der Hauptkette auf. Bei einem in Standardorientierung ausgerichteten Monomer befindet sich der „eigene“ 97-loop oberhalb der Substratbindungsstelle und weist in Richtung Trp215, der benachbarte 97*-loop befindet sich rechts daneben (siehe Abbildung 4.7). Im Komplex mit Leupeptin zeigt sich jedoch eine deutlich andere Konformation des 97-loops. Um die Bindung des Leupeptins zu ermöglichen, ändern die benachbarten 97-loops ihre Konformation. Die beiden 97-loops weisen nun zur jeweils benachbarten Substratbindungsstelle. Dies schafft Raum für den hydrophoben P2-Leucin-Rest, der ohne diese Konformationsänderung mit Ile97 zusammenstoßen würde. Diese Konformationsänderung ereignet sich im Zentrum des A-D-Interfaces des Tryptase-Tetramers und bewirkt erstaunlicherweise nicht dessen Zerfall, sondern möglicherweise sogar eine Stabilisierung des Tetramers.

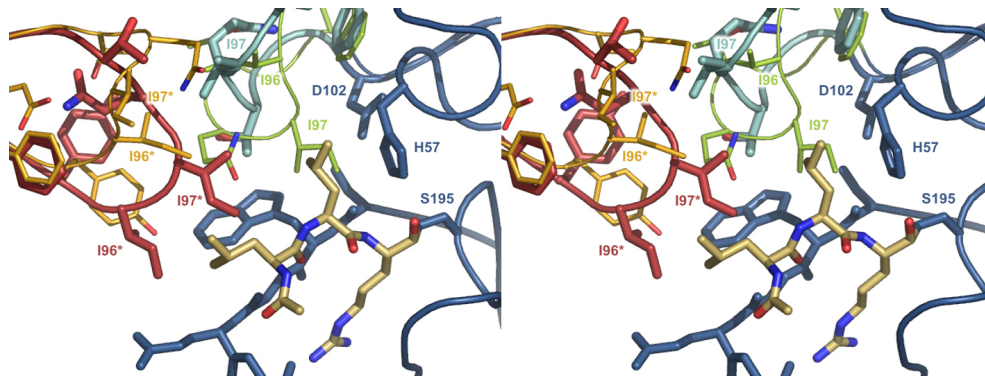


Abbildung 4.7: Stereoabbildung des A-D Interfaces in rHT α QG^I. Leupeptin (gelb) ist an das aktive Zentrum des Monomers A (blau) gebunden. Die 97-loops von Monomer A (hellblau) und D (rot) wurden mit den 97-loops von α I-Tryptase überlagert (Monomer A in grün; Monomer D in orange). Aufgrund der Konformationsänderung bilden die 97-loops von rHT α QG^I die S2- und die „neue“ S3-Bindungsregion.

4.3.4 Substratbindungsbereich der Mutante rHT α G

Die bereits beschriebenen Strukturen der zwei α I-Tryptase-Mutanten sowie die Struktur der β II-Tryptase wurden mit einem am aktiven Zentrum gebundenen Inhibitor gelöst, der zur Stabilisation der Tetramer-Struktur und der offenen Konformation am aktiven Zentrum diente. Die einzige Struktur, die bisher ohne Inhibitor gelöst wurde, ist die Struktur der α I-Tryptase, bei der sich die Substratbindungsstelle jedoch als deformiert und vielleicht sogar nicht funktionsfähig herausstellte. Aufgrund der Unterschiede in den Strukturen der α I- und β II-Tryptase wurde angenommen, dass dies mit dem Aminosäureaustausch an Position 216 (Asp in α I-Tryptase, Gly in β II-Tryptase) in Zusammenhang

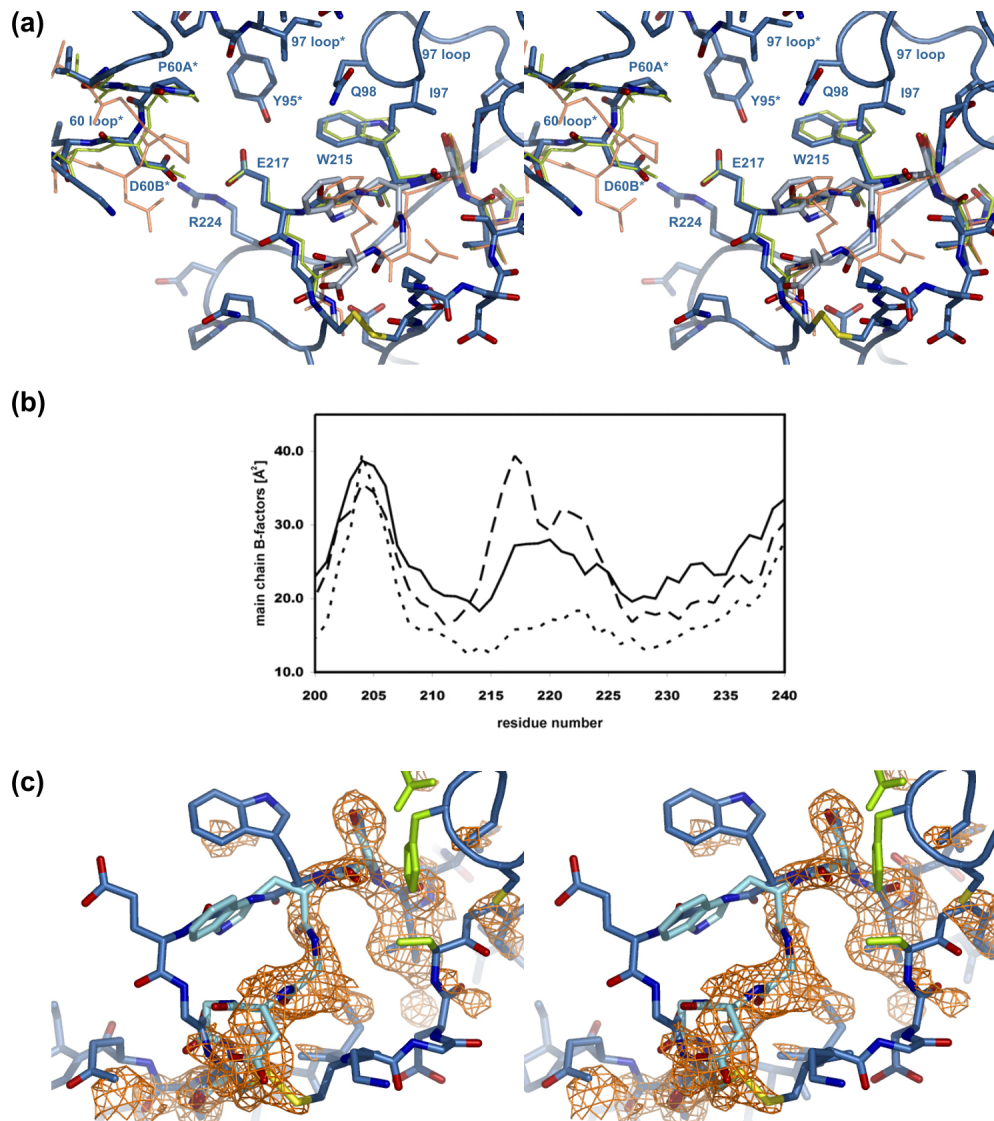


Abbildung 4.8: Die enzymatisch aktive Mutante rHT α G. (a) Stereoabbildung des aktiven Zentrums von rHT α G und ihrer unmittelbaren Umgebung. Die geschlossene α -Konformation wurde in Hellblau dargestellt, die offene β -Konformation in Dunkelblau. Zusätzlich wurde das 214-220-Segment und der 60-loop von α I-Tryptase (orange) und β II-Tryptase (grün) mit der Mutante rHT α G überlagert. Die Überlagerung zeigt die hohe Übereinstimmung der alternativen Konformationen mit den Konformationen der Wildtyp-Tryptasen (α I- und β II-Tryptase). (b) Die Grafik zeigt ein Diagramm, bei dem die B-Faktoren gegen die Chymotrypsinogen-Nummerierung der Aminosäuren aufgetragen wurden. rHT α QG^I wurde als gepunktete Linie, rHT α G als gestrichelte Linie und rHT α G^I als durchgezogene Linie dargestellt. (c) Die Elektronendichte einer gemittelten *kicked omit map* (orangefarbenes Gitter) bestätigt das Vorhandensein einer zweiten geschlossenen α -Konformation (hellblau) neben der in Dunkelblau dargestellten offenen β -Konformation. Die Elektronendichte wurde für die Reste 214-220 der geschlossenen Konformation berechnet und bei $1,8\sigma$ konturiert. Die Reste der katalytischen Triade wurden grün hervorgehoben.

steht. Die verlangsamte Zerfallsrate der Mutante rHT α G ermöglichte die Kristallisation ohne Inhibitor und gibt aufgrund der Mutation Asp216Gly auch Hinweise auf den Zustand der freien Substratbindungsstelle der β II-Tryptase.

Die Gesamtstruktur des rHT α G-Monomers ähnelt aufgrund der niedrigen rms-Abweichung der C^α -Atome (0,4 Å) stark der α I-Tryptase, β II-Tryptase und den zwei leupeptingebundenen Mutanten rHT α QG^I und rHT α G^I. Die rms-Abweichung wurde anhand von 234 Aminosäuren des Monomers berechnet, wobei das 214-220-Segment bei der Berechnung nicht berücksichtigt wurde. Das 214-220-Segment entsprach der offenen Konformation (β -Konformation), wie sie auch bei β II-Tryptase und den leupeptingebundenen Mutanten vorhanden war (siehe Abbildung 4.8a). Wie auch in der leupeptingebundenen Mutante rHT α G^I scheint Lys192 die Konformation des 214-220-Segments nicht zu beeinflussen. Die Seitenkette von Lys192 weist auch in dieser Struktur in Richtung der zentralen Pore und somit weg von der Substratbindungsstelle. Die Höhlung der S1-Tasche ist mit Wassermolekülen gefüllt. Die Seitenkette des Trp215 befindet sich in einer hydrophoben Tasche, die von den Aminosäuren Tyr95*, Tyr172, Ile176, Met180, Ile227 und Ile97-Gln98 gebildet wird. Glu217 ist an der Ecke des 214-220-Segments lokalisiert. Seine Seitenkette weist zum benachbarten Monomer und interagiert mit dem 60*-loop, insbesondere mit den Carboxylatsauerstoffatomen der Aminosäure Asp60B*. Dieser elektrostatisch unvorteilhafte Kontakt scheint teilweise wieder durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren Gln221A, Arg224 und Wassermolekülen reduziert zu werden. Im Laufe der Verfeinerung der Struktur von rHT α G traten im Bereich des 214-220-Segments stark erhöhte Temperaturfaktoren (B-Faktoren) auf (siehe Abbildung 4.8b). Der durchschnittliche B-Faktor dieser Region beträgt 31,3 Å², während das gesamte Monomer einen B-Faktor von nur 23,0 Å² besitzt. Im Gegensatz dazu besaßen die leupeptingebundenen Strukturen in diesem Segment durchweg niedrigere B-Faktoren (siehe Tabelle 4.3). Zusätzlich war die Elektronendichte im Bereich des 214-220-Segments geringfügig schlechter definiert als in den beiden leupeptingebundenen Mutanten.

Struktur	214-220-Segment	Gesamtes Tetramer	$\Delta_{Tetra.-Segm.}$
α I-Tryptase	35,4 Å ²	42,5 Å ²	+7,1 Å ²
β II-Tryptase	25,8 Å ²	27,3 Å ²	+1,5 Å ²
rHT α QG ^I	15,0 Å ²	19,5 Å ²	+4,5 Å ²
rHT α G ^I	23,6 Å ²	25,6 Å ²	+2,0 Å ²
rHT α G	31,3 Å ²	23,0 Å ²	-8,3 Å ²

Tabelle 4.3: Vergleich der gemittelten B-Faktoren der 214-220-Segmente und der Tryptase-Tetramere. Die Auflistung spiegelt die Werte vor dem Einbau der zweiten Konformation und der *occupancy*-Verfeinerung wider. In der dritten Spalte ist die Differenz von Tetramer und 214-220-Segment angegeben, und weist verglichen mit den übrigen Tryptasen bei rHT α G eine deutliche Abweichung auf.

Diese erhöhte Beweglichkeit des 214-220-Segments bei rHT α G kann nicht durch Fehler bei der Verfeinerung oder durch Datenartefakte erklärt werden, da beide Strukturen dieser Einzelmutante (rHT α G^I und rHT α G) einen ähnlichen mittleren B-Faktor aufweisen. Der Vergleich ist möglich, da beide Strukturen eine ähnliche limitierende Auflösung und Datenqualität besitzen, vom gleichen Suchmodell abstammen und einer ähnlichen Verfeinerungsstrategie unterzogen wurden. Aus diesem Grund kommt nur eine wirklich erhöhte Beweglichkeit des 214-220-Segments in Betracht, die ebensogut vom Vorhandensein einer zweiten Konformation herrühren könnte, welche auch mit einer zu hohen *occupancy* einhergeht. Was das Vorhandensein einer zweiten Konformation im Bereich der S1-Tasche noch zusätzlich unterstützt, ist die dort vorhandene Elektronendichte, die aufgrund der länglichen Form nicht auf Wassermoleküle zurückgeführt werden konnte. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass es sich bei dieser Elektronendichte um eine zweite Konformation des 214-220-Segments handelt. Diese Möglichkeit wurde durch das Modellieren von Aminosäuren in die zweite Konformation und das Anpassen der B-Faktoren auf Werte, die von der Struktur rHT α G^I in einem proportionalen Verhältnis übernommen wurden, näher untersucht. Nach der Anpassung der aufgrund einer Überbewertung der *occupancy* verfälschten B-Faktoren war schließlich die Verfeinerung der *occupancy* möglich und ergab bei der „offenen“ Konformation (β -Konformation) eine *occupancy* von 75 % und im Fall der „geschlossenen“ Konformation (α -Konformation) eine *occupancy* von 25 %. Das Vorhandensein der alternativen α -Konformation wurde durch die Berechnung einer *kicked omit map* bestätigt (Turk, 1992). Dabei wurde das gesamte Molekül inklusive der β -Konformation der Reste Val213-Gly226 und der Wassermoleküle, die nur in dieser Konformation vorhanden sind, von der berechneten Dichte subtrahiert, so dass am Ende nur die Dichte der α -Konformation betrachtet werden konnte. Diese *kicked omit map* wurde anschließend vierfach unter Ausnutzung der 222-Symmetrie des Tetramers gemittelt. Die Elektronendichte zeigte deutlich, dass im Substratbindungsbereich eine zweite Konformation vorhanden ist, die eine sehr hohe Ähnlichkeit zur Konformation des 214-220-Segments der α I-Tryptase besitzt (siehe Abbildung 4.8c). Der letzte Verfeinerungszyklus, bei dem die alternative Konformation des 214-220-Segments sowie die neuen *occupancy*-Werte berücksichtigt wurden, bestätigt das gleichzeitige Vorhandensein von α - und β -Konformation in einem Verhältnis von 1:3. Die flexible Seitenkette des Trp215 der α -Konformation ist in der *kicked omit map* nicht definiert. Jedoch zeigt der Verlauf der Hauptkette und die bereits gelöste Struktur der α I-Tryptase, dass die Seitenkette des Trp215 sich höchstwahrscheinlich im Bereich der Aminosäure Gly216 der β -Konformation befindet. Unter Berücksichtigung der geringen *occupancy* von 25 % stammt dieses Fehlen an Elektronendichte höchstwahrscheinlich von der hohen Mobilität der Trp215-Seitenkette, die schon in der Struktur der α I-Tryptase beobachtet werden konnte. Gly216 befindet sich an der gleichen Position, an der Asp216 in der α I-Tryptase lokalisiert ist. Dadurch blockiert Gly216 den Eingang zur S1-Tasche, kann jedoch keine stabilisierenden Wasserstoffbrücken mit Gly193 und Ser195 ausbilden. Glu217 zeigt wie in α I-Tryptase vom aktiven Zentrum weg in Richtung der Disulfidbrücke Cys191-Cys220.

Kapitel 5

Ergebnisse - Humanes Securin

5.1 Proteinaufreinigung

Verschiedene Fragmente der humanen Separase (Esp1) sowie humanes Securin (Pds1) wurden in pET23b-Vektoren kloniert und für die rekombinante Expression verwendet. Die Vektoren wurden freundlicherweise von Kelly Boatright (Burnham Institute, La Jolla, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Die Fragmente wurden im Vektor zwischen die Restriktionsschnittstellen NdeI und XhoI kloniert und erlaubten so die Expression des rekombinanten Proteins mit einem C-terminalen His-tag. Die Aufreinigung konnte durch Affinitätschromatographie über eine NiNTA-Säule (Qiagen, Hilden) erfolgen.

DNA	Konstrukt	Aminosäuren	MW (kDa)
hsPds1	K16	1-202	22,5
hsEsp1	K44	1419-2120	77,7
hsEsp1	K42	1474-2120	71,9
hsEsp1	K13	1882-2120	27,2
hsEsp1	K20	1918-2120	23,3

Alle Fragmente der humanen Separase (K13, K20, K42, K44) wurden in *E.coli* als unlösliche Einschlusskörper exprimiert. Auch die Veränderung verschiedener Parameter wie Wachstumsbedingungen und Induktionzeitpunkt sowie die Verwendung verschiedener Expressionsstämme ergab stets aggregiertes und in Form von Einschlusskörpern abgelagertes Protein. Rückfaltungsversuche durch *rapid dilution* resultierten in ausschließlich aggregiertem Protein, das bereits in den stabilisierend wirkenden Argininpuffern präzipitierte. Der Versuch der Säulenrückfaltung, bei dem an der NiNTA-Säule gebundene Separase durch langsames Entfernen der denaturierenden Reagenzien zurückgefaltet werden sollte, lieferte keine korrekt gefaltete Separase. Dagegen konnten zwei N-terminale, die katalytische Domäne entaltende Fragmente (55 kDa und 100 kDa) des Enzyms in Insektenzellen löslich exprimiert und aufgereinigt werden (siehe Abbildung 5.1). Die Ausbeute war jedoch für kristallographische Untersuchungen zu gering und wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

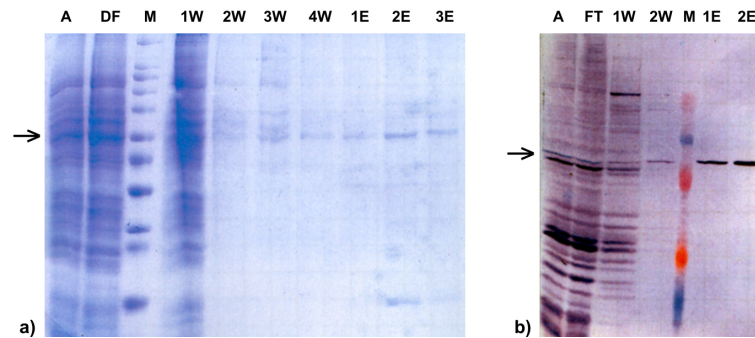


Abbildung 5.1: Aufreinigungsschritte der NiNTA-Aufreinigung der im Baculovirus-system exprimierten humanen Separase (55kDa Fragment). (a) Coomassiegeärbtes SDS-Polyacrylamidgel (b) Westernblot mit Antikörperfärbung durch Anti-His-tag Antikörper (Amersham Biosciences, Freiburg). M: Sigma Low Range Marker; RL: Rohlysat; DF: Durchlauf; 1W-4W: Waschschritte 1E-3E: Elutionen.

Humanes Securin wurde dagegen in *E. coli* in großen Mengen löslich exprimiert und konnte erfolgreich mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration aufgereinigt sowie biochemisch analysiert werden. Die Proteinexpression wurde bei 37°C in dem *E. coli* Stamm Rosetta DE3 durchgeführt. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte ($\lambda = 600 \text{ nm}$) von 0,8 durch Zugabe von 1 mM IPTG. Maximale Securinexpression wurde nach drei Stunden erreicht. Längere Expressionszeiten führten zu geringerer Securinausbeute, die sich möglicherweise durch den Abbau des Proteins erklären lässt. Die abzentrifugierten Zellen wurden durch eine Kombination aus Lysozym und mehrfachem Sonifizieren aufgeschlossen. Das im Rohlysat enthaltene Securin wurde durch eine NiNTA-Säule bei Raumtemperatur aufgereinigt. Dabei wurde das Rohlysat auf die mit Puffer A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol) äquilibrierte NiNTA-Säule aufgetragen und mit 10 % Puffer B (Puffer B: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 20 % Puffer B. Im abschließenden Reinigungsschritt wurde Securin nochmals durch Gelfiltration gereinigt (Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl; Superdex 200 XK26/60, Amersham Pharmacia). Expression und wichtige Aufreinigungsschritte sind in Abbildung 5.2 zusammengefasst. Der Vergleich der in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennten Proben von uninduziertem und induziertem *E.coli*-Lysat zeigt, dass eine starke Expressionsbande bei einem Molekulargewicht von ca. 28 kDa erscheint, die als Securin identifiziert werden konnte.

Die Elutionen der NiNTA-Reinigung und Gelfiltration bestätigen die Sauberkeit des Proteins. Durch *western blotting* wurde unter Verwendung eines monoklonalen anti-His Antikörpers (Amersham Pharmacia, Freiburg) und eines peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers (Sigma-Aldrich, München) bestätigt, dass es sich um das rekombinante His-tag Fusionsprotein handelt. Im Vergleich zum theoretisch mit dem Programm ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) berechneten Molekulargewicht von 22,5 kDa besitzt Securin auf dem 12%igen SDS-PAGE ein deutlich größeres Molekulargewicht von ca. 28 kDa.

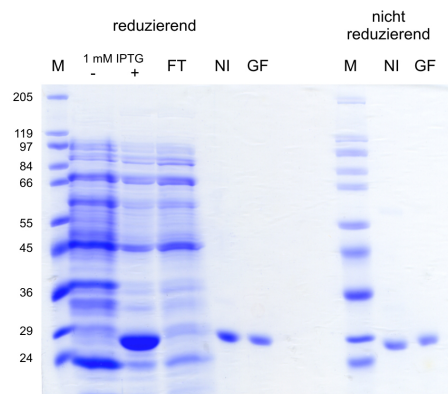


Abbildung 5.2: Expressions- und Aufreinigungsschritte des humanen Securins unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. M: Sigma Low Range Marker; „-“ vor Induktion; „+“ nach Induktion mit 1 mM IPTG; FT: Durchlauf der NiNTA-Säule; NI: Elution der NiNTA-Säule; GF: Elution der Gelfiltration.

5.2 Biochemische Arbeiten am humanen Securin

5.2.1 Analytische Gelfiltration

Anhand einer analytischen Gelfiltration am SMART System (Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl; Säule: Superdex 200, PC3.2) sollte das Molekulargewicht der biologischen Einheit bestimmt werden. Die biologische Einheit stellt das Makromolekül eines Proteins dar, welches unter nativen Bedingungen als aktiv oder funktionsfähig bezeichnet werden kann. Dies kann sowohl ein Monomer als auch ein Multimer sein. Für die Eichung der Gelfiltration wurde eine Mischung aus Referenzproteinen verwendet (Gel Filtration Standard, BioRad).

Die Gelfiltration der NiNTA-Elution bestätigte die Homogenität des Securins (siehe Abbildung 5.3a). Das Securin der NiNTA-Elution, welches sowohl in der nicht-reduzierenden als auch der reduzierenden SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 28 kDa besaß, eluierte auf der Gelfiltration nach ca. 18 min. Dies würde einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa entsprechen. Würde man von globulären Proteinen ausgehen, so könnte die biologische Einheit des Securins aus einem Tetramer mit einem Molekulargewicht von 90 kDa bestehen. Hier würde das Molekulargewicht des Monomers von 22,5 kDa mit dem theoretisch berechneten Molekulargewicht übereinstimmen. Die Größenbestimmung durch Gelfiltration kann jedoch einem starken Fehler unterliegen, da sowohl Interaktionen mit dem Säulenmaterial als auch der hydrodynamische Radius des Proteins eine wichtige Rolle spielen. Aus diesem Grund bestand die Möglichkeit, dass es sich bei diesem Protein nicht um ein Tetramer, sondern um ein Monomer mit einer nicht kompakten, sondern eher länglichen oder gar fehlenden Faltung handelt. Diese Möglichkeit erforderte weitere strukturelle Analysen (siehe Kapitel 5.3) und die Überprüfung der Stabilität des

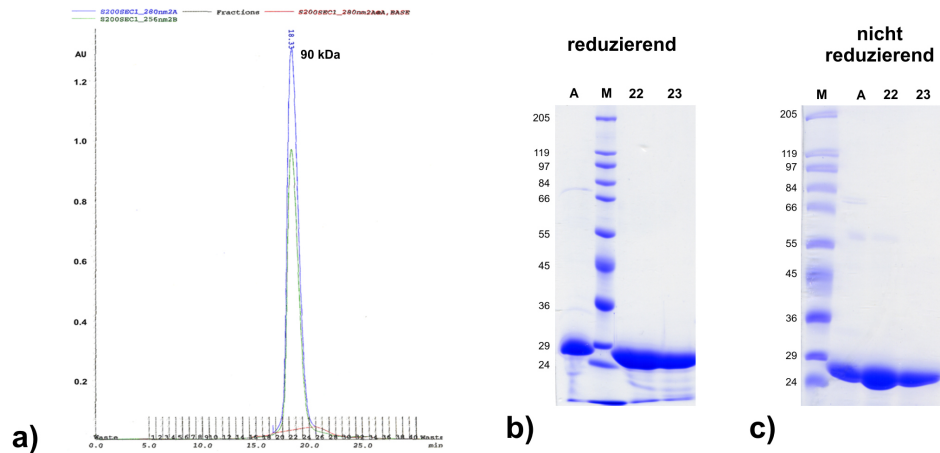


Abbildung 5.3: Gelfiltration (Superdex 200, PC3.2) und reduzierende bzw. nicht-reduzierende SDS-PAGE. (a) Gelfiltration der NiNTA-Elution. Die Fraktionen 22 und 23 wurden im (b)reduzierenden SDS-Gel und (c) nicht-reduzierenden SDS-Gel näher untersucht. Dazu wurden jeweils die Elution der NiNTA (A), ein Marker (M) und die Fraktionen 22 und 23 aufgetragen.

Securins, da nativ ungefaltete Proteine in der Regel eine größere Angriffsfläche für proteolytischen Abbau bieten (siehe Kapitel 5.2.3).

5.2.2 N-terminale Sequenzierung und Massenspektrometrie

Durch N-terminale Sequenzierung konnte die Sequenz „ALTIYVDKEN“ identifiziert werden, die dem korrekten N-Terminus des humanen Securins entspricht. Nachdem das Protein über die Affinität des C-terminalen His-tags mit NiNTA-Säulenmaterial aufgereinigt werden konnte, ist anzunehmen, dass das rekombinante Securin auch in voller Länge exprimiert wurde. Die Korrektheit der gesamten Aminosäuresequenz wurde durch Sequenzierung der Plasmid-DNA verifiziert. Die massenspektrometrische Analyse des Securins ergab ein Molekulargewicht von 22,96 kDa und wurde von Frau Elisabeth Weyher-Stingl durchgeführt (Max-Planck-Institut für Biochemie, Core Facility, Martinsried). Dies entspricht dem theoretisch berechneten Molekulargewicht des humanen Securins inclusive C-terminalen His-tags von ca. 22,5 kDa und steht klar im Widerspruch zum Molekulargewicht (28 kDa), das mittels SDS-PAGE abgeschätzt wurde.

5.2.3 Analyse der Stabilität

Die Stabilität des Proteins wurde durch SDS-PAGE und analytischer Gelfiltrationen am SMART-System nach zwei, drei und fünf Wochen untersucht. Es zeigte sich, dass Securin während dieser Zeit stark degradiert wurde. Nach fünf Wochen konnte kein Securin mehr

nachgewiesen werden. Um dieser Degradation entgegen zu wirken, wurden während der Proteinaufreinigung zusätzlich verschiedene Kombinationen von Inhibitoren (Aprotinin, EDTA, E-64, Pefabloc, Leupeptin, PMSF, Pepstatin) hinzugegeben. Dadurch konnte der Degradation jedoch nicht entgegengewirkt werden. Diese hohe Anfälligkeit für proteolytische Degradation könnte ebenfalls einen Hinweis auf ungefaltete Bereiche sein, die das Securin für Proteinasen leicht angreifbar machen.

5.3 Sekundärstrukturanalyse des Securins

Das Laufverhalten auf der Gelfiltrationssäule, die starke Anfälligkeit für Hydrolyse und die Diskrepanz im Molekulargewicht (Massenspektrometrische Analyse gegenüber SDS-PAGE und Gelfiltration) könnten ein Hinweis für ungefaltete Bereiche sein und erforderten deshalb Sekundärstrukturanalysen mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR) und Zirkulardichroismus (CD). Zusätzlich wurde mit Hilfe des Programmes JPred (Cuff *et al.*, 1998) die Sekundärstruktur theoretisch untersucht (siehe Abbildung 5.4). Wichtige Sequenzmotive sind die D-Box (RxxL-Box, AS 61-64) und KEN-Box (AS 9-11), die als Erkennungssequenz für die Ubiquitylierung an Lysin-Resten durch den APC/C dienen. Während die D-Box unter Securinen konserviert zu sein scheint, ist die KEN-Box in einigen Organismen nicht konserviert. KEN-Boxen wurden bisher beim Menschen, der Spalt- und Sprosshefe sowie bei *Drosophila melanogaster* gefunden. Die in *Mus musculus* oder *Rattus norvegicus* vorkommende Konsensussequenz KDN wird nicht vom APC/C^{Cdh1} erkannt (Zur und Brandeis, 2002).

Ein SH3-Bindungsbereich (*src-homology 3*) ist im C-terminalen Bereich des Securins zu finden, der aus zwei prolinhaltigen PxxP-Erkennungssequenzen besteht. Proteine, die die dazugehörigen SH3-Domänen besitzen, können über hydrophobe Wechselwirkungen mit Securin interagieren. Interaktionspartner sind jedoch bislang unbekannt.

Die Sekundärstrukturvorhersage des Programms JPred sagt vorher, dass über 70 % des Securins vermutlich als *random-coil* vorliegt. Die wenigen Sekundärstrukturelemente beschränken sich auf drei helikale Elemente im Bereich der Aminosäuren 59-72 (α I), 132-137 (α II) und 148-159 (α III) sowie zwei β -Faltblattstrukturen im Bereich der Aminosäuren 3-8 (β I) und 92-99 (β II). Die Zuverlässigkeit der Vorhersage der vorgeschlagenen α I- und β II-Sekundärstrukturen ist niedrig und das Vorhandensein dieser Strukturen somit nicht unbedingt gegeben (siehe Abbildung 5.4).

5.3.1 Zirkulardichroismus

CD-Untersuchungen nutzen die unterschiedliche Absorption von links- und rechts-zirkulär polarisiertem Licht, die bei einer optisch aktiven Substanz wie beispielsweise Protein auftritt. CD-Messungen zur Untersuchung der Sekundärstruktur werden im Absorptionsbereich der Peptidbindung (*far-UV*; 180-240 nm) durchgeführt und erlauben die Unterscheidung von α -Helix, β -Faltblatt oder ungefalteter *random-coil* Sekundärstruktur

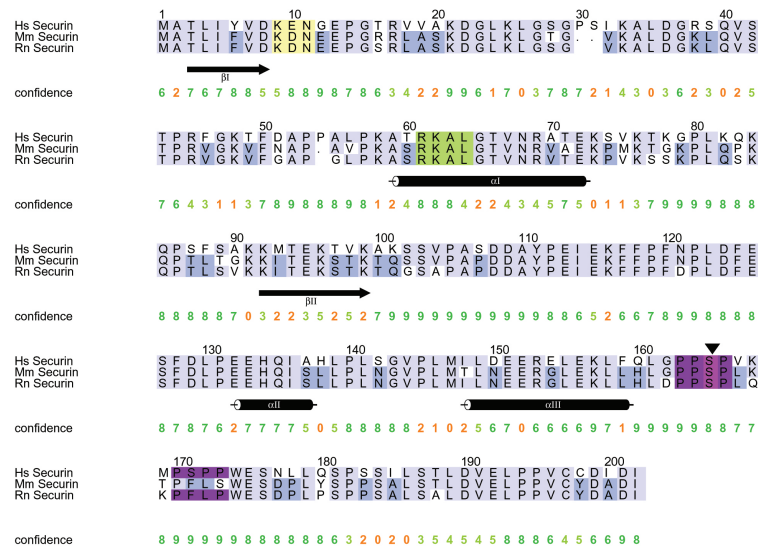


Abbildung 5.4: Aminosäuresequenzalignment des Securins aus *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus*. Die mit dem Programm JPred durchgeführte Sekundärstrukturvorhersage zeigt, dass Securin nur geringe Anteile an β -Faltblätter (Pfeile) und α -Helices (Zylinder) besitzt. Die Erkennungsmotive der KEN-Box und D-Box wurden gelb und grün dargestellt. Der prolinhaltige SH3-Bindungsereich (AA 163-173) wurde in Violett hervorgehoben und die Phosphorylierungsstelle am Ser165 durch einen zusätzlichen Pfeil markiert. Die „confidence“ beschreibt die Zuverlässigkeit der Vorhersage, wobei 0 eine niedrige und 9 eine hohe Zuverlässigkeit darstellt.

(siehe Abbildung 5.5). Das CD-Spektrum des humanen Securins besitzt ein Minimum bei 200 nm. Dies entspricht der unstrukturierten poly-L-Lysin-Polypeptidkette, die ebenfalls bei ca. 200 nm ein Minimum aufweist (Fandrich und Dobson, 2002). Unterschiede zum Spektrum der poly-L-Lysin-Polypeptidkette treten in Form einer geringen Depression im Bereich von 222 nm auf. Dies könnte auf geringe Anteile helikaler Strukturen hindeuten. Insgesamt besitzt humanes Securin laut der CD-Analyse keine definierte Sekundärstruktur, der größte Anteil des Proteins liegt als *random-coil* vor.

5.3.2 Kernresonanzspektroskopie

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde zusätzlich eine NMR-Analyse des humanen Securins durchgeführt. Das eindimensionale ^1H -NMR-Spektrum des humanen Securins wurde von Loyola d’Silva aus der Gruppe NMR-Spektroskopie von Dr. Tad Holak, Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) aufgenommen. Durch die Aufnahme eindimensionaler Spektren können Aussagen über die Faltung eines Proteins getroffen werden (Rehm *et al.*, 2002). Proteine mit großen *random-coil* Anteilen geben starke Signale im Bereich von 8,3 ppm. Diese Region ist charakteristisch für die Amide der Hauptkette, die sich in *random-coil* Regionen befinden. Ein weiteres Indiz für ungefaltete Proteine ist das Fehlen von Signalen im Bereich von -1,0 ppm bis +1,0 ppm. Zusätzlich weisen geordnete Strukturen im Gegensatz zu ungeordneten Strukturen Signale im Bereich von

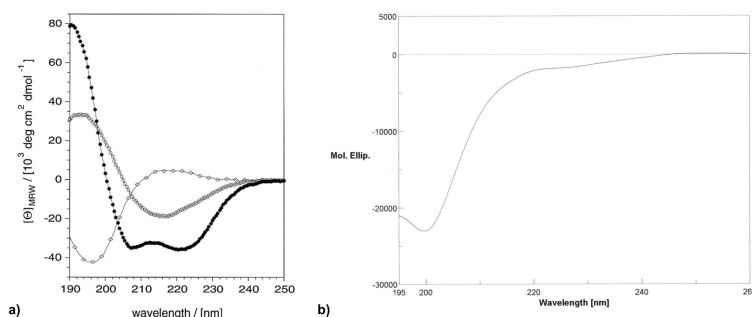


Abbildung 5.5: CD-Spektren verschiedener poly-L-Lysin-Konformationen und das CD-Spektrum des humanen Securins. (a) Verschiedene poly-L-Lysin-Konformationen bestehend aus α -Helices (gefüllte Kreise), β -Faltblättern (weiße Kreise) oder ungeordneten Strukturen (weiße Rauten) ergeben Spektren mit charakteristischen Minima. Die Abbildung wurde übernommen aus Faendrich *et al.*, (2002). (b) Das CD-Spektrum des humanen Securins weist ein Spektrum auf, das größtenteils der ungefalteten poly-L-Lysin Struktur entspricht. Die Depression im Bereich von 222 nm gibt einen Hinweis auf kleine α -helikale Anteile, die im Einklang mit der theoretisch vorhergesagten Sekundärstruktur stehen.

8,5-11 ppm auf. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des humanen Securins ist ein eindeutiges Beispiel für eine ungefaltete Struktur (siehe Abbildung 5.6). Im Bereich von 8,3 ppm tritt ein breites, starkes Signal auf. Keine Signale sind dagegen in den Bereichen von 8,5-11 ppm und -1,0-1,0 ppm vorhanden. Insgesamt ist die Anzahl der Signale im Vergleich zu gefalteten Proteinen deutlich reduziert. Im Hinblick auf die CD-Analyse und das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum handelt es sich bei dem in *E. coli* exprimierten humanen Securin um ein nativ ungefaltetes Protein.

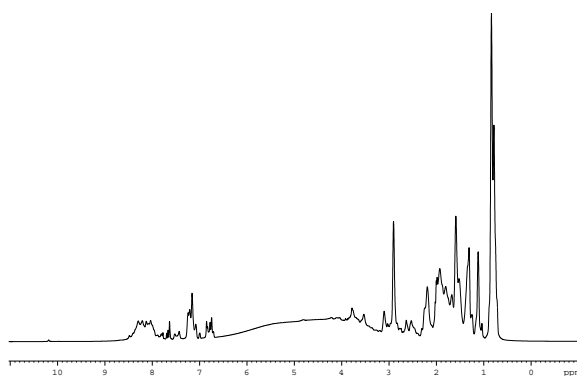


Abbildung 5.6: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des in *E. coli* exprimierten humanen Securins. Humanes Securin ist nativ ungefaltete, da im Bereich um 8,3 ppm ein breites, starkes Signal auftritt, das für die ungeordnete Konformation der Amide der Polypeptidhauptkette steht. Weiterhin sind keine Signale in den Bereichen von 8,5-11 ppm und -1,0-1,0 ppm vorhanden.

Kapitel 6

Diskussion - Humane α I-Tryptase Mutanten

Obwohl sich α - und β -Tryptasen nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden, konnten starke Unterschiede in ihrer katalytischen Aktivität und Tetramerstabilität nachgewiesen werden. Die rekombinante α I-Tryptase besitzt nach Aussage verschiedener Autoren wenig bzw. keine katalytische Aktivität (Huang *et al.*, 1999; Selwood *et al.*, 2002), ist jedoch im Gegensatz zur β -Tryptase ein äußerst stabiles Tetramer. Die β -Tryptase hydrolysiert verschiedene Substrate sehr effizient, zerfällt jedoch in Abwesenheit von Heparin oder bei niedrigem Salzgehalt zu Monomeren. Biochemische und strukturelle Untersuchungen führten zu der Vermutung, dass möglicherweise nicht-konservierte Aminosäuren in der näheren Umgebung des aktiven Zentrums und der Interfaceregion dafür verantwortlich sind. Asp216 und zu einem geringeren Anteil auch Lys192 spielen möglicherweise eine wichtige Rolle bei den katalytischen und strukturellen Eigenschaften der Tryptasen. Durch die Kristallstrukturen der leupeptininhibierten Mutanten rHT α G^I und rHT α QG^I konnte der Einfluss der beiden Aminosäuren auf die Konformation der Substratbindungsstelle näher untersucht werden. Zusätzlich wurden durch die Verwendung des Tripeptid-Inhibitors Leupeptin erstmals erweiterte Substratbindungsstellen beschrieben. Die Struktur der aktiven Mutante rHT α G zeigt eine enzymatisch aktive Tryptase, die ein freies aktives Zentrum aufweist.

6.1 Der Einfluss der Aminosäure Asp216 und Lys192 auf die Aktivität der Tryptase

Die beiden leupeptininhibierten Tryptase-Mutanten rHT α G^I und rHT α QG^I besitzen eine Substratbindungsstelle, die der Struktur des β II-Tryptase-APPA-Komplexes ähnelt. In der β -Tryptase liegt das 214-220-Segment, welches bei der Ausrichtung von Substraten und Bindung ans aktive Zentrum mitwirkt, als offene Konformation vor. Diese Konformation ist für enzymatisch aktive, trypsinartige Proteinasen charakteristisch. Die Oxyaniontasche wurde korrekt ausgebildet und der Carbonylsauerstoff des P1-Restes des In-

hibitoren Leupeptin bildet eine Wasserstoffbrücke mit His57 N ϵ^2 aus. Ein Vergleich der inhibitorgebundenen α I-Tryptase-Mutanten mit den Strukturen der α I- und β II-Tryptase zeigt, dass die Seitenkette des Asp216 die Ursache für die geschlossenen α -Konformation bei der α I-Tryptase ist. Sowohl abstoßende Kräfte zwischen den Carboxylatgruppen von Asp189 und Asp216 als auch anziehende Kräfte zwischen Asp216 und der Oxyaniontasche führen zur α -Konformation des 214-220-Segments bei α I-Tryptase. Durch Kristallisation sowohl der Einzel- als auch der Doppelmutante im Komplex mit Leupeptin wurde deutlich, dass die Aminosäure an Position 192 zwar nicht für die Konformation des 214-220-Segments verantwortlich ist, jedoch konnte gezeigt werden, dass Gln192 durch das Carboxamid N ϵ^2 eine Wasserstoffbrücke mit dem P2-Carbonylsauerstoff des Substrats ausbilden kann und somit dessen Bindung erleichtert (siehe Abbildung 4.6). Durch Positionierung und Fixierung des Substrates wird die zu spaltende Peptidbindung besser zum Ser195 der katalytischen Triade ausgerichtet. Diese vorteilhafte Funktion von Gln192 gegenüber peptidische Inhibitoren oder Substraten konnte bereits bei weiteren trypsinartigen Proteinase beobachtet werden. Die Thrombinmutante E192Q beispielsweise erhält so enzymatische Aktivität gegenüber bovinem Faktor X und kann durch das Serpin α I-Proteinase Inhibitor oder den bovinen pankreatischen Trypsininhibitor effizient inaktiviert werden (Le Bonniec und Esmon, 1991; Le Bonniec *et al.*, 1995; Guinto *et al.*, 1994; van de Locht *et al.*, 1997).

6.2 Flexibilität des Trypsasetetramers

Ein Vergleich der Monomer-Abstände von α I- und β II-Tryptase lässt keine großen Abweichungen erkennen. Im Gegensatz dazu ist jedoch der Abstand der Monomere A und D (bzw. B und C) bei den leupeptininhibierten Mutanten um bis zu 1,5 Å verringert. Der Grund liegt in der Konformationsänderung der beiden, im Interface lokalisierten 97-loops. Während die 97-loops in der α I- und der β II-Tryptase in Richtung His57, Asp102 und Trp215 weisen, ragen die 97-loops der leupeptininhibierten Mutanten ins benachbarte Monomer und bilden maßgeblich die S2- sowie S3-Bindungsgebiete aus. Durch die Bindung des Inhibitors Leupeptin ans aktive Zentrum wird Ile97 durch die Seitenkette des P2-Leucins verdrängt. Die neue Konformation der 97-loops ermöglicht die Annäherung der beiden Monomere und die Vergrößerung der Interaktionsfläche um bis zu 25 % (siehe Abbildung 6.1). Bildlich gesehen scheinen die benachbarten 97-loops bei den leupeptininhibierten Mutanten wie Hände in das Nachbar-Monomer zu ragen (siehe Abbildung 6.1; rechts). Auf atomarer Ebene kann eine Verschiebung weitreichende Folgen haben, wie beispielsweise zum Zerfall des Tetramers. Erstaunlicherweise scheint hier das Gegenteil der Fall zu sein und Leupeptin das Tetramer durch Umlagerung der 97-loops und Ausbildung neuer hydrophober Interaktionen sogar zu stabilisieren (Selwood *et al.*, 2005).

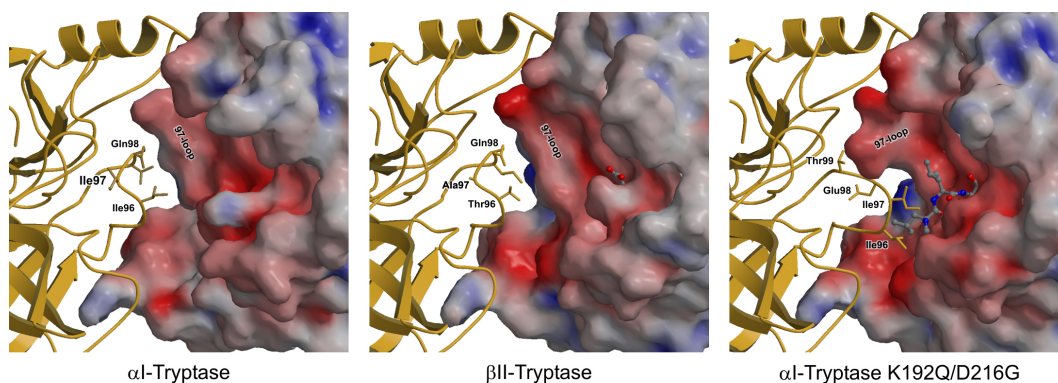


Abbildung 6.1: Vergleich der A-D-Interfaces von α I-Tryptase, β II-Tryptase und $rHT\alpha QG^I$. Monomer A wurde als Oberfläche, die Hauptkette des Monomers D wurde in gelb dargestellt. Ein Vergleich der drei Oberflächen zeigt die Konformationsänderung der 97-loops in $rHT\alpha QG^I$, durch die sich der Tetramerabstand verringert.

6.3 Beitrag des 97-Loops zur enzymatischen Aktivität

Wie von Selwood et al. (2002) gezeigt wurde, besitzt $rHT\alpha QG$ im Vergleich zur β II-Tryptase eine leicht reduzierte enzymatische Aktivität. Obwohl die Doppelmutante mit 4-Methylumbelliferyl-p-guanidino-benzoat (MUGB) reagiert, hydrolysiert es das kurze, nur den P1-Rest umfassende Substrat $N\alpha$ -Benzoyl-L-Arginin-p-Nitroanilid (BAPNA) nicht. Die β II-Tryptase dagegen spaltet dieses Substrat, wenn auch mit einem im Vergleich zu tripeptidischen Nitroaniliden 20-30-fach niedrigeren k_{cat}/K_m -Wert. Die Inaktivität gegenüber BAPNA könnte möglicherweise von den nicht-konservierten Aminosäuren (AA 96, 97 und 99) des S2-Bindungsbereichs resultieren, die in den α I-Tryptase-Mutanten beobachtet wurden. Große, hydrophobe Seitenketten können in der β II-Tryptase an den S2-Bindungsbereich binden. In der α I-Tryptase ist der S2-Bindungsbereich durch das Vorhandensein des hydrophoben Restes Ile97 (Alanin in β II-Tryptase) verkleinert. Die Leupeptinbindung induziert deshalb die konzertante Konformationsänderung der beiden 97-loops im A-D-Interface, wodurch ein neuer, nicht-kanonischer S2-Bindungsbereich erzeugt wird. Die Interaktion mit dem kleinen Substrat BAPNA ist möglicherweise nicht ausreichend, um diese Konformationsänderung der 97-loops zu induzieren, und somit können die untersuchten α I-Tryptase-Mutanten dieses Substrat nicht hydrolysieren. Das Einfügen der zusätzlichen Mutation Ile97Ala könnte bei der Doppelmutante $rHT\alpha QG^I$ die enzymatischen Eigenschaften, insbesondere bei Inhibitoren und Substraten mit großen P2-Resten, noch weiter in Richtung β II-Tryptase verschieben. Die Schaffung eines β -tryptaseartigen aktiven Zentrums innerhalb einer α I-Tryptase ist besonders geeignet für die strukturbasierte Entwicklung von Tryptaseinhibitoren, da sich gezeigt hat, dass die α I-Tryptase deutlich besser geordnete Kristalle bildet, die eine höhere Datenqualität liefern als die Kristalle der β II-Tryptase. Ein Grund liegt möglicherweise an Unterschieden in der Proteinoberfläche, welche bei der α I-Tryptase weniger positiv geladen zu sein scheint (Marquardt et al., 2002). Die eigentliche Ursache liegt höchst-

wahrscheinlich an der Glykosylierung, die sich aufgrund der Verwendung verschiedener Expressionssysteme (Insektenzellen gegenüber Tryptase aus humanem Lungengewebe) unterscheidet, und an der Tatsache, dass die β II-Tryptase im Gegensatz zur α I-Tryptase nur eine Glykosylierungsstelle besitzt.

6.4 Stabilitätsunterschiede zwischen α I- und β II-Tryptase

Die Strukturen der α I-Tryptase-Mutanten geben eine mögliche Erklärung für die Stabilitätsunterschiede, die zwischen α I- und β II-Tryptase beobachtet werden konnten (Selwood *et al.*, 2002). Das A-B-Interface der Wildtyp- α I-Tryptase und der α I-Tryptase-Mutanten weist hinsichtlich Größe und Interaktionen eine hohe Ähnlichkeit zum A-B-Interface von β II-Tryptase auf (Pereira *et al.*, 1998; Marquardt *et al.*, 2002). Die A-D-Interfaces von α I- und β II-Tryptase unterscheiden sich dagegen in den Sequenzen der zwei sich gegenüberstehenden 97-loops. In der α I-Tryptase erfolgt durch die Konformationsänderung des 214-220-Segments eine Verschiebung der gegenüberliegenden 173-loops und 60-loops. Im Hinblick auf die Größe des Interfaces und besonders auch auf die Packungsqualität (Bahadur *et al.*, 2003) ist der Beitrag dieser Unterschiede zur Stabilität bzw. Instabilität jedoch vermutlich relativ gering. Dagegen scheint der ungünstige elektrostatische Kontakt der Carboxylatgruppen von Asp60B* und Glu217 von größerer Bedeutung. Die beiden Carboxylatgruppen liegen in den leupeptingebundenen α I-Tryptase-Mutanten und der β II-Tryptase 3-4 Å voneinander entfernt. In der wesentlich stabileren α I-Tryptase liegt Glu217 aufgrund der geschlossenen Konformation des 214-220-Segments deutlich weiter entfernt vom Asp60B*. Zusätzlich wird die geschlossene Konformation der α I-Tryptase von einer neuen elektrostatischen Interaktion zwischen der Oxyaniontasche und Asp216 begleitet, welche das Tetramer durch Stabilisierung des aktiven Zentrums vor der Dissoziation schützt und der Wirkung eines stabilisierenden Inhibitors wie APPA entspricht. Die indirekte Proportionalität von enzymatischer Aktivität und Tetramerstabilität korreliert mit der Konformation des 214-220-Segments, da es sowohl die enzymatische Aktivität als auch die elektrostatischen Interaktionen mit dem benachbarten Monomer beeinflusst. Den größten Beitrag zur Stabilität werden durch die oben genannten Effekte geleistet, jedoch hängt die Stabilität im Endeffekt von der Summe aller intra- und intermolekularen Wechselwirkungen ab, welche sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Effekte haben können.

Die im A-D-Interface benachbarten 97-loops der α I- und β II-Tryptase beherbergen drei nicht-konservierte Aminosäuren an den Positionen 96, 97 und 99. In β II-Tryptase bilden Thr96, Gln98 und Ile99 zusammen mit den Aminosäuren Gln98*, Thr96*, Ile99* des benachbarten Monomers den zentralen Bereich dieses Interfaces. In α I-Tryptase ist in diesem Bereich die Konformation der Hauptkette zu der von β II-Tryptase zwar identisch, jedoch wurden die Aminosäuren an den Positionen 96 und 99 durch Isoleucin und Threonin ersetzt, wodurch sich der Kontaktbereich geringfügig verändert hat. Die Stabilität des Tetramers scheint sich durch diese Konformationsänderung zu erhöhen, da die Einzelmutante ohne gebundenem Inhibitor bei niedriger Salzkonzentration zerfällt, während die gleiche Mutante mit gebundenem Inhibitor unter dieser Bedingung stabil ist.

6.5 Flexibilität des 214-220-Segments

Anhand der Kristallstruktur der enzymatisch aktiven Einzelmutante rHT α G konnte erstmals das aktive Zentrum einer enzymatisch aktiven Tryptase ohne gebundenen Inhibitor untersucht werden. Im Bereich der S1-Tasche konnte die gleichzeitige Präsenz von zwei Konformationen des 214-220-Segments beobachtet werden; die offene β -Konformation, die bisher auch bei den inhibitorgebundenen Tryptasen (β II-Tryptase, rHT α QG^I und rHT α G^I) gefunden wurde und die geschlossene α -Konformation, die das Segment in α I-Tryptase einnimmt. Dieses Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener Konformation zeigt, dass das 214-220-Segment, welches den Substratbindungsbereich und einen Teil der S1-Tasche ausbildet, flexibel ist und bei dieser α I-Tryptase-Mutante die Fähigkeit besitzt, zwischen den beiden Konformationen hin und her zu wechseln. Inwiefern diese alternativen Konformationen bei nicht-inhibierter β II-Tryptase vorhanden sind, bleibt unklar, da aufgrund der hohen Tetramerinstabilität die Kristallisation ohne die stabilisierende Wirkung eines Inhibitors höchstwahrscheinlich nicht möglich ist. Wie die Struktur der leupeptingebundenen Einzelmutante rHT α G^I zeigt, stabilisiert die Bindung von Leupeptin das 214-220-Segment und zwingt es in die offene Konformation. In der β II-Tryptase ist die offene Konformation die energetisch günstigere und wird deshalb gegenüber der geschlossenen Konformation bevorzugt. In der α I-Tryptase ist durch die Mutation Gly \rightarrow Asp dagegen die geschlossene Konformation die energetisch günstigere. Die enzymatische Aktivität der Tryptasen würde dann von zwei Faktoren abhängen: (1) Von den konformationsbestimmenden Aminosäuren an den Positionen 216, 192 sowie weitere Reste im näheren Umfeld des aktiven Zentrums und (2) dem Substrat selbst, welches mehr oder weniger gut die offene Konformation erzwingen und/oder stabilisieren kann.

6.6 Ist native α I-Tryptase enzymatisch aktiv?

Bisher konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die reife α I-Tryptase enzymatische Aktivität gegenüber sehr stark bindenden Substraten aufweist (Huang *et al.*, 1999; Selwood *et al.*, 2002). Ausgehend von der Annahme, dass sich das 214-220-Segment der nativen α I-Tryptase in einem Gleichgewicht von offener und geschlossener Konformation befindet, könnte die enzymatische Spaltung nur durch Bindung von Substraten an die α I-Tryptase mit offener Konformation erfolgen (Gleichgewichtsmodell). Eine andere Möglichkeit ist dagegen das Erzwingen der offenen Konformation während der Bindung des Substrats an das katalytische Ser195 (Induced-fit-Modell). Jedoch erfordert die Stabilisierung der „aktiven“ Konformation Energie und erniedrigt so gleichzeitig die enzymatische Aktivität der Tryptase. Auch bei Trypsin ist die Stabilität des aktiven Zentrums eine sehr wichtige Komponente und beeinflusst stark die enzymatische Aktivität (Pasternak *et al.*, 2001).

Kofaktor- oder substratregulierte trypsinartige Serinproteinasen mit sehr niedriger enzymatischer Aktivität wurden bereits identifiziert und zeigten, dass die Aktivierung dieser Proteinase durch verschiedene Mechanismen erfolgen kann, wie bei der ligan-deninduzierten Aktivierung von Trypsinogen (Bode und Huber, 1976) oder der kofaktorinduzierten Aktivierung von Prothrombin durch Staphylocoagulase (Friedrich *et al.*, 2003). Die Regulation von Proteinase durch Verbergen des aktiven Zentrums, im Englischen als *cryptic active site* bezeichnet, konnte bei einer Vielzahl von trypsinartigen Serinproteinasen aufgezeigt werden. Die aktiven Zentren der nachfolgenden Beispiele wurden in den Abbildungen 6.3 und 6.4 am Ende dieses Kapitels dargestellt.

Beim Gerinnungsfaktor IXa verhindert Tyr99 die Substratbindung, da die Hydroxylgruppe den Platz des P2-Restes einnimmt (Brandstetter *et al.*, 1995; Sichler *et al.*, 2003). Die Substratbindung erfordert in diesem Fall die Ausbildung der S2- und S4-Tasche durch die Konformationsänderung des 99-loops (homolog zum 97-loop der Tryptase). Ein anderer Mechanismus liegt bei den HtrA-artigen Serinproteinasen wie beispielsweise DegP vor (Krojer *et al.*, 2002). Bei diesen Proteinase ist das aktive Zentrum durch loop-Regionen verdeckt (siehe Abbildung 6.3a). Die volle enzymatische Aktivität besitzen diese Proteinase bei höheren Temperaturen, welche die Konformationsänderung der loops erleichtern. Eine andere Deformation des aktiven Zentrums konnte bei dem Komplementfaktor B gefunden werden (Ponnuraj *et al.*, 2004). Nachdem die trypsinartige Serinproteinasedomäne nur ein Teil dieses Faktors darstellt, existiert die Salzbrücke zwischen dem N-Terminus und Asp194 nicht. Die Oxyaniontasche kann dadurch nicht korrekt ausgebildet werden, und der Eingang zur S1-Tasche ist durch Arg192 versperrt (siehe Abbildung 6.3b). Es konnten jedoch auch eine Reihe trypsinartiger Serinproteinasen mit sehr hoher Substratspezifität bzw. niedriger enzymatischer Aktivität gefunden werden, die ein der α I-Tryptase ähnlich deformiertes 214-220-Segment besitzen. Komplementfaktor D hat ebenfalls ein verschobenes 214-220-Segment, das in diesem Fall als „*self-inhibitory loop*“ oder *214-228-loop* bezeichnet wird (siehe Abbildung 6.3c). Dieser deformierte loop ist möglicherweise auch für die nach außen gedrehte Konformation des His57 verantwortlich (Jing *et al.*, 1998). Ähnliches gilt für Granzym K, bei dem angenommen wird, dass das 214-220-Segment auch im reifen Enzym deformiert ist und dass es die korrekte Konformation erst bei der Substratbindung einnehmen kann (Hink-Schauer *et al.*, 2002). *Horse prostate kallikrein* (HPK) und *hepatocyte growth factor activator* (HGFA) sind weitere Beispiele für Mitglieder dieser Gruppe (Carvalho *et al.*, 2002; Shia *et al.*, 2005). Bei beiden Enzymen sind die Substratbindungsstellen aufgrund der Konformation des 97-loops stark deformiert (siehe Abbildung 6.4b,c). Bei HGFA ähnelt die Konformation des 214-220-Segments sehr stark der offenen Konformation, die bei α I-Tryptase gefunden wurde. Jedoch liegt bei HGFA der Grund in der Konformation des 97-loops und der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen Trp215 $N^{\epsilon 1}$ und Ser99 O^{γ} .

Die genannten Proteinase zeichnen sich alle durch funktionsuntüchtige Substratbindungsstellen aus, welche Substrat nur binden und hydrolysieren kann, wenn sich dieser Bereich dem Substrat anpasst. Diese Gruppe von Enzymen haben eine sehr hohe Substratspezifität und zeigen maximale enzymatische Aktivität gegenüber makromole-

kularen Substraten. Der Vorteil dieser substratinduzierten Aktivität liegt in der hohen Spezifität und der Inaktivität gegenüber kleinen Peptiden. Auch die Inhibition durch makromolekulare Inhibitoren ist aufgrund der hohen Selektivität nicht unbedingt erforderlich.

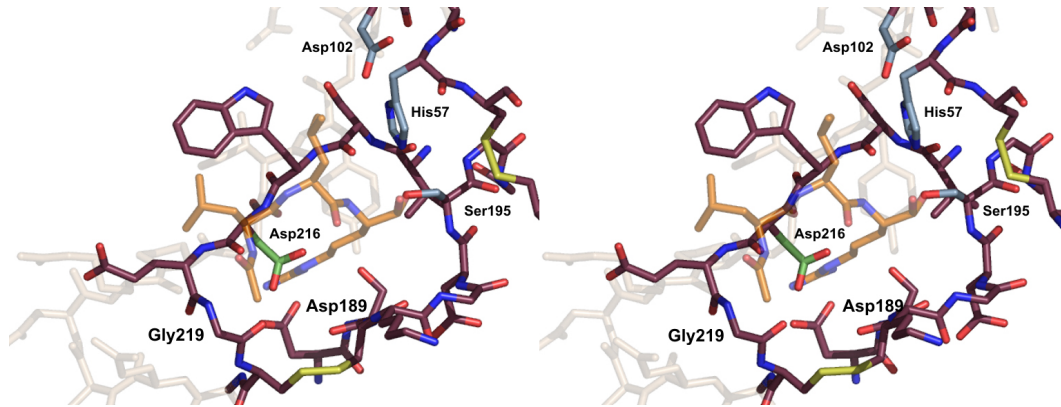


Abbildung 6.2: Theoretisches Modell des aktiven Zentrums der Wildtyp- α I-Tryptase in der offenen β -Konformation als Stereoabbildung. Asp216 (hellgrün) versperrt die S1-Tasche, so dass für die Bindung eines Substrats oder Inhibitors mit Arginin oder Lysin als P1-Rest (hier Leupeptin; orange) größere Konformationsänderungen im Bereich der S1-Tasche notwendig wären. Die katalytische Triade wurden blau hervorgehoben.

Obwohl es durchaus vorstellbar ist, dass die α I-Tryptase ihre enzymatische Aktivität durch einen substratinduzierten Mechanismus gewinnt, sollte man im Auge behalten, dass die α I-Tryptase nicht nur ein deformiertes 214-220-Segment besitzt. Die Seitenkette von Asp216 ist durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit Gly193 und Ser195 in der Oxyaniontasche „gefangen“. Aus diesem Grund müssten während einer Substratbindung zusätzlich diese ionischen Wechselwirkungen aufgebrochen werden, was mit hohen energetischen Kosten verbunden ist. Die Frage, wo sich das Asp216 während der Substratbindung befindet, bleibt offen. Die Modellierung des Aspartats in die offene Konformation zeigt, dass die Seitenkette nicht die *gauche*(+)-Konformation (mit χ_1 annähernd 60°) einnehmen kann, da es zwischen Trp215 und Val227 mit dem C-terminalen *barrel* kollidieren würde. Somit würde die Seitenkette aller Wahrscheinlichkeit nach die *gauche*(-)-Konformation einnehmen und zu einem gewissen Anteil in die S1-Tasche zwischen die Aminosäuren Asp189 und Gly219 hineinreichen (siehe Abbildung 6.2). Im Enzym-Substrat-Komplex würde zusätzlich der große P1-Rest (Lysin oder Arginin) in die S1-Tasche inserieren und zu einer „Überfüllung“ der S1-Tasche führen. Es ist durchaus möglich, dass Aminosäuren, welche die S1-Tasche umgeben, dem P1-Rest ausweichen und die Koexistenz von Asp216 und der P1-Aminosäure erlauben, was jedoch ebenfalls nur unter hohem energetischen Aufwand möglich wäre. Auf der anderen Seite wäre es denkbar, dass sich durch Asp216 die Substratspezifität ändert, und die α I-Tryptase im Gegensatz zur β II-Tryptase kleine P1-Reste wie Glycin oder Alanin bevorzugt. Untersuchungen von Mutationen an der Position 216 des Trypsins der Ratte

zeigen, dass die Mutation Gly216Ala eine 40-90-fache Verringerung der enzymatischen Aktivität gegenüber Substraten mit P1-Arginin oder P1-Lysin bewirkt (Craik *et al.*, 1985; Perona und Craik, 1995). Bei der α I-Tryptase konnte bisher jedoch kein Substrat gefunden werden, das effektiv gespalten wird. Die Existenz einer physiologischen Funktion konnte für die α I-Tryptase bisher nicht gezeigt werden. Ein Indiz für eine fehlende Funktion der α I-Tryptase ist jedoch zum Einen die Unklarheit über die Prozessierung der α I-Tryptase zum reifen Enzym und zum Anderen das Fehlen des α I-Tryptase-Gens bei $\sim 30\%$ der Bevölkerung (Sakai *et al.*, 1996; Soto *et al.*, 2002). Dabei muss angemerkt werden, dass bisher nicht untersucht wurde, inwieweit die α I-Tryptase-Defizienz bei der Anfälligkeit für allergische Erkrankungen eine Rolle spielt. Sollte sich herausstellen, dass die α I-Tryptase keine relevante enzymatische Aktivität besitzt, so könnte sie gleichzeitig eine schützende Rolle bei allergischen Erkrankungen spielen, indem sie durch ihre bloße Anwesenheit das β -Tryptase-Gen vom Genlocus verdrängt und dadurch den β -Tryptase-Level, welcher für allergische Reaktionen verantwortlich ist, senkt.

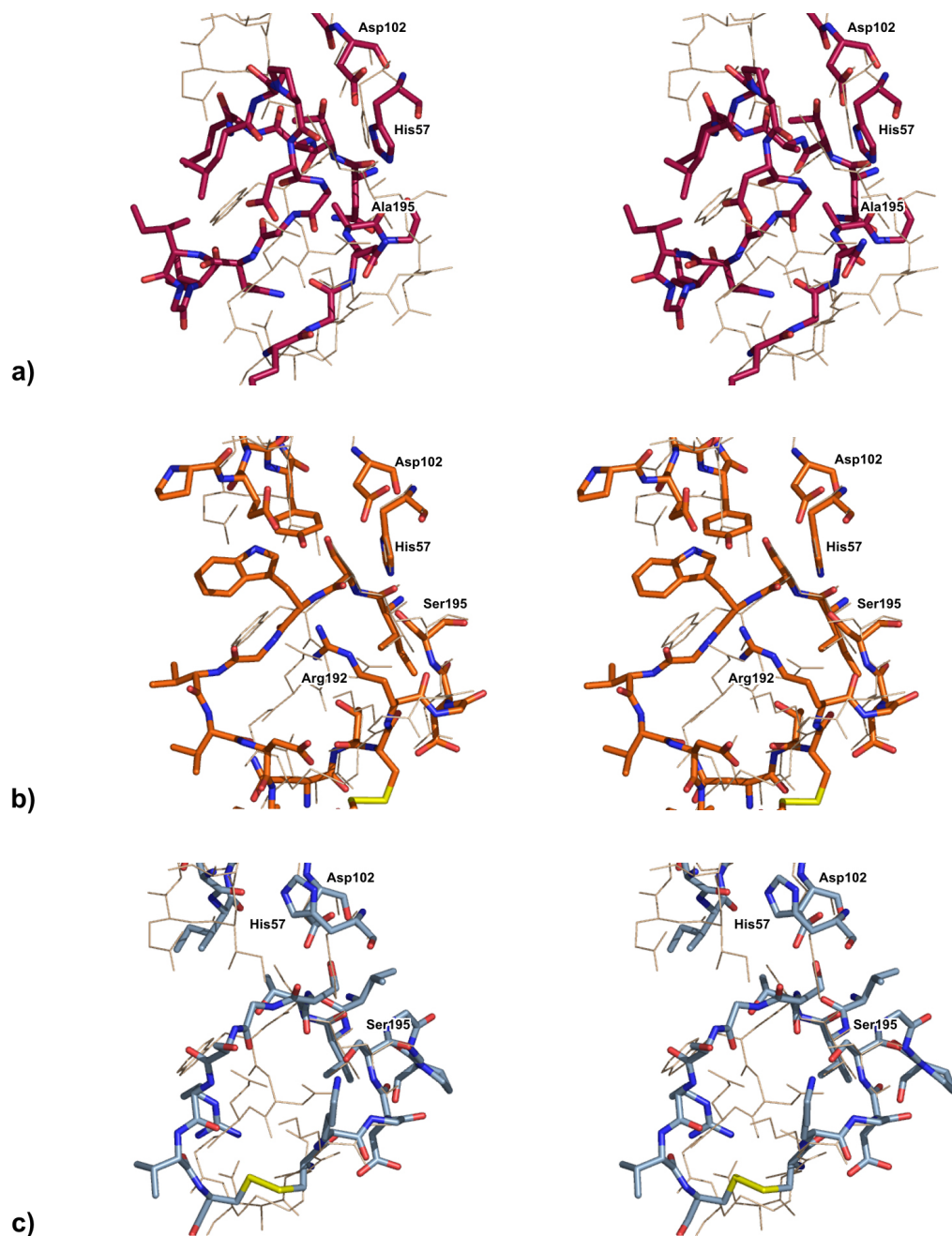


Abbildung 6.3: Substratbindungsstellen von deformierten, trypsinartigen Serinproteinasen in Standardorientierung und gleichzeitiger Überlagerung mit α I-Tryptase (dünne Linien). (a) Die Substratbindungsstelle der Chaperon-Proteinase DegP ist durch die „loop“-Triade LA*-L1-L2 blockiert. (b) Arg192 versperrt bei Komplementfaktor B den Eingang zur Oxyaniontasche. (c) Der *self-inhibitory loop* bei Komplementfaktor D zwingt His57 in eine für trypsinartige Serinproteinasen unnatürliche Konformation.

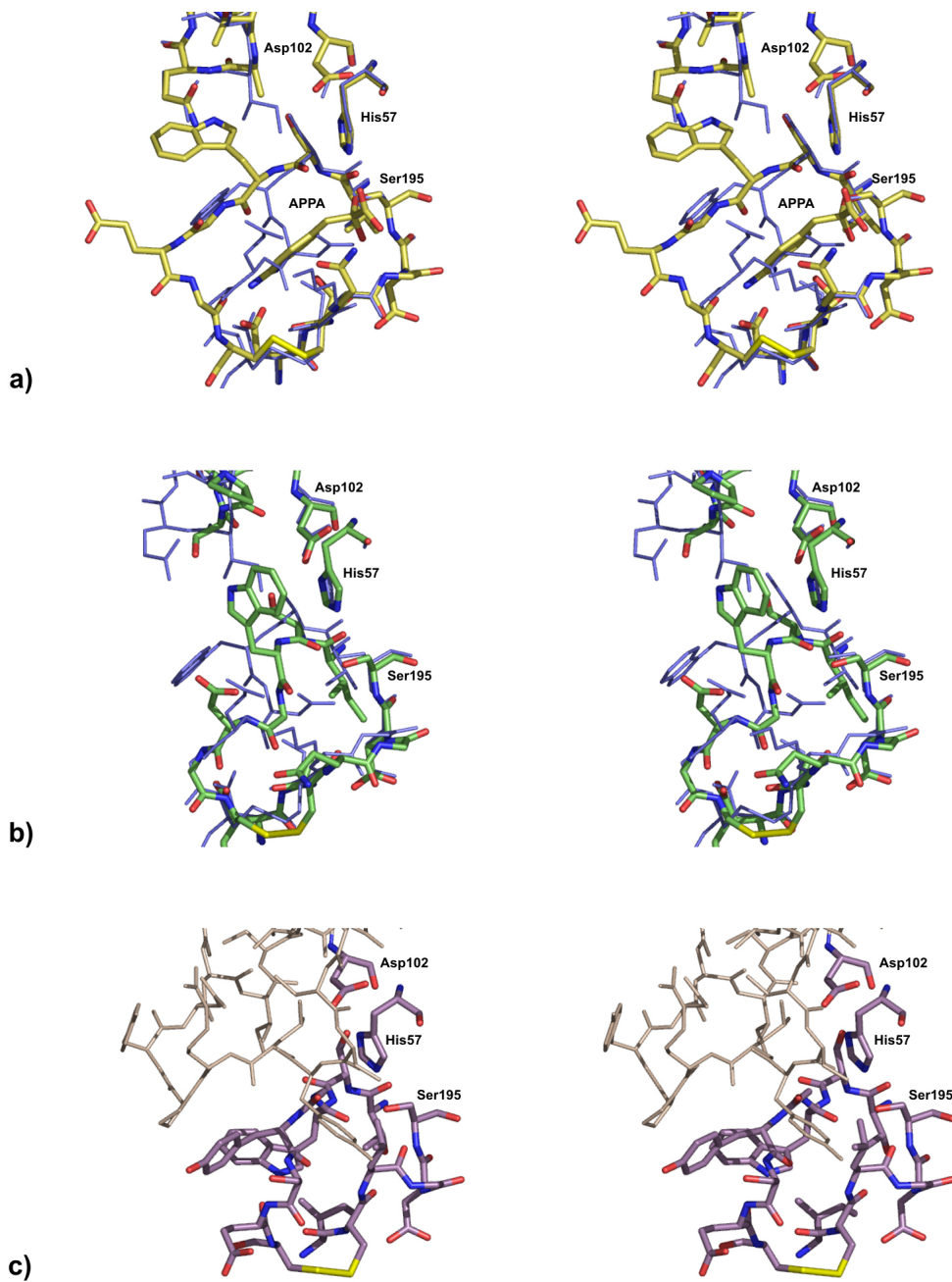


Abbildung 6.4: Substratbindungsstellen von deformierten, trypsinartigen Serinproteinasen in Standardorientierung und gleichzeitiger Überlagerung mit α I-Tryptase (blaues Modell). (a) Überlagerung von APPA-gebundener β II-Tryptase (gelb) und α I-Tryptase (blau). (b) Das 214-220-Segment in HGFA besitzt eine der α I-Tryptase nahezu identische Konformation. (c) HPK wurde aufgrund der Übersichtlichkeit nicht mit α I-Tryptase überlagert. Insertionen von Aminosäuren im 214-220-Segment und im Kallikrein-loop (97-loop) versperren den Eingang zur Oxyaniontasche.

Kapitel 7

Diskussion - Humanes Securin

7.1 Securin - ein nativ ungefaltetes Protein

Humanes Securin konnte erfolgreich in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Analysen des humanen Securins zeigten übereinstimmend, dass es sich um ein Protein handelt, das im nativen Zustand keine oder nur geringe Anteile an Sekundärstruktur besitzt. Der Verlauf des CD-Spektrums mit einem ausgeprägten Minimum bei 200 nm weist große Ähnlichkeit zu CD-Spektren ungefalteter Proteine auf. α -Helikale Strukturen haben dagegen Minima im Bereich von 208 nm bzw. 222 nm, β -Faltblätter im Bereich von 217 nm. Die schwach ausgeprägte Depression bei ca. 222 nm könnte von geringen Anteilen an Sekundärstruktur - möglicherweise α -helikaler Natur - rühren. Dies entspricht auch der Sekundärstrukturanalyse (JPred), welche mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Bereichen der Aminosäuren 60-64, 133-137 und 149-158 α -Helices vorhersagt.

Im Einklang mit der CD-Analyse zeigt auch das ¹H-NMR-Spektrum, dass es sich bei humanem Securin um ein überwiegend ungefaltetes Protein handelt. Die Protonenresonanzen sind auf enge Bereiche konzentriert und nicht, wie bei gefalteten Proteinen, auf breitere Bereiche verteilt. Die starke Resonanz bei 8,3 ppm und das Fehlen jeglicher Signale in den Bereichen -1,0-1,0 ppm und 8,5-11 ppm sind weitere Anzeichen für das Überwiegen von *random-coil*-Bereichen.

Diese beiden Spektren erklären auch das Laufverhalten des Securins auf der Gelfiltration und die starken Unterschiede bei der Molekulargewichtsbestimmung. Die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration wird üblicherweise mit Hilfe einer Mischung aus gefalteten, globulären Referenzproteinen durchgeführt und ist stark vom hydrodynamischen Radius (Stokes Radius) des Proteins abhängig. Bei ungefalteten, nicht-globulären Proteinen führt das hydrodynamische Verhalten zur falschen Größenbestimmung, was um mehr als acht Mal höhere Werte ergeben kann (Batra-Safferling *et al.*, 2006; Sanchez-Puig *et al.*, 2005).

Wie die Sekundärstrukturvorhersage mit dem Programm JPred zeigt, liegen vermutlich über 70 % des Securins als *random-coil* vor. Im ersten α -helikalen Bereich (α I; AA 59-72) befindet sich auch die *destruction box* (D-Box), welche die Ubiquitinylierung des

Securins durch den *anaphase promoting complex* (APC/C^{Cdc20}) ermöglicht, wobei die Zuverlässigkeit dieser Vorhersage relativ niedrig ist und die Helix möglicherweise deutlich kürzer ist als vorhergesagt. Diese Ubiquitinylierung von Lysinen führt zum Abbau des Securins durch das Proteasom. Neben der D-Box besitzt das Securin eine N-terminale KEN-Box im Bereich der Aminosäuren 9-11. KEN-Boxen werden bevorzugt vom APC/C^{Cdh1}-Komplex erkannt. Inwiefern die KEN-Box einen Einfluss auf die Securin-degradation hat, ist nicht bekannt. Der prolinreiche Bereich von AA 163-173 wird als SH3-Bindungsgebiet vorhergesagt. SH3-Bindungsgebiete (*src homology 3 domains*) sind kleine, hochkonservierte Protein-Protein-Interaktionsbereiche, die bereits bei einer Vielzahl eukaryontischer Proteine gefunden wurden. In Eukaryonten spielen der SH3-Bindungsgebiet und die beim Bindungspartner vorhandene SH3-Domäne eine wichtige Rolle bei Zellteilung, Apoptose, Veränderungen im Aufbau des Zytoskeletts und bei Vorgängen der Signaltransduktion. Die prolinreiche Sequenz des SH3-Bindungsgebietes besteht aus zwei PxxP-Motiven, welche die Geometrie einer Poly-Prolin-Helix Typ II annehmen und die hydrophobe Interaktion mit SH3-Domänen ermöglichen (Tong *et al.*, 2004). Das erste PxxP-Motiv besitzt zusätzlich eine Phosphorylierungsstelle am Ser195 (SPxK), die in der Hefe die Affinität des Securins bezüglich Bindung und Inhibition der Separase erhöht und die Separase zum eigentlichen Wirkungsort im Nukleus leitet (Agarwal und Cohen-Fix, 2002). Das zweite PxxP-Motiv ist dagegen nicht konserviert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den von Sanchez-Puig *et al.* (2005), erst nach Durchführung der hier beschriebenen Arbeiten, publizierten Ergebnissen. Die Autoren stellten fest, dass die hydrodynamischen Eigenschaften, die mittels Gelfiltration und analytischer Ultrazentrifugation bestimmt wurden, dem eines gestreckten, monomeren Proteins entsprechen. Die Spektren der NMR- und CD-Analyse zeigten ebenfalls, dass es sich bei humanem Securin um ein zu großen Teilen nativ ungefaltetes Protein handelt.

7.2 Die Familie der nativ ungefalteten Proteine

Der Begriff „nativ ungefaltet“ wurde ursprünglich eingeführt, um das Verhalten des Tau-Proteins zu beschreiben (Schweers *et al.*, 1994), das wie eine Reihe weiterer ungefalteter Proteine bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Im Gegensatz zu flexiblen Proteinen, die gefaltete Domänen und flexible Verbindungsregionen aufweisen, sind nativ ungefaltete Proteine arm an Sekundärstruktur, extrem flexibel und nicht globulär, sondern vielmehr ausgestreckt (Uversky, 2002). Oftmals werden sehr flexible Proteine aufgrund ihres Verhaltens fälschlicherweise als nativ ungefaltet bezeichnet wie beispielsweise das Manganese-stabilisierende-Protein (Lydakis-Simantiris *et al.*, 1999). Securin gehört wohl eindeutig der Gruppe nativ ungefalteter Proteine an, da alle durchgeführten Analysen, biochemischer wie bioinformatischer Art, gegen ein sekundärstrukturhaltiges Polypeptid mit flexiblen Verbindungsbereichen sprechen, sondern vielmehr für unstrukturierte Bereiche mit extrem wenig Sekundärstrukturelementen. Die Frage drängt sich auf, welche Rolle nativ ungefaltete Proteine in der Zelle spielen, zumal immer mehr Proteine dieser Gruppe zugeordnet werden.

Wright und Dyson haben in ihrem Artikel das Struktur-Funktion-Paradigma in Frage gestellt, indem sie davon ausgehen, dass eine Vielzahl von Proteinen oder Proteindomänen trotz fehlender Proteinstruktur physiologische Funktionen ausüben (Wright und Dyson, 1999). Es hat sich herausgestellt, dass physiologisch relevante Proteine in verschiedenen Formen existieren können, die als *globular*, *molten globular*, *premolten globule* und *unfolded* bzw. *random coil* bezeichnet werden (Uversky, 2002). Innerhalb der letzten 10 Jahre ist die Anzahl nativ ungefalteter Proteine und auch das Interesse an Ursache, Funktion und Konsequenzen exponentiell gestiegen. Das wohl größte Aufsehen erregen ungefaltete Proteine, die im menschlichen Gehirn abgelagert werden und zu einer Reihe neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimerschen Krankheit (Tau-Protein) oder Parkinsonschen Krankheit (α -Synuclein) führen (Schweers *et al.*, 1994; Tu *et al.*, 1998). Generell spielen nativ ungefaltete Proteine eine wichtige, wenn nicht sogar Schlüsselrollen im Bereich Signaltransduktion, Zellzykluskontrolle sowie der Regulation von Transkription und Translation (Wright und Dyson, 1999). Ein dabei wohl entscheidender Vorteil nativ ungefalteter Proteine ist die schnelle Degradation und die flexibilitätsbedingte Fähigkeit zur Interaktion mit verschiedenen Bindungspartnern. Nativ ungefaltete Proteine treten vermehrt in höheren Organismen und dort bei nicht-*housekeeping*-Genen bzw. nur in seltenen Fällen bei Proteinen mit katalytischer Funktion auf. Möglicherweise führte die Notwendigkeit der Ausbildung komplexer Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktionen in höheren Organismen zur Expression nativ ungefalteter Proteine mit diversen teilweise bis hin zur Pathogenität reichenden Aufgaben (Fink, 2005). Der Anteil ungefalteter, eukaryontischer Proteine oder Proteindomänen ist mit über 30 % erstaunlich hoch, wobei für die Berechnung nur Bereiche mit mehr als 50 Aminosäuren verwendet wurden (Vucetic *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2004).

Securin passt sehr gut in diese Gruppe. Es ist ein sogenanntes nicht-*housekeeping*-Gen, das mehrere Funktionen ausübt, wie im Zellzyklus über die Inhibition der Separase und bei der Entstehung verschiedener Krebsarten, über einen nicht genau bekannten Mechanismus. Weiterhin kann durch die nativ ungefaltete Struktur freies Securin schnell degradiert und dadurch auch in seinem Lebenszyklus streng kontrolliert werden. Beispielsweise kann das nativ ungefaltete Protein Tau sogar ohne vorherige Ubiquitylierung durch das Proteasom degradiert werden (David *et al.*, 2002). Die Notwendigkeit der Ubiquitylierung für die Degradation wurde bei Securin noch nicht näher untersucht. Erste Versuche, nativ ungefaltete Proteine in Gruppen einzuteilen, zeigten, dass es sich möglicherweise um drei Gruppen handelt, die jeweils mit DNA/RNA, Membranen oder anderen Proteinen interagieren (Fink, 2005). Securin gehört jedoch möglicherweise sowohl der Gruppe proteininteragierender als auch DNA-interagierender Proteine. Während Securin einerseits als Transkriptionsfaktor - möglicherweise über die Interaktion mit dem *c-myc*-Gen - wirkt, kann es andererseits mit Separase interagieren und diese inhibieren. Gleichzeitig reduziert die Bindung an Separase auch die Angreifbarkeit des Securins für Degradation. Dieser Protein-abhängige Mechanismus konnte bereits bei p21, einem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk2 (Kriwacki *et al.*, 1996), beobachtet werden, bei dem die N-terminalen Bereiche, die für die Inhibition verantwortlich

sind, keine Faltung besitzen. p21 nimmt seine geordnete Struktur nur bei der Bindung an Cdk2 an (Zhang und Matthews, 1998). Der Vorteil des Fehlens einer spezifischen Faltung befähigt p21 zur Bindung und Inhibition verschiedener Cdk-Cyclin-Komplexe wie CyclinA-Cdk2, CyclinE-Cdk2 oder CyclinD-Cdk4 (Sherr und Roberts, 1999). Weitere Beispiele für nativ ungefaltete Proteine sind der N-Terminus von p53 (Dawson *et al.*, 2003), der Calpaininhibitor Calpastatin (Mucsi *et al.*, 2003) oder der endogene Inhibitor IA(3) der Aspartylprotease A aus der Hefe (Li *et al.*, 2000).

7.3 Chaperonfunktion des Securins

Der molekulare Mechanismus der Chaperonfunktion des Securins ist nicht bekannt, es wurde jedoch berichtet, dass Securin für die korrekte Faltung der Separase notwendig sei (Ciosk *et al.*, 1998; Uhlmann *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu den klassischen Protein-Chaperonen wie beispielsweise GroEL, die weitgehend eine Faltung besitzen, gibt es auch nativ ungefaltete RNA-Chaperone, welche bei jedem Schritt des RNA-Metabolismus (Transkription, RNA-Prozessierung, Transport und Translation) eine wichtige Rolle spielen. Zu dieser Gruppe gehören Proteine wie hnRNP A1, p53 oder PrP^C (Cristofari und Darlix, 2002). Protein-Chaperone wie auch RNA-Chaperone befreien Proteine bzw. RNA aus kinetisch kontrollierten Minima, denen sie nicht mehr selbständig enttrinnen können. Chaperone im klassischen Sinne sind gefaltete Proteinmaschinen, die unter ATP-Hydrolyse Faltungsintermediate über Energiebarrieren bringen. Bei diesen Chaperonen konnte ein auffallend großer Anteil ungefalteter Bereiche beobachtet werden. Ca. 40 % der RNA-Chaperone und 15 % der Protein-Chaperone besitzen ungefaltete Bereiche von mehr als 40 Aminosäuren Länge (Tompa und Csermely, 2004). In den meisten Fällen dient der ungeordnete Teil der Substraterkennung. Kleine Hitzeschockproteine wie beispielsweise Hsp25 besitzen sowohl geordnete Domänen als auch Anteile ungefalteter, N- und/oder C-terminal lokalisierter Bereiche (Lindner *et al.*, 2000). Auch in der Chaperoninfamilie befinden sich Proteine mit ungeordneten Regionen an beiden Enden der Polypeptidkette (Braig *et al.*, 1994).

α -Synuclein und α -Casein unterscheiden sich dagegen von den Protein-Chaperonen, da sie beide, wie auch Securin, nativ ungefaltet sind und trotzdem eine Chaperonfunktion aufweisen (Park *et al.*, 2002; Bhattacharyya und Das, 1999). Tompa *et al.* (2004) veröffentlichte eine Modellvorstellung, welche die Chaperonfunktion ungefalteter Proteine erklären könnte (siehe Abbildung 7.1). Im ersten Schritt bindet das ungefaltete Chaperon in einer eher unspezifischen Art und Weise an das teilweise ungefaltete (oder falsch gefaltete) Substrat und nimmt dabei im Bereich dieser Erkennungsdomäne partiell seine Faltung an. Gleichzeitig übt der noch ungefaltete Bereich auf das Substrat einen solubilisierenden Effekt aus, interagiert anschließend mit dem Substrat und nimmt eine Faltung an, die das Substrat lokal entfaltet und in die neue, korrekte Faltung zwingt. Am Ende kann sich das Chaperon vom Substrat lösen oder am Substrat gebunden bleiben, wie im Fall des Securin-Separase-Komplexes.

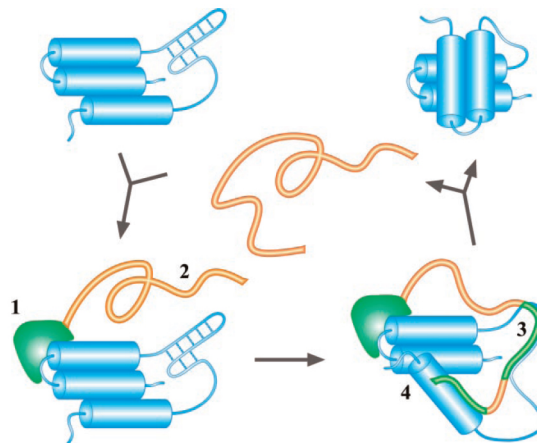


Abbildung 7.1: Modellvorstellung zur Wirkungsweise nativ ungefalteter Chaperone nach Tompa *et al.* (2004). (1) Ein ungeordnetes Chaperon bindet im ersten Schritt über das Erkennungssegment (grün) an das Substrat. (2) Der ungefaltete Teil des Chaperons dient der Solubilisierung und wirkt der Aggregation entgegen. (3) Im nächsten Schritt führt die Interaktion der ungefalteten Chaperondomäne mit dem Substrat zu dessen partieller Entfaltung. (4) Die erhöhte Substratflexibilität ermöglicht daraufhin die korrekte Faltung des Substrats. Im letzten Schritt entlässt das Chaperon das gefaltete Substrat.

7.4 Expression und Rückfaltung humaner Separase

Neben der Expression, Aufreinigung und biochemischen Analyse humanen Securins, wurde im Baculovirus-Expressionssystem rekombinant exprimierte Separase in geringen Mengen aufgereinigt. Da für die Proteinkristallographie große Mengen Protein notwendig waren, wurde die Expression nicht weiter verfolgt. Die Separasefragmente K13, K20, K42 und K44 konnten in *E. coli* rekombinant exprimiert werden, jedoch wurde das Enzym als Einschlusskörper (*inclusion bodies*) abgelagert. Nach der Aufreinigung und Solubilisierung dieser Einschlusskörper sollte die Separase durch *rapid dilution* oder Säulentrückfaltung auf der NiNTA-Säule rückgefaltet werden. Da Separase nativ keine Disulfidbrücken ausbildet, wurde bei der Rückfaltung durch *rapid dilution* neben der Arginin- und Salzkonzentration auch der pH-Wert variiert. Bei allen Rückfaltungsbedingungen aggregierte das Protein gleichermaßen. Auch der Zusatz von Additiven wie divalente Kationen oder Detergenzien ergab keine Verbesserung.

In vivo besitzt die humane Separase eine Länge von 2.120 Aminosäuren und ist aufgrund ihrer Größe für die Expression in *E. coli* nicht geeignet. Die deutlich kürzeren Fragmente, die in der Nähe der Autokatalysestellen (K42, K44) bzw. direkt an der N-terminalen Proteinasedomäne (K13, K20) beginnen, decken einen kleinen nur die Protasedomäne umfassenden Bereich der Separase ab. Bei der Expression der Separasefragmente kam der Proteinfaltungsvorgang in einem Energieminimum zum Erliegen, bei dem möglicherweise hydrophobe Bereiche an die Oberfläche des Proteins gelangten, was letztendlich zur Aggregation des rekombinant exprimierten Proteins führte. Diese Aggregation und anschließende Ablagerung in Einschlusskörper ist ein in *E. coli* häufig beobachtetes

Phänomen. Es gibt verschiedene Ursachen für die Ausbildung dieser Einschlusskörper. *E. coli* entledigt sich auf diese Weise toxischer Expressionsprodukte, die einen gravierenden Einfluss auf den Stoffwechsel des Bakteriums haben könnten. Ein Mangel an Chaperonen - Proteine die der Faltung anderer Protein dienen - ist bei der Überexpression rekombinanter Proteine ein weiteres Problem, welches diese Ablagerungen in Einschlusskörpern hervorrufen kann. Insbesondere bei Proteinen höherer Organismen, die vielfältige posttranslationelle Modifikationen wie beispielsweise Glykosylierungen besitzen können, ist die Expression in *E. coli* problematisch, da das Bakterium dazu überhaupt nicht in der Lage ist. Fehlt bei diesen Proteinen die posttranslationelle Modifikation, kann dies unter Umständen zur Aggregation und Ablagerung in Einschlusskörper führen.

Die Einschlusskörper besitzen eine Größe von bis zu $2 \mu\text{m}^3$ und sind im Elektronenmikroskop als dichte zylindrische oder eiförmige Aggregate ohne definierte Struktur zu erkennen (Carrio *et al.*, 1998; Bowden *et al.*, 1991). Meist befinden sich Einschlusskörper im Cytoplasma, jedoch konnten sie bei sekretierten Proteinen wie der β -Lactamase auch im periplasmatischen Raum gefunden werden (Georgiou *et al.*, 1986). In der Regel bestehen die Einschlusskörper zu über 50 % aus dem überexprimierten Protein. Oftmals sind auch kleine Hitzeschockproteine (IbpA, IbpB) oder Chaperone (DnaK, GroEL) in diesen Aggregaten zu finden, welche möglicherweise während des Aggregationsvorganges nicht mehr entkommen konnten (Allen *et al.*, 1992; Carrio und Villaverde, 2002). In manchen Fällen ist es möglich, die Ausbildung der Einschlusskörper durch Variation der Wachstumsbedingungen (Temperatur, Induktionszeitpunkt) oder durch die Anpassung der Codon-Verwendung durch Hinzufügen von seltenen tRNAs zu reduzieren. Insbesondere Arginin-, Isoleucin-, Glycin-, Leucin- und Prolin-Codons sind in *E. coli* stark unterrepräsentiert und können die Translation eukaryontischer Proteine behindern (Nakamura *et al.*, 2000). Auch die Koexpression von Chaperonen oder die Verwendung eines anderen *E. coli* Stammes kann die korrekte Faltung eines Proteins herbeiführen. Sind beispielsweise die Aminosäuren bekannt, welche die Aggregation des Expressionsproduktes hervorrufen könnten, ist es möglich, durch gezielte Mutagenese die Ausbildung von Einschlusskörpern zu unterbinden. Führt dies nicht zum Erfolg, ist die Rückfaltung oder der Wechsel in einen anderen Organismus oftmals die letzte Möglichkeit, natives Protein zu erhalten. Durch die erfolgreiche Expression der Separase in Insektenzellen konnten zwei Separasefragmente unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden, während die Expression in *E. coli* zur Ausbildung von Einschlusskörpern führte.

Anhang A

Abkürzungen

AA	Aminosäure
APC/C	<i>anaphase promoting complex/cyclosome</i>
APPA	4-Amidinophenylpyruvat
APS	Ammoniumpersulfat
ARM	Armadillo
ATP	Adenosin-triphosphat
BAPNA	<i>N</i> α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride
Bub1B	<i>budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta</i>
CCD	<i>charged coupled device</i>
CD	<i>circular dichroism</i>
Cdc20	<i>cell division cycle 20</i>
Cdk	<i>cyclin dependent kinase</i>
CENP-E	<i>Centromeric protein E</i>
Chk1	<i>checkpoint kinase 1</i>
<i>c-myc</i>	<i>cellular myelocytomatosis oncogene</i>
Cut2	<i>cell untimely torn protein 2</i>
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTNB	<i>5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
EAE	Experimentelle Autoimmun Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
Espl1	<i>extra spindle poles-like 1</i>
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
HGFA	<i>hepatocyte growth factor activator</i>
hnRNP A1	<i>heteronuclear ribonucleoprotein</i>
HPK	<i>horse prostate kallikrein</i>

HSP25	<i>heat shock protein 25</i>
HtrA	<i>high-temperature-requirement A</i>
IL	Interleukin
IbpA	<i>inclusion body-associated protein A</i>
IbpB	<i>inclusion body-associated protein B</i>
Ig	Immunoglobulin
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
kDa	Kilodalton
Mad2	<i>mitotic arrest deficient protein 2</i>
MAP-Kinase	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MC	<i>mast cell</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MMP	Matrixmetalloproteinase
Mops	2-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
Mps1	<i>monopolar spindle 1</i>
MS	Multiple Sklerose
MUGB	4-Methylumbelliferyl-p-guanidino-benzoat
MW	Molekulargewicht
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PAR-2	<i>proteinase-activated receptor 2</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PrP ^C	<i>cellular prion-related protein</i>
Pttg1	<i>pituitary tumor-transforming protein 1</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rHT α	rekombinante, humane α I-Tryptase
rHT β	rekombinante, humane β II-Tryptase
rHT α G	rHT α -D216G
rHT α G ^I	rHT α -D216G (Leupeptin-inhibiert)
rHT α QG ^I	rHT α -K192Q/D216G (Leupeptin-inhibiert)
Rod	<i>rough deal</i>
Scc	<i>sister chromatid cohesion</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH3	<i>src homology 3</i>
Smc	<i>structural maintenance of chromosome</i>
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF- α	<i>tumor necrosis factor α</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>

Literaturverzeichnis

- Agarwal, R. und Cohen-Fix, O. 2002. Phosphorylation of the mitotic regulator pds1/securin by cdc28 is required for efficient nuclear localization of esp1/separase. *Genes Dev*, 16(11):1371–82.
- Akers, I. A., Parsons, M., Hill, M. R., Hollenberg, M. D., Sanjar, S., Laurent, G. J., und McAnulty, R. J. 2000. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278(1):L193–201.
- Allen, S. P., Polazzi, J. O., Gierse, J. K., und Easton, A. M. 1992. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in escherichia coli. *J Bacteriol*, 174(21):6938–47.
- Anderson, D. E., Losada, A., Erickson, H. P., und Hirano, T. 2002. Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol*, 156(3):419–24.
- Bahadur, R. P., Chakrabarti, P., Rodier, F., und Janin, J. 2003. Dissecting subunit interfaces in homodimeric proteins. *Proteins*, 53(3):708–19.
- Barton, G. J. 1993. Alscript: a tool to format multiple sequence alignments. *Protein Eng*, 6(1):37–40.
- Batra-Safferling, R., Abarca-Heidemann, K., Korschen, H. G., Tziatzios, C., Stoldt, M., Budyak, I., Willbold, D., Schwalbe, H., Klein-Seetharaman, J., und Kaupp, U. B. 2006. Glutamic acid-rich proteins of rod photoreceptors are natively unfolded. *J Biol Chem*, 281(3):1449–60.
- Baum, P., Yip, C., Goetsch, L., und Byers, B. 1988. A yeast gene essential for regulation of spindle pole duplication. *Mol Cell Biol*, 8(12):5386–97.
- Beer, D. J. und Rocklin, R. E. 1984. Histamine-induced suppressor-cell activity. *J Allergy Clin Immunol*, 73(4):439–52.
- Benoist, C. und Mathis, D. 2002. Mast cells in autoimmune disease. *Nature*, 420(6917):875–8.

- Berger, P., Girodet, P. O., Begueret, H., Ousova, O., Perng, D. W., Marthan, R., Walls, A. F., und Tunon de Lara, J. M. 2003. Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *Faseb J*, 17(14):2139–41.
- Berger, P., Perng, D. W., Thabrew, H., Compton, S. J., Cairns, J. A., McEuen, A. R., Marthan, R., Tunon De Lara, J. M., und Walls, A. F. 2001. Tryptase and agonists of par-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol*, 91(3):1372–9.
- Bhattacharyya, J. und Das, K. P. 1999. Molecular chaperone-like properties of an unfolded protein, alpha(s)-casein. *J Biol Chem*, 274(22):15505–9.
- Blair, R. J., Meng, H., Marchese, M. J., Ren, S., Schwartz, L. B., Tonnesen, M. G., und Gruber, B. L. 1997. Human mast cells stimulate vascular tube formation. tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J Clin Invest*, 99(11):2691–700.
- Bode, W. 1979. [activation, activity and inhibition of bovine trypsin]. *Naturwissenschaften*, 66(5):251–8.
- Bode, W. und Huber, R. 1976. Induction of the bovine trypsinogen-trypsin transition by peptides sequentially similar to the n-terminus of trypsin. *FEBS Lett*, 68(2):231–6.
- Bowden, G. A., Paredes, A. M., und Georgiou, G. 1991. Structure and morphology of protein inclusion bodies in escherichia coli. *Biotechnology (N Y)*, 9(8):725–30.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L., und Sigler, P. B. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin groel at 2.8 a. *Nature*, 371(6498):578–86.
- Brandstetter, H., Bauer, M., Huber, R., Lollar, P., und Bode, W. 1995. X-ray structure of clotting factor ixa: active site and module structure related to xase activity and hemophilia b. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(21):9796–800.
- Brenner, T., Soffer, D., Shalit, M., und Levi-Schaffer, F. 1994. Mast cells in experimental allergic encephalomyelitis: characterization, distribution in the cns and in vitro activation by myelin basic protein and neuropeptides. *J Neurol Sci*, 122(2):210–3.
- Brewster, C. E., Howarth, P. H., Djukanovic, R., Wilson, J., Holgate, S. T., und Roche, W. R. 1990. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 3(5):507–11.
- Brown, J. K., Jones, C. A., Rooney, L. A., Caughey, G. H., und Hall, I. P. 2002. Tryptase's potent mitogenic effects in human airway smooth muscle cells are via nonproteolytic actions. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 282(2):L197–L206.

- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. 1998. Crystallography & nmr system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 54:905–921.
- Cairns, J. A. 2005. Inhibitors of mast cell tryptase beta as therapeutics for the treatment of asthma and inflammatory disorders. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 18(1):55–66.
- Carrío, M. M., Corchero, J. L., and Villaverde, A. 1998. Dynamics of in vivo protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 169(1):9–15.
- Carrío, M. M. und Villaverde, A. 2002. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol*, 96(1):3–12.
- Carvalho, A. L., Sanz, L., Baretino, D., Romero, A., Calvete, J. J., and Romao, M. J. 2002. Crystal structure of a prostate kallikrein isolated from stallion seminal plasma: a homologue of human psa. *J Mol Biol*, 322(2):325–37.
- Caughey, G. H. 2001. New developments in the genetics of mast cell proteases. *Mol Immunol*, 38:1353–57.
- Caughey, G. H., Raymond, W. W., Blount, J. L., Hau, L. W., Pallaoro, M., Wolters, P. J., and Verghese, G. M. 2000. Characterization of human gamma-tryptases, novel members of the chromosome 16p mast cell tryptase and prostatic gene families. *J Immunol*, 164(12):6566–75.
- Ch'ng, S., Wallis, R. A., Yuan, L., Davis, P. F., and Tan, S. T. 2006. Mast cells and cutaneous malignancies. *Mod Pathol*, 19(1):149–59.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., and Nasmyth, K. 1998. An *esp1/pds1* complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell*, 93(6):1067–76.
- Claman, H. N. 1993. Corticosteroids as immunomodulators. *Ann N Y Acad Sci*, 685:288–92.
- Cocks, T. M., Fong, B., Chow, J. M., Anderson, G. P., Frauman, A. G., Goldie, R. G., Henry, P. J., Carr, M. J., Hamilton, J. R., and Moffatt, J. D. 1999. A protective role for protease-activated receptors in the airways. *Nature*, 398(6723):156–60.
- Cohen-Fix, O., Peters, J. M., Kirschner, M. W., and Koshland, D. 1996. Anaphase initiation in *saccharomyces cerevisiae* is controlled by the apc-dependent degradation of the anaphase inhibitor *pds1p*. *Genes Dev*, 10(24):3081–93.

- Craik, C. S., Largman, C., Fletcher, T., Rocznik, S., Barr, P. J., Fletterick, R., und Rutter, W. J. 1985. Redesigning trypsin - alteration of substrate-specificity. *Science*, 228(4697):291–297.
- Cregar, L., Elrod, K. C., Putnam, D., und Moore, W. R. 1999. Neutrophil myeloperoxidase is a potent and selective inhibitor of mast cell tryptase. *Arch Biochem Biophys*, 366(1):125–30.
- Cristofari, G. und Darlix, J. L. 2002. The ubiquitous nature of rna chaperone proteins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 72:223–68.
- Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M., und Barton, G. J. 1998. Jpred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics*, 14(10):892–3.
- Daeron, M., Malbec, O., Latour, S., Arock, M., und Fridman, W. H. 1995. Regulation of high-affinity ige receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity igg receptors. *J Clin Invest*, 95(2):577–85.
- David, D. C., Layfield, R., Serpell, L., Narain, Y., Goedert, M., und Spillantini, M. G. 2002. Proteasomal degradation of tau protein. *J Neurochem*, 83(1):176–85.
- Dawson, R., Muller, L., Dehner, A., Klein, C., Kessler, H., und Buchner, J. 2003. The n-terminal domain of p53 is natively unfolded. *J Mol Biol*, 332(5):1131–41.
- de Cidre, L. und Sacerdote de Lustig, E. 1990. Mast cell kinetics during tumor growth. *Tumour Biol*, 11(4):196–201.
- DeLano, W. 2002. The pymol molecular graphics system on world wide web <http://www.pymol.org>.
- Dvorak, A. M., Mihm, M. C., J., und Dvorak, H. F. 1976. Morphology of delayed-type hypersensitivity reactions in man. ii. ultrastructural alterations affecting the microvasculature and the tissue mast cells. *Lab Invest*, 34(2):179–91.
- Ehrlich, P. 1877. Beiträge zur kenntniss der quillinfäbungen und ihrer verwendung in der mikroskopischen technik. *Alch Mikros Anat*, 13:263–67.
- Elledge, S. J. 1998. Mitotic arrest: Mad2 prevents sleepy from waking up the apc. *Science*, 279(5353):999–1000.
- Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82(1):70–7.
- Engh, R. A. und Huber, R. 1991. Accurate bond and angle parameters for x-ray protein-structure refinement. *Acta Crystallographica Section A*, 47:392–400.
- Erba, F., Fiorucci, L., Pascarella, S., Menegatti, E., Ascenzi, P., und Ascoli, F. 2001. Selective inhibition of human mast cell tryptase by gabexate mesylate, an antiproteinase drug. *Biochem Pharmacol*, 61(3):271–6.

- Erba, F., Fiorucci, L., Sommerhoff, C. P., Coletta, M., und Ascoli, F. 2000. Kinetic and thermodynamic analysis of leech-derived trypsin inhibitor interaction with bovine trypsin and bovine trypsin. *Biol Chem*, 381(11):1117–22.
- Esnouf, R. M. 1999. Further additions to molscript version 1.4, including reading and contouring of electron-density maps. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55(Pt 4):938–40.
- Fajardo, I. und Pejler, G. 2003. Human mast cell beta-trypsin is a gelatinase. *J Immunol*, 171(3):1493–9.
- Falus, A. und Meretey, K. 1992. Histamine: an early messenger in inflammatory and immune reactions. *Immunol Today*, 13(5):154–6.
- Fandrich, M. und Dobson, C. M. 2002. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *Embo J*, 21(21):5682–90.
- Fink, A. L. 2005. Natively unfolded proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 15(1):35–41.
- Fiorucci, L. und Ascoli, F. 2004. Mast cell trypsin, a still enigmatic enzyme. *Cell Mol Life Sci*, 61(11):1278–95.
- Fiorucci, L., Erba, F., Falasca, L., Dini, L., und Ascoli, F. 1995. Localization and interaction of bovine pancreatic trypsin inhibitor and trypsin in the granules of bovine mast cells. *Biochim Biophys Acta*, 1243(3):407–13.
- Fox, C. C., Kagey-Sobotka, A., Schleimer, R. P., Peters, S. P., MacGlashan, D. W., J., und Lichtenstein, L. M. 1985. Mediator release from human basophils and mast cells from lung and intestinal mucosa. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 77(1-2):130–6.
- French, G. und Wilson, K. 1978. *Acta Crystallographica Section A*, 34:517.
- Friedrich, R., Panizzi, P., Fuentes-Prior, P., Richter, K., Verhamme, I., Anderson, P. J., Kawabata, S. I., Huber, R., Bode, W., und Bock, P. E. 2003. Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature*, 425(6957):535–539.
- Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T., und Yanagida, M. 1996. Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature*, 381(6581):438–41.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., und Amos, B. 2005. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press, Totowa, USA.
- Georgiou, G., Telford, J. N., Shuler, M. L., und Wilson, D. B. 1986. Localization of inclusion bodies in escherichia coli overproducing beta-lactamase or alkaline phosphatase. *Appl Environ Microbiol*, 52(5):1157–61.

- Gruber, B. L., Marchese, M. J., Suzuki, K., Schwartz, L. B., Okada, Y., Nagase, H., und Ramamurthy, N. S. 1989. Synovial procollagenase activation by human mast cell trypsin dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *J Clin Invest*, 84(5):1657–62.
- Guinto, E. R., Ye, J., Le Bonniec, B. F., und Esmon, C. T. 1994. Glu192→Gln substitution in thrombin yields an enzyme that is effectively inhibited by bovine pancreatic trypsin inhibitor and tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem*, 269(28):18395–400.
- Haering, C. H. und Nasmyth, K. 2003. Building and breaking bridges between sister chromatids. *Bioessays*, 25(12):1178–91.
- Hallgren, J., Backstrom, S., Estrada, S., Thuveson, M., und Pejler, G. 2004. Histidines are critical for heparin-dependent activation of mast cell tryptase. *Journal of Immunology*, 173(3):1868–1875.
- Hallgren, J. und Pejler, G. 2006. Biology of mast cell tryptase. an inflammatory mediator. *Febs J*, 273(9):1871–95.
- Hamid, T. und Kakar, S. S. 2004. Pttg/securin activates expression of p53 and modulates its function. *Mol Cancer*, 3:18.
- Harari, Y., Russell, D. A., und Castro, G. A. 1987. Anaphylaxis-mediated epithelial cl-secretion and parasite rejection in rat intestine. *J Immunol*, 138(4):1250–5.
- Harris, J. L., Niles, A., Burdick, K., Maffitt, M., Backes, B. J., Ellman, J. A., Kuntz, I., Haak-Frendscho, M., und Craik, C. S. 2001. Definition of the extended substrate specificity determinants for beta-tryptases i and ii. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37):34941–34947.
- He, S., Peng, Q., und Walls, A. F. 1997. Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *J Immunol*, 159(12):6216–25.
- Henderson, W. R., Chi, E. Y., Jong, E. C., und Klebanoff, S. J. 1986. Mast cell-mediated toxicity to schistosomula of schistosoma mansoni: potentiation by exogenous peroxidase. *J Immunol*, 137(8):2695–9.
- Hink-Schauer, C., Estebanez-Perpina, E., Wilharm, E., Fuentes-Prior, P., Klinkert, W., Bode, W., und Jenne, D. E. 2002. The 2.2-Å crystal structure of human pro-granzyme k reveals a rigid zymogen with unusual features. *J Biol Chem*, 277(52):50923–33.
- Hornig, N. C., Knowles, P. P., McDonald, N. Q., und Uhlmann, F. 2002. The dual mechanism of separase regulation by securin. *Curr Biol*, 12(12):973–82.
- Hornig, N. C. und Uhlmann, F. 2004. Preferential cleavage of chromatin-bound cohesin after targeted phosphorylation by polo-like kinase. *Embo J*, 23(15):3144–53.

- Hoyt, M. A. 2001. A new view of the spindle checkpoint. *J Cell Biol*, 154(5):909–11.
- Huang, C., De Sanctis, G. T., O'Brien, P. J., Mizgerd, J. P., Friend, D. S., Drazen, J. M., Brass, L. F., und Stevens, R. L. 2001. Evaluation of the substrate specificity of human mast cell tryptase beta i and demonstration of its importance in bacterial infections of the lung. *J Biol Chem*, 276(28):26276–84.
- Huang, C., Li, L., Krilis, S. A., Chanasyk, K., Tang, Y., Li, Z., Hunt, J. E., und Stevens, R. L. 1999. Human tryptases alpha and beta/ii are functionally distinct due, in part, to a single amino acid difference in one of the surface loops that forms the substrate-binding cleft. *J Biol Chem*, 274(28):19670–6.
- Huang, C. F., Wong, G. W., Ghildyal, N., Gurish, M. F., Sali, A., Matsumoto, R., Qiu, W. T., und Stevens, R. L. 1997. The tryptase, mouse mast cell protease 7, exhibits anticoagulant activity in vivo and in vitro due to its ability to degrade fibrinogen in the presence of the diverse array of protease inhibitors in plasma. *Journal of Biological Chemistry*, 272(50):31885–31893.
- Huber, R. und Bode, W. 1978. Structural basis of activation and action of trypsin. *Accounts of Chemical Research*, 11(3):114–122.
- Imamura, T., Dubin, A., Moore, W., Tanaka, R., und Travis, J. 1996. Induction of vascular permeability enhancement by human tryptase: dependence on activation of prekallikrein and direct release of bradykinin from kininogens. *Lab Invest*, 74(5):861–70.
- Irani, A. A., Schechter, N. M., Craig, S. S., DeBlois, G., und Schwartz, L. B. 1986. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(12):4464–8.
- Irani, A. M., Bradford, T. R., Kepley, C. L., Schechter, N. M., und Schwartz, L. B. 1989. Detection of mct and mctc types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem*, 37(10):1509–15.
- Itoh, H., Ide, H., Ishikawa, N., und Nawa, Y. 1994. Mast cell protease inhibitor, trypstatin, is a fragment of inter-alpha-trypsin inhibitor light chain. *J Biol Chem*, 269(5):3818–22.
- Jancarik, J., Scott, W. G., Milligan, D. L., Koshland, D. E., J., und Kim, S. H. 1991. Crystallization and preliminary x-ray diffraction study of the ligand-binding domain of the bacterial chemotaxis-mediating aspartate receptor of salmonella typhimurium. *J Mol Biol*, 221(1):31–4.
- Janeway, C. und Travers, P. 1997. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.

- Jing, H., Babu, Y. S., Moore, D., Kilpatrick, J. M., Liu, X. Y., Volanakis, J. E., and Narayana, S. V. 1998. Structures of native and complexed complement factor d: implications of the atypical his57 conformation and self-inhibitory loop in the regulation of specific serine protease activity. *J Mol Biol*, 282(5):1061–81.
- Jones, S. und Thornton, J. M. 1996. Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(1):13–20.
- Kitamura, Y., Yokoyama, M., Matsuda, H., Ohno, T., und Mori, K. J. 1981. Spleen colony-forming cell as common precursor for tissue mast cells and granulocytes. *Nature*, 291(5811):159–60.
- Kleywegt, G. und Jones, T. 1994. *Halloween ... Masks and Bones*. SERC Daresbury Laboratory, Warrington.
- Kleywegt, G. J. und Jones, T. A. 1997. Model-building and refinement practice. *Methods in Enzymology*, 277:208–230.
- Kraulis, P. J. 1991. Molscript - a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 24:946–950.
- Krishna, M. T., Chauhan, A., Little, L., Sampson, K., Hawksworth, R., Mant, T., Djukanovic, R., Lee, T., und Holgate, S. 2001. Inhibition of mast cell tryptase by inhaled apc 366 attenuates allergen-induced late-phase airway obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 107(6):1039–45.
- Kriwacki, R. W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S. I., und Wright, P. E. 1996. Structural studies of p21waf1/cip1/sdi1 in the free and cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(21):11504–9.
- Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M., und Clausen, T. 2002. Crystal structure of degp (htra) reveals a new protease-chaperone machine (vol 416, pg 455, 2002). *Nature*, 417(6884):102–102.
- Lagunoff, D., Martin, T. W., und Read, G. 1983. Agents that release histamine from mast cells. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 23:331–51.
- Laskowski, R. A., Moss, D. S., und Thornton, J. M. 1993. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J Mol Biol*, 231(4):1049–67.
- Le Bonniec, B. F. und Esmon, C. T. 1991. Glu-192—gln substitution in thrombin mimics the catalytic switch induced by thrombomodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(16):7371–5.
- Le Bonniec, B. F., Guinto, E. R., und Stone, S. R. 1995. Identification of thrombin residues that modulate its interactions with antithrombin-iii and alpha-1-antitrypsin. *Biochemistry*, 34(38):12241–12248.

- Leiferman, K. M., Ackerman, S. J., Sampson, H. A., Haugen, H. S., Venencie, P. Y., und Gleich, G. J. 1985. Dermal deposition of eosinophil-granule major basic protein in atopic dermatitis. comparison with onchocerciasis. *N Engl J Med*, 313(5):282–5.
- Leslie, A., Brick, P., und Wonacott, A. 1986. Mosflm program. *Daresbury Laboratory Information Quarterly for Protein Crystallography*, 189:33–39.
- Li, M., Phylip, L. H., Lees, W. E., Winther, J. R., Dunn, B. M., Wlodawer, A., Kay, J., und Gustchina, A. 2000. The aspartic proteinase from *saccharomyces cerevisiae* folds its own inhibitor into a helix. *Nat Struct Biol*, 7(2):113–7.
- Li, Y., Gorbea, C., Mahaffey, D., Rechsteiner, M., und Benezra, R. 1997. Mad2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(23):12431–6.
- Lindner, R. A., Carver, J. A., Ehrnsperger, M., Buchner, J., Esposito, G., Behlke, J., Lutsch, G., Kotlyarov, A., und Gaestel, M. 2000. Mouse hsp25, a small shock protein. the role of its c-terminal extension in oligomerization and chaperone action. *Eur J Biochem*, 267(7):1923–32.
- Lydakis-Simantiris, N., Betts, S., und C.F., Y. 1999. Leucine 245 is a critical residue for folding and function of the manganese stabilizing protein of photosystem ii. *Biochemistry*, 38(47):15528–35.
- Malamud, V., Vaaknin, A., Abramsky, O., Mor, M., Burgess, L. E., Ben-Yehudah, A., und Lorberboum-Galski, H. 2003. Tryptase activates peripheral blood mononuclear cells causing the synthesis and release of tnf-alpha, il-6 and il-1 beta: possible relevance to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 138(1-2):115–22.
- Malone, D. G., Irani, A. M., Schwartz, L. B., Barrett, K. E., und Metcalfe, D. D. 1986. Mast cell numbers and histamine levels in synovial fluids from patients with diverse arthritides. *Arthritis Rheum*, 29(8):956–63.
- Marquardt, U., Zettl, F., Huber, R., Bode, W., und Sommerhoff, C. 2002. The crystal structure of human alpha1-tryptase reveals a blocked substrate-binding region. *J Mol Biol*, 321(3):491–502.
- Meininger, C. J. 1995. Mast cells and tumor-associated angiogenesis. *Chem Immunol*, 62:239–57.
- Meininger, C. J. und Zetter, B. R. 1992. Mast cells and angiogenesis. *Semin Cancer Biol*, 3(2):73–9.
- Mekori, Y. A. und Metcalfe, D. D. 2000. Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev*, 173:131–40.
- Merritt, E. A. und Murphy, M. E. 1994. Raster3d version 2.0. a program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50(Pt 6):869–73.

- Metcalfe, D. D. 1983. Effector cell heterogeneity in immediate hypersensitivity reactions. *Clin Rev Allergy*, 1(3):311–25.
- Metcalfe, D. D., Baram, D., und Mekori, Y. A. 1997. Mast cells. *Physiol Rev*, 77(4):1033–79.
- Min, H. K., Kambe, N., und Schwartz, L. B. 2001. Human mouse mast cell protease 7-like tryptase genes are pseudogenes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(2):315–321.
- Mirza, H., Schmidt, V. A., Derian, C. K., Jesty, J., und Bahou, W. F. 1997. Mitogenic responses mediated through the proteinase-activated receptor-2 are induced by expressed forms of mast cell alpha- or beta-tryptases. *Blood*, 90(10):3914–3922.
- Mizutani, H., Schechter, N., Lazarus, G., Black, R. A., und Kupper, T. S. 1991. Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (il-1 beta) to an active il-1 species by human mast cell chymase. *J Exp Med*, 174(4):821–5.
- Mochizuki, M., Kuwabara, T., Chan, C. C., Nussenblatt, R. B., Metcalfe, D. D., und Gery, I. 1984. An association between susceptibility to experimental autoimmune uveitis and choroidal mast cell numbers. *J Immunol*, 133(4):1699–701.
- Mucsi, Z., Hudecz, F., Hollosi, M., Tompa, P., und Friedrich, P. 2003. Binding-induced folding transitions in calpastatin subdomains a and c. *Protein Sci*, 12(10):2327–36.
- Musacchio, A. und Hardwick, K. G. 2002. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(10):731–41.
- Nakamura, Y., Gojobori, T., und Ikemura, T. 2000. Codon usage tabulated from international dna sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res*, 28(1):292.
- Navaza, J. 1994. Amore - an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallographica Section A*, 50:157–163.
- Nicholls, A., Sharp, K. A., und Honig, B. 1991. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins*, 11(4):281–96.
- Nicklas, R. B. 1997. How cells get the right chromosomes. *Science*, 275(5300):632–7.
- Nutman, T. B. 1993. *Mast cells and their role in parasitic helminth infection*. The Mast Cell in Health and Disease. Dekker, New York.
- Oh, S. W., Pae, C. I., Lee, D. K., Jones, F., Chiang, G. K., Kim, H. O., Moon, S. H., Cao, B., Ogbu, C., Jeong, K. W., Kozu, G., Nakanishi, H., Kahn, M., Chi, E. Y., und Henderson, W. R., J. 2002. Tryptase inhibition blocks airway inflammation in a mouse asthma model. *J Immunol*, 168(4):1992–2000.

- Ottwinowski, Z. und Minor, W. 1997. Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology*, 276:307–326.
- Otwinowski, Z. und Minor, W. 1997. Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Pt A*, 276:307–326.
- Pallaoro, M., Fejzo, M. S., Shayesteh, L., Blount, J. L., und Caughey, G. H. 1999. Characterization of genes encoding known and novel human mast cell tryptases on chromosome 16p13.3. *Journal of Biological Chemistry*, 274(6):3355–3362.
- Papi, M., Berdough, E., Randall, C. L., Ganguly, S., und Jallepalli, P. V. 2005. Multiple roles for separase auto-cleavage during the g2/m transition. *Nat Cell Biol*, 7(10):1029–35.
- Park, S. M., Jung, H. Y., Kim, T. D., Park, J. H., Yang, C. H., und Kim, J. 2002. Distinct roles of the n-terminal-binding domain and the c-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone. *J Biol Chem*, 277(32):28512–20.
- Pasternak, A., White, A., Jeffery, C. J., Medina, N., Cahoon, M., Ringe, D., und Hedstrom, L. 2001. The energetic cost of induced fit catalysis: Crystal structures of trypsinogen mutants with enhanced activity and inhibitor affinity. *Protein Sci*, 10(7):1331–42.
- Pei, L. 2001. Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor-transforming gene. *J Biol Chem*, 276(11):8484–91.
- Pereira, P. J., Bergner, A., Macedo-Ribeiro, S., Huber, R., Matschiner, G., Fritz, H., Sommerhoff, C. P., und Bode, W. 1998. Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore. *Nature*, 392(6673):306–11.
- Perona, J. J. und Craik, C. S. 1995. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci*, 4(3):337–60.
- Ponnuraj, K., Xu, Y., Macon, K., Moore, D., Volanakis, J. E., und Narayana, S. V. 2004. Structural analysis of engineered bb fragment of complement factor b: insights into the activation mechanism of the alternative pathway c3-convertase. *Mol Cell*, 14(1):17–28.
- Popov, A. und Bourenkov, G. 2003. Choice of data-collection parameters based on statistical modelling. *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography*, 59:1851–1871.
- Puri, R., Tousson, A., Chen, L., und Kakar, S. S. 2001. Molecular cloning of pituitary tumor transforming gene 1 from ovarian tumors and its expression in tumors. *Cancer Lett*, 163(1):131–9.
- Rehm, T., Huber, R., und Holak, T. A. 2002. Application of nmr in structural proteomics: screening for proteins amenable to structural analysis. *Structure*, 10(12):1613–8.

- Rodgers, D. W. 1994. Cryocrystallography. *Structure*, 2(12):1135–40.
- Rozniecki, J. J., Hauser, S. L., Stein, M., Lincoln, R., und Theoharides, T. C. 1995. Elevated mast cell tryptase in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*, 37(1):63–6.
- Saez, C., Martinez-Brocca, M. A., Castilla, C., Soto, A., Navarro, E., Tortolero, M., Pintor-Toro, J. A., und Japon, M. A. 2006. Prognostic significance of human pituitary tumor-transforming gene immunohistochemical expression in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(4):1404–9.
- Sakai, K., Ren, S., und Schwartz, L. B. 1996. A novel heparin-dependent processing pathway for human tryptase. autocatalysis followed by activation with dipeptidyl peptidase i. *J Clin Invest*, 97(4):988–95.
- Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M., und Elledge, S. J. 1999. Control of the dna damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science*, 286(5442):1166–71.
- Sanchez-Puig, N., Veprintsev, D. B., und Fersht, A. R. 2005. Human full-length securin is a natively unfolded protein. *Protein Sci*, 14(6):1410–8.
- Sarin, S. K., Malhotra, V., Sen Gupta, S., Karol, A., Gaur, S. K., und Anand, B. S. 1987. Significance of eosinophil and mast cell counts in rectal mucosa in ulcerative colitis. a prospective controlled study. *Dig Dis Sci*, 32(4):363–7.
- Schechter, N. M., Eng, G. Y., und McCaslin, D. R. 1993. Human skin tryptase: kinetic characterization of its spontaneous inactivation. *Biochemistry*, 32(10):2617–25.
- Schechter, N. M., Irani, A. M., Sprows, J. L., Abernethy, J., Wintroub, B., und Schwartz, L. B. 1990. Identification of a cathepsin g-like proteinase in the mctc type of human mast cell. *J Immunol*, 145(8):2652–61.
- Schulman, E. S., Kagey-Sobotka, A., MacGlashan, D. W., J., Adkinson, N. F., J., Peters, S. P., Schleimer, R. P., und Lichtenstein, L. M. 1983. Heterogeneity of human mast cells. *J Immunol*, 131(4):1936–41.
- Schwartz, L. B. 1995. *Mast cells tryptase: properties and roles in human allergic responses*. Mast Cell Proteases in Immunology and Biology. Dekker, New York.
- Schwartz, L. B. und Bradford, T. R. 1986. Regulation of tryptase from human lung mast cells by heparin. stabilization of the active tetramer. *J Biol Chem*, 261(16):7372–9.
- Schwartz, L. B., Lewis, R. A., und Austen, K. F. 1981. Tryptase from human pulmonary mast cells. purification and characterization. *J Biol Chem*, 256(22):11939–43.
- Schwartz, L. B., Riedel, C., Schratz, J. J., und Austen, K. F. 1982. Localization of carboxypeptidase a to the macromolecular heparin proteoglycan-protein complex in secretory granules of rat serosal mast cells. *J Immunol*, 128(3):1128–33.

- Schweers, O., Schonbrunn-Hanebeck, E., Marx, A., und Mandelkow, E. 1994. Structural studies of tau protein and alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J Biol Chem*, 269(39):24290–7.
- Selwood, T., Smolensky, H., McCaslin, D. R., und Schechter, N. M. 2005. The interaction of human tryptase-beta with small molecule inhibitors provides new insights into the unusual functional instability and quaternary structure of the protease. *Biochemistry*, 44(9):3580–90.
- Selwood, T., Wang, Z. M., McCaslin, D. R., und Schechter, N. M. 2002. Diverse stability and catalytic properties of human tryptase alpha and beta isoforms are mediated by residue differences at the s1 pocket. *Biochemistry*, 41(10):3329–40.
- Sherr, C. J. und Roberts, J. M. 1999. Cdk inhibitors: positive and negative regulators of g1-phase progression. *Genes Dev*, 13(12):1501–12.
- Shi, Y. 2004. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell*, 117(7):855–8.
- Shia, S., Stamos, J., Kirchhofer, D., Fan, B., Wu, J., Corpuz, R. T., Santell, L., Lazarus, R. A., und Eigenbrot, C. 2005. Conformational lability in serine protease active sites: structures of hepatocyte growth factor activator (hgfa) alone and with the inhibitory domain from hgfa inhibitor-1b. *J Mol Biol*, 346(5):1335–49.
- Sichler, K., Kopetzki, E., Huber, R., Bode, W., Hopfner, K. P., und Brandstetter, H. 2003. Physiological fixa activation involves a cooperative conformational rearrangement of the 99-loop. *J Biol Chem*, 278(6):4121–6.
- Slauson, D. O., Walker, C., Kristensen, F., Wang, Y., und de Weck, A. L. 1984. Mechanisms of serotonin-induced lymphocyte proliferation inhibition. *Cell Immunol*, 84(2):240–52.
- Sommerhoff, C. P., Bode, W., Matschiner, G., Bergner, A., und Fritz, H. 2000. The human mast cell tryptase tetramer: a fascinating riddle solved by structure. *Biochim Biophys Acta*, 1477(1-2):75–89.
- Sommerhoff, C. P., Sollner, C., Mentele, R., Piechotka, G. P., Auerswald, E. A., und Fritz, H. 1994. A kazal-type inhibitor of human mast cell tryptase: isolation from the medical leech *hirudo medicinalis*, characterization, and sequence analysis. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 375(10):685–94.
- Soto, D., Malmsten, C., Blount, J. L., Muilenburg, D. J., und Caughey, G. H. 2002. Genetic deficiency of human mast cell alpha-tryptase. *Clinical and Experimental Allergy*, 32(7):1000–1006.
- Stack, M. S. und Johnson, D. A. 1994. Human mast cell tryptase activates single-chain urinary-type plasminogen activator (pro-urokinase). *J Biol Chem*, 269(13):9416–9.

- Stemmann, O., Boos, D., und Gorr, I. H. 2005. Rephrasing anaphase: separate fears shugoshin. *Chromosoma*, 113(8):409–17.
- Stürzebecher, J., Prasa, D., und Sommerhoff, C. P. 1992. Inhibition of human mast cell tryptase by benzamidine derivatives. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 373(10):1025–30.
- Tam, E. K. und Caughey, G. H. 1990. Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 3(1):27–32.
- Tanaka, T., Fuchs, J., Loidl, J., und Nasmyth, K. 2000. Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation. *Nat Cell Biol*, 2(8):492–9.
- Thompson, J., Higgins, D., und Gibson, T. 1994. Clustalw: 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.
- Tompa, P. und Csermely, P. 2004. The role of structural disorder in the function of rna and protein chaperones. *Faseb J*, 18(11):1169–75.
- Tong, J., Allenspach, E. J., Takahashi, S. M., Mody, P. D., Park, C., Burkhardt, J. K., und Sperling, A. I. 2004. Cd43 regulation of t cell activation is not through steric inhibition of t cell-apc interactions but through an intracellular mechanism. *J Exp Med*, 199(9):1277–83.
- Trabucchi, E., Radaelli, E., Marazzi, M., Foschi, D., Musazzi, M., Veronesi, A. M., und Montorsi, W. 1988. The role of mast cells in wound healing. *Int J Tissue React*, 10(6):367–72.
- Travis, W. D. und Ching-Yand, L. 1993. *Mast cell disease. The Mast Cell in Health and Disease*. Dekker, New York.
- Tremaine, W. J., Brzezinski, A., Katz, J. A., Wolf, D. C., Fleming, T. J., Mordenti, J., Strenkoski-Nix, L. C., und Kurth, M. C. 2002. Treatment of mildly to moderately active ulcerative colitis with a tryptase inhibitor (apc 2059): an open-label pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*, 16(3):407–13.
- Tu, P. H., Galvin, J. E., Baba, M., Giasson, B., Tomita, T., Leight, S., Nakajo, S., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q., und Lee, V. M. 1998. Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein. *Ann Neurol*, 44(3):415–22.
- Turk, D. 1992. Weiterentwicklung eines programms für molekülgrafik und elektronendichte-manipulation und seine anwendung auf verschiedene protein-strukturaufklärungen. *Technische Universität München, München*.
- Uhlmann, F. 2003. Chromosome cohesion and separation: from men and molecules. *Curr Biol*, 13(12):R104–R114.

- Uhlmann, F., Lottspeich, F., und Nasmyth, K. 1999. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit scc1. *Nature*, 400(6739):37–42.
- Uversky, V. N. 2002. What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem*, 269(1):2–12.
- Vaguine, A. A., Richelle, J., und Wodak, S. J. 1999. Sfccheck: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55(Pt 1):191–205.
- van de Locht, A., Bode, W., Huber, R., Le Bonniec, B. F., Stone, S. R., Esmon, C. T., und Stubbs, M. T. 1997. The thrombin e192q-bpti complex reveals gross structural rearrangements: implications for the interaction with antithrombin and thrombomodulin. *Embo J*, 16(11):2977–84.
- Viadiu, H., Stemmann, O., Kirschner, M. W., und Walz, T. 2005. Domain structure of separase and its binding to securin as determined by em. *Nat Struct Mol Biol*, 12(6):552–3.
- Vucetic, S., Brown, C. J., Dunker, A. K., und Obradovic, Z. 2003. Flavors of protein disorder. *Proteins*, 52(4):573–84.
- Waizenegger, I., Gimenez-Abian, J. F., Wernic, D., und Peters, J. M. 2002. Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr Biol*, 12(16):1368–78.
- Wang, H. W., McNeil, H. P., Husain, A., Liu, K., Tedla, N., Thomas, P. S., Raftery, M., King, G. C., Cai, Z. Y., und Hunt, J. E. 2002. Delta tryptase is expressed in multiple human tissues, and a recombinant form has proteolytic activity. *J Immunol*, 169(9):5145–52.
- Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F., und Jones, D. T. 2004. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol*, 337(3):635–45.
- White, M. V., Slater, J. E., und Kaliner, M. A. 1987. Histamine and asthma. *Am Rev Respir Dis*, 135(5):1165–76.
- Wintroub, B. U., Schechter, N. B., Lazarus, G. S., Kaempfer, C. E., und Schwartz, L. B. 1984. Angiotensin i conversion by human and rat chymotryptic proteinases. *J Invest Dermatol*, 83(5):336–9.
- Wolters, P. J., Pham, C. T., Muilenburg, D. J., Ley, T. J., und Caughey, G. H. 2001. Dipeptidyl peptidase i is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice. *J Biol Chem*, 276(21):18551–6.

- Wong, G. W., Foster, P. S., Yasuda, S., Qi, J. C., Mahalingam, S., Mellor, E. A., Katsoulotos, G., Li, L., Boyce, J. A., Krilis, S. A., und Stevens, R. L. 2002. Biochemical and functional characterization of human transmembrane tryptase (tmt)/tryptase gamma. *J Biol Chem*, 277(44):41906–15.
- Wong, G. W., Yasuda, S., Madhusudhan, M. S., Li, L. X., Yang, Y., Krilis, S. A., Sali, A., und Stevens, R. L. 2001. Human tryptase epsilon (prss22), a new member of the chromosome 16p13.3 family of human serine proteases expressed in airway epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52):49169–49182.
- Wright, P. E. und Dyson, H. J. 1999. Intrinsically unstructured proteins: Re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of Molecular Biology*, 293(2):321–331.
- Xia, H. Z., Kepley, C. L., Sakai, K., Chelliah, J., Irani, A. M., und Schwartz, L. B. 1995. Quantitation of tryptase, chymase, fc epsilon ri alpha, and fc epsilon ri gamma mrnas in human mast cells and basophils by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Immunol*, 154(10):5472–80.
- Zhang, J. und Matthews, C. R. 1998. The role of ligand binding in the kinetic folding mechanism of human p21(h-ras) protein. *Biochemistry*, 37(42):14891–9.
- Zhang, X., Horwitz, G. A., Prezant, T. R., Valentini, A., Nakashima, M., Bronstein, M. D., und Melmed, S. 1999. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (pttg). *Mol Endocrinol*, 13(1):156–66.
- Zsebo, K. M., Wypych, J., McNiece, I. K., Lu, H. S., Smith, K. A., Karkare, S. B., Sachdev, R. K., Yuschenkoff, V. N., Birkett, N. C., und Williams, L. R. 1990. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell*, 63(1):195–201.
- Zur, A. und Brandeis, M. 2002. Timing of apc/c substrate degradation is determined by fzy/fzr specificity of destruction boxes. *Embo J*, 21(17):4500–10.